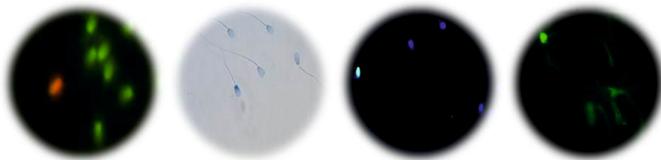


Elisa-Marie Laux geb. Peiffer

UNTERSUCHUNGEN ZUR
CHROMATINKONDENSATION
CANINER SPERMATOZOEN



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2017

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2017

© 2017 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und
Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

und

Frauenklinik der Universitätsklinik Homburg der Universität des Saarlandes

Betreuer: Prof. Dr. Dr. M. E. Hammadeh

UNTERSUCHUNGEN ZUR CHROMATINKONDENSATION

CANINER SPERMATOZOEN

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Elisa-Marie Laux, geb. Peiffer

Tierärztin aus Saarbrücken

Gießen 2017

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Axel Wehrend

Prof. Dr. Dr. M.E. Hammadeh

Tag der Disputation: 27.06.2017

Unserer Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Literatur	2
2.1	Lichtmikroskopische Färbemethoden für Rüdensperma	2
2.1.1	Papanicolaou-Shorr	2
2.1.2	Eosin	2
2.1.3	Diff-Quick	3
2.1.4	Trypanblau und Giemsa	4
2.1.5	Spermac	4
2.1.6	Triple-Stain	4
2.1.7	Formolcitrat-Flüssigfixierung	5
2.1.8	Toluidinblau	5
2.1.9	Anilinblau	6
2.1.10	Spermienchromatindispersionstest	7
2.2	Fluoreszenzmikroskopische Färbemethoden für Rüdensperma	8
2.2.1	Propidiumiodid / Ethidiumhomodimer	8
2.2.2	Carboxyfluorescein und Kombinationen	9
2.2.3	Höchst 33258	10
2.2.4	SYBR-14 und Kombinationen	10
2.2.5	Rhodamine 123	11
2.2.6	5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide (JC-1)	12

2.2.7	Akridinorange.....	12
2.2.8	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling assay (TUNEL)	14
2.2.9	Annexin V	15
2.2.10	YO-PRO 1	15
2.2.11	Lektine	16
2.2.12	Chlortetrazyklin	16
2.2.13	Merocyanin-450	18
2.2.14	Chromomycin A3.....	18
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Probanden.....	21
3.2	Probengewinnung und Aufbereitung	21
3.2.1	Samenentnahme.....	21
3.2.2	Anfertigung von sprühfixierten Ausstrichpräparaten	22
3.3	Samenuntersuchung	22
3.3.1	Makroskopische Untersuchung	22
3.3.2	Computerassistierte Samenanalyse (CASA)	23
3.3.2.1	Aufbau.....	23
3.3.2.2	Ablauf.....	23
3.3.2.3	Untersuchungsparameter	24
3.3.3	Mikroskopische Färbemethoden.....	26
3.3.3.1	Spermiovitalität und Pathomorphologie (Eosin-Färbung).....	26
3.3.3.2	Spermienreifung (Anilinblaufärbung).....	26

3.3.3.3	Chromatindissoziation (Toluidinblaufärbung)	27
3.3.3.4	Chromatinkondensation (Chromomycin A3-Färbung).....	28
3.3.3.5	DNA-Integrität (Akridinorange-Test).....	29
3.3.3.6	Modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatin-Strukturassay (mfSCSA).....	30
3.3.3.7	DNA-Fragmentierung (TUNEL-Test).....	31
3.3.3.8	Apoptosenachweis (Caspase-3-Aktivität)	33
3.4	Erfassen von Praktikabilitätskriterien für die veterinärmedizinische Praxis ..	34
3.4.1	Erfassen der Zeitdauer	34
3.4.2	Berechnung der Materialkosten.....	35
3.4.3	Bewertung der verwendeten Substanzen bezüglich Gesundheits- und Umweltbelastung	35
3.5	Statistische Auswertung.....	35
4	Ergebnisse	38
4.1	Makroskopische Untersuchung	38
4.2	Motilität.....	38
4.3	Spermienzahl.....	38
4.4	Eosinfärbung	40
4.5	Anilinblaufärbung	42
4.5.1	Problematik der Anilinblaufärbung	42
4.5.2	Finanzieller und zeitlicher Aufwand der Anilinblaufärbung	42
4.5.3	Auswertung der Anilinblaufärbung	43
4.6	Toluidinblaufärbung.....	45

4.6.1	Problematik der Toluidinblaufärbung.....	45
4.6.2	Finanzieller und zeitlicher Aufwand der Toluidinblaufärbung.....	46
4.6.3	Auswertung der Toluidinblaufärbung.....	46
4.7.	ChromomycinA3-Färbung	48
4.7.1	Problematik der CMA3-Färbung	48
4.7.2	Finanzieller und zeitlicher Aufwand der CMA3-Färbung	49
4.7.3	Auswertung der CMA3-Färbung	49
4.8	Akridinorange-Test	51
4.8.1	Problematik der Akridinorangefärbung	51
4.8.2	Finanzieller und zeitlicher Aufwand des AOT.....	52
4.8.3	Auswertung des AOT	52
4.9	Modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatinstruktur-Assay (mfSCSA).....	55
4.9.1	Problematik des mfSCSA	55
4.9.2	Finanzieller und zeitlicher Aufwand des mfSCSA.....	56
4.9.3	Auswertung des mfSCSA	56
4.10	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling assay (TUNEL)	57
4.10.1	Problematik des TUNEL-Tests	57
4.10.2	Finanzieller und zeitlicher Aufwand des TUNEL-Tests	58
4.10.3	Auswertung des TUNEL-Tests	58
4.11	Caspase-3-Nachweis	62
4.11.1	Problematik des Caspase-3-Nachweises	62

4.11.2	Finanzieller u. zeitlicher Aufwand d. Caspase-3-Nachweises.....	62
4.11.3	Auswertung des Caspase-3-Nachweises	62
4.12	Ergebnisse der computerassistierten Samenanalyse	65
4.13	Statistische Auswertung.....	67
5	Diskussion	79
5.1	Diskussion der Fragestellung	79
5.2	Diskussion der Methoden	84
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	94
5.3.1	Anilinblau.....	94
5.3.2	Toluidinblau	96
5.3.3	Chromomycin A3.....	99
5.3.4	Akridinorangetest	102
5.3.5	mfSCSA	106
5.3.6	TUNEL	108
5.3.7	Caspase-3-Aktivität	111
5.4	Fazit für die veterinärmedizinische Praxis	112
6	Zusammenfassung.....	115
7	Summary	117
8	Literaturverzeichnis	119
9	Anhang.....	149
10	Danksagung	159

Abkürzungen

AB	Anilinblau
AK	Antikörper
ALH	amplitude of lateral head displacement
AO	Akridinorange
AOT	Akridinorangetest
BCF	beat-cross frequency
bzw.	beziehungsweise
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
Calcein-ME	Calcein-Acetylmethylester
CASA	Computer assistierte Samenanalyse
CMA3	Chromomycin A3
CTC	Chlortetracyclin
CFDA	Carboxyfluoresceindiacetat
°C	Grad Celsius
DAP	distance average path
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBPS	Dulbecco`s Phosphate buffered saline
DCL	distance curve line
DFI	DNA-Fragmentierungs-Index
DSL	distance straight line
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungen

DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
d-UTP	Deoxyuridine Triphosphate
et al.	et alii
EG	Europäische Gemeinschaft
Eth-D1	Ethidiumhomodimer-1
Fa.	Firma
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FITC-RCA	Fluorescein isothiocyanate-Ricinus communis agglutinin
g	Gramm/ Gravitationsbeschleunigung
HAM'S F-10	Eigenname
JC-1	Eigenname
LIN	Linearität
mfSCSA	modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatinstrukturassay
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
N	Normalität
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
NH	Nebenhoden

Abkürzungen

NS	Nativsamen
OT	Objektträger
PBS	Phosphate buffered saline
pH	potential hydrogenii, Säuregrad
PI	Propidiumjodid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNA	Peanut Agglutinin
PSA	Pisum sativum Agglutinin
PVP	Polyvinylpyrollidone
p-Wert	probability-value/Signifikanzwert
RCA	Ricinus communis agglutinin
ROS	reactive oxygen species
SCD	Spermienchromatindispersion
SCSA	Spermienchromatinstrukturassay
SD	standard deviation
SEK.	Sekunden
SNARF	Seminaphtharhodafuor
STR	straightness
SYBR-14	Eigenname
TB	Toluidinblau
TC	Total Cells
TdT	terminal deoxynucleotidyltransferase
TG	Tiefgefrier

TUNEL	TdT-mediated d-UTP nick end labeling
TRIS	Tris-aminomethan
U	Umdrehung
UV	Ultraviolett
μl	Mikroliter
VACα	Vaskuläres Antikoagulation α
VAP	average path velocity
Var.	Varianz
VCL	curvilinear velocity
vgl.	vergleiche
vs.	versus
VSL	straight-line velocity
VO	Verordnung
WHO	World Health Organization
WOB	wobble
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
YO-PRO 1	Eigename
z. B.	zum Beispiel
Sonderzeichen	
%	Prozent
±	Plusminus
™	Trademark
®	eingetragenes Warenzeichen

€ Euro

1 Einleitung

Die wachsenden Anforderungen an die Diagnostik in der Kleintiermedizin sind die Motivation nach erweiterten Untersuchungsmöglichkeiten zur Fertilitätsprognose beim Rüden zu suchen bzw. diese zu etablieren. In der Spermatologie des Rüden sind eine Reihe von Färbemethoden beschrieben, die teilweise seit Jahrzehnten eingesetzt werden. Bisher gibt es kaum Untersuchungen, bei denen mehrere Methoden an der gleichen Samenprobe verglichen wurden. In der Humanmedizin hat sich die Beurteilung des Spermienchromatin als eine wichtige Methode im Rahmen der spermatologischen Diagnostik bewährt.

Ziel der Untersuchungen ist es daher, die andrologische Diagnostik beim Rüden durch spermatologische Färbeverfahren, die in der Kleintiermedizin noch nicht etabliert sind, zu erweitern und folgende Fragestellung zu beantworten:

- Eignen sich die gewählten Färbemethoden dazu, aufgetautes Tiefgefrier-Sperma zu untersuchen?
- Unterscheiden sich die Ergebnisse der verschiedenen Methoden?
- Zeigen die Ergebnisse zur Chromatinkondensation eine Assoziation zu Parametern der klassischen Spermatologie?
- Unterscheidet sich die Chromatinbeschaffenheit von Nativsamen, Tiefgefrier-Sperma und Spermien aus dem Nebenhoden?
- Sind die Färbemethoden praktikabel für die veterinärmedizinische Praxis?

2 Literatur

2.1 Lichtmikroskopische Färbemethoden für Rüdensperma

2.1.1 Papanicolaou-Shorr

Das von Papanicolaou (1942) entwickelte Verfahren zur Untersuchung von vaginalzytologien wird heute unter anderem zur Beurteilung der Spermienmorphologie verwendet. Es handelt sich um eine Kette verschiedener Arbeitsschritte, bei der Hämatoxylin, Orange G und Polychromfarbstoff EA zum Einsatz kommen. Zunächst wird das Präparat fixiert und dehydriert, danach in absteigender Reihenfolge rehydriert. Mittels Hämatoxylin werden die Zellkerne blau gefärbt, nach mehreren Waschschrinen wird das Zytoplasma mit Orange G und Polychrom EA-50 pink gefärbt. Nach einer Dehydrierung ist der Färbvorgang abgeschlossen. An Hand dieser Färbung kann das Akrosom, die postakrosomale Region, Mittel- und Hauptstück, sowie Residualplasma beurteilt werden (Nieschlag et al., 2012).

Beim fertilen Rüden wurden Normwerte von über 80 % morphologisch unauffälliger Spermien festgestellt (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001), wobei Oettlé (1993) bei Rüdern mit weniger als 60 % morphologisch unauffälliger Spermien eine verminderte Fertilität nachweisen konnten

2.1.2 Eosin

Eosin wird zu den Phtalsäurefarbstoffen gezählt (Baeyer, 1880) und dient der Beurteilung der Spermienvitalität. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip, dass tote Zellen eine für den Farbstoff durchlässige Membran aufweisen, während lebende Zellen diesen ausschließen (Goetz und Goetz, 1938). Darüber hinaus fanden Thomas und Mayer (1949) heraus, dass die Anfärbbarkeit mit Eosin nicht mehr gegeben ist, sobald ein bestimmtes Protein entfernt wurde, was dafür spricht, dass auch intrazelluläre Substanzen die Anfärbbarkeit beeinflussen.

Es wurden unterschiedliche Farbstoffe in Kombination mit verschiedenen Hintergrundfärbungen getestet, so verwandten Lasley et al. (1942) Eosin mit Opalblau als Hintergrundfärbung für Eberspermien. Dott und Foster (1972) ersetzen Opalblau durch Nigrosin.

Dott und Foster (1972) beschrieben eine gleichzeitige Beurteilung der Akrosomenreaktion. Lebende Spermatozoen mit intaktem Akrosom erscheinen weiß vor dunklem Hintergrund, während die Akrosomregion von Zellen mit aktiviertem Akrosom bzw. fehlendem Akrosom vom Nigrosin dunkel gefärbt sind. Später setzten Shaffer und Almquist (1948) Anilinblau als Hintergrundfärbung zusammen mit Eosin B bzw. Eosin Y zur Untersuchung von Bullenspermien ein. Martínez (2004) nennt als mögliches Problem der Eosin-Nigrosinfärbung eine fehlende Fixierung der Zellen. Er befürchtet, dass durch die hypotonen Färbelösungen Artefakte hinsichtlich der Morphologie entstehen können.

Wales (1959) verglich unterschiedliche Färbemethoden zur Vitalitätsbeurteilung beim Mensch und beim Hund. Er fand eine bessere Wiederholbarkeit der Untersuchungen bei der Eosinfärbung im Vergleich zur Kongorotfärbung. Nach Günzel-Apel (1994) liegt der Normwert eosingefärbter Spermien beim Rüden bei 5 bis 10 % und laut Wehrend und Bostedt (2013) sind 80 % lebende Spermien beim Rüden physiologisch, während der untere Referenzwert vitaler Spermien beim Mensch bei 58 % liegt (Nieschlag et al., 2012).

2.1.3 Diff-Quick

Bei dieser Färbemethode handelt es sich um ein kommerziell erhältliches Färbekit, bestehend aus Triarylmethan in Methanol als Fixierlösung. Die luftgetrockneten Ausstrichpräparate werden für fünfzehn Sekunden in diese eingetaucht. Darauf folgt ein zehn sekündiges Färben in eosinophiles Xanthen (Schnellfärbelösung 1) und fünf Sekunden Eintauchen in Färbelösung 2 (basophiles Thiazin). Anschließend werden die Objektträger unter fließendem Leitungswasser abgewaschen und entweder direkt beurteilt oder durch Einbettung zur späteren Auswertung vorbereitet. Kruger et al. (1987) verglichen die Papanicolaou-Färbung sowie die Diff-Quick-Färbemethode zur Beurteilung der Spermienmorphologie humaner Spermatozoen. Es bestand kein

signifikanter Unterschied zwischen den Färbemethoden und zwischen unterschiedlichen Untersuchern. Per Diff-Quick gefärbte Spermatozoen weisen ein Akrosom in hell-lila, die postakrosomale Region, das Mittelstück und der Schwanz sind dunkel-lila gefärbt.

2.1.4 Trypanblau und Giemsa

Die Kombination dieser beiden Farbstoffe dient ebenfalls der Beurteilung der Vitalität sowie der Akrosomreaktion. Didion et al. (1989) entwickelten ein kombiniertes Färbeverfahren zur Detektion toter Samenzellen bei gleichzeitigem Erfassen des Akrosomstatus. Tote Spermien weisen einen dunkelblauen Spermienkopf auf, wobei die akrosomale Region bei intaktem Akrosom dunkelrosa bzw. lila erscheint. Im Gegensatz dazu zeigen akrosomreaktive Samenzellen eine weiße bzw. grauweiße Akrosomregion. Lebende Zellen ohne Akrosom sind vollständig weiß, mit intaktem Akrosom hell rosa bzw. lila.

2.1.5 Spermac

Diese Methode, welche aus drei Färbelösungen zusammengesetzt ist, dient der morphologischen Beurteilung sowie der Bestimmung des Akrosomstatus, wobei sich das Akrosom grün darstellt. Der Spermienkern ist rot gefärbt, während der Spermien Schwanz grün und das Äquatorialesegment hellgrün gefärbt sind (Hoffmann, 2003).

2.1.6 Triple-Stain

Kawakami et al. (1993) untersuchten eine Dreifachfärbung aus Trypanblau, Bengalrosa und Bismarckbraun zur Vitalitätsbeurteilung und gleichzeitiger Akrosombeurteilung. Es wurde das von Talbot und Chacon (1981) entwickelten Protokoll für humane Spermatozoen angewendet. Zunächst wird die Samenprobe mit 2 % Trypanblau 1:1 verdünnt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Probe für fünf Minuten bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und

30 Minuten mit 3 %igem Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer fixiert. Nach erneutem Zentrifugieren wird das Pellet in DPBS gelöst und ein Tropfen auf ein Objektträger gegeben und luftgetrocknet. Es folgt eine Färbung für fünf Minuten bei 37 °C in 0,8 % Bismarckbraun Y in deionisiertem Wasser. Nach Abspülen mit deionisiertem Wasser erfolgt eine 30-minütige Färbung in 0,8 %iger Bengalrosalösung in 0,1 M Trispuffer mit pH 5,3. Anschließend werden die Proben mit Permount eingedeckt und beurteilt. Tote Spermien sind in der postakrosomalen Region dunkelblau gefärbt, während lebende Zellen sich braun darstellen. Zusätzlich sind intakte Akrosomen rosa gefärbt und die Akrosomregion von aktivierten Spermien weiß. Die Färbung wurde mit der fluoreszenzmikroskopischen FITC-RCA Färbung verglichen. Dabei fanden die Autoren eine hohe Korrelation zwischen den Färbemethoden bezüglich der Vitalität und des Akrosomstatus. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Methode konnte eine kürzere Anfertigungszeit sowie eine bessere Beurteilbarkeit aufgrund intensiverer Färbung nachgewiesen werden.

2.1.7 Formolcitrat-Flüssigfixierung

Diese Färbelösung besteht aus einer Kombination aus Bengalrosa als Färbemittel zur Beurteilung des Akrosomstatus und Natriumcitrat und Formaldehyd zur gleichzeitigen Fixierung. Es werden nicht wie bei den übrigen Färbungen Ausstriche angefertigt und gefärbt, sondern die Spermien suspension in einem Verhältnis 10:30 mit der Formolcitratlösung gemischt und anschließend ausgestrichen. Nach 10 - 30 minütiger Inkubation erfolgt die Beurteilung des Akrosom, welches sich abgelöst, in Ablösung oder intakt darstellen kann (Hoffmann, 2003).

2.1.8 Toluidinblau

Toluidinblau ist ein metachromatischer Farbstoff und dient der Sichtbarmachung der Chromatinkondensation. Dabei werden gut kondensierte Spermien hellblau und unreife Spermien violett gefärbt. Mello (1982) untersuchte die Anfärbbarkeit von Bullenspermien mit Toluidinblau nach vorheriger Säurehydrolyse und schlussfolgerte

aus der erfolgten Metachromasie eine abnormale Chromatinkondensation, welche mit der Infertilität beim Bullen korrelierte.

Erenpreiss et al. (2004) verglichen die Toluidinblaufärbung mit anderen Verfahren zur Beurteilung der Chromatininstabilität und kamen zu dem Entschluss, dass der Toluidinblautest aufgrund seiner Korrelation mit anderen Spermien-DNA-Tests und Chromatinstrukturfärbungen eine gute Alternative für diese darstellt, vor allem wenn kein Equipment zur flowzytometrischen Auswertung zur Verfügung steht .

Die Anfärbarkeit mit Toluidinblau nimmt mit zunehmender Spermienreifung ab und korreliert dabei mit anderen Methoden zur Beurteilung der Chromatinkondensation. Es werden durch den Toluidinblautest nur starke DNA-Abnormalitäten entlarvt, da eine Metachromasie erst ab einem bestimmten Grad an Chromatininstabilität erfolgt (Erenpreiss et al., 2004). Aufgrund höherer Werte an toluidinblaupositiven Spermien im Vergleich zum SCSA und TUNEL-Test schließen die Autoren auf die Detektion von DNA-Strangbrüchen einerseits und Chromatinveränderungen andererseits. Für Rüdensperma liegen bisher keine Untersuchungen zur Färbung mit Toluidinblau vor.

2.1.9 Anilinblau

Anilinblau, das auch unter anderem auch unter den Synonymen Methylblau oder Wasserblau bekannt ist, wurde zunächst als Färbemethode in der Textilindustrie eingesetzt, später in der Histologie (Ehrlich, 1877).

Terquem und Dadoune (1983) entwickelten ein Protokoll zur Färbung humaner Spermatozoen mit Anilinblau, woraufhin von Dadoune et al. (1988) eine Studie durchgeführt wurde, in der die Tauglichkeit der Anilinblaufärbung als Samenqualitätsparameter durchgeführt wurde. Es wurde ein Zusammenhang sowohl mit der Fruchtbarkeit als auch mit klassischen Samenparametern gefunden.

Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass Anilinblau die Lysinreste der Histone anfärbt, während protaminierte Spermien ungefärbt bleiben und somit eine verminderte Kondensation angezeigt wird. Gut kondensierte Spermien werden hellblau gefärbt, anilinblau-positive Spermien zeigen eine schlechte

Chromatinkondensation und nehmen eine dunkelblaue Farbe an (Terquem und Dadoune, 1983; Bianchi et al., 1993).

In der veterinärmedizinischen Andrologie beschränkte sich der Einsatz von Anilinblau zunächst als Hintergrundfärbung in Kombination mit Eosin zur Vitalitätsbeurteilung von Spermien (Shaffer und Almquist, 1948). Hingst et al. (1995) untersuchten Chromatinkondensation feliner Spermatozoen aus Nebenhodenschwanz, -körper und -kopf mittels Anilinblau und Akridinorangefärbung. Es wurden Hoden von 57 Tieren im Alter von 9 - 21 Monaten nach Kastration untersucht. Die Autoren entdeckten mit dieser Studie eine Zunahme der chromatinstabilen, d. h. der in-vitro-säureresistenten Spermatozoen während der Nebenhodenreifung. Dabei betrachteten sie die Anilinblaufärbung als unabhängigen Fertilitätsparameter, da sie zwar Korrelationen mit der Morphologie, nicht aber mit den Motilitätsparametern fanden.

Auch Vieytes et al. (2008) fanden beim Vergleich der Abkalberaten verschiedener Bullen und deren Anteil anilinblaupositiver Spermien nur geringe Korrelationen mit klassischen Samenparametern. Dagegen ermittelten Khalifa et al. (2008) bei ihren Untersuchungen der Chromatinstabilität beim Bullen keine Zusammenhang zur Rasse oder Anzahl an Ejakulationen, während eine Korrelation zur Vitalität, Kopfanomalien und dem Vorhandensein von Zytoplasmotropfen bestand.

Für canine Spermien liegen bisher keine Untersuchungen zur Anfärbbarkeit mit Anilinblau bezüglich Chromatinstabilität in Bezug zur Fertilität vor.

2.1.10 Spermienchromatindispersionstest

Der Spermienchromatindispersionstest, der von Fernández et al. (2003) für humane Spermien getestet wurde, ist ein einfacher und kostengünstiger Test zur Detektion von DNA-Fragmentierungen. Es wird ein kommerzielles Kit verwendet (Halosperm®), bei dem Spermienzellen in Agarosegel eingebettet und lysierender Lösung ausgesetzt werden, wodurch Kernproteine entfernt werden. Nicht fragmentierte DNA bildet Schleifen um den Spermienkopf, was zu einer charakteristischen Ringbildung führt, welche lichtmikroskopisch zu beobachten ist. Die Autoren bewiesen, dass der

SCD-Test DNA-Fragmentierungen anzeigt, indem eine gleichzeitige In Situ Hybridisierung zur Detektion von DNA-Strangbrüchen mittels Fluoreszenz durchgeführt wurde. Evenson und Wixon (2005) verglichen den Halosperm-Test mit dem Spermienchromatinstrukturassay (SCSA) und kamen zu dem Ergebnis, dass der Test zwar DNA-Strangbrüche anzeigt, aber den flowzytometrischen Untersuchungen unterlegen ist. Choi et al. (2011) untersuchten den Fragmentierungsindex caniner Spermien-DNA mithilfe des SCD-Tests (Halosperm®, Halotech DNA SL, Spain) und fanden Korrelationen mit den Ergebnissen aus der computerassistierten Samenanalyse sowie mit der Fertilität.

2.2 Fluoreszenzmikroskopische Färbemethoden

Neben den lichtmikroskopischen Färbemethoden wurden zunehmend fluoreszenzmikroskopische Methoden etabliert, wobei es sich hierbei größtenteils um Methoden zur Beurteilung der Spermienfunktionalität handelt. Als Vorteil von Fluoreszenzfarbstoffen nennen Rijsselaere et al. (2005) die mögliche Auswertung per Flowzytometer, wodurch eine höhere Zahl an Zellen in kürzerer Zeit untersucht werden kann, wodurch sich die Genauigkeit erhöht.

Andererseits bewerten Niżański et al. (2012) die hohen Kosten von Laborausstattung und der Fluoreszenzstoffe als negativ und sehen dies als Erklärung dafür, dass die Fluoreszenzmikroskopie bzw. Flowzytometrie in der veterinärmedizinischen Praxis nicht etabliert ist.

2.2.1 Propidium Iodid / Ethidiumhomodimer

Bei der Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid handelt es sich um eine Methode zur Viabilitätsbeurteilung von Spermien. Der Farbstoff dringt in tote Zellen ein und interagiert mit deren DNA, was zu einer roten Fluoreszenzfärbung führt. Propidiumiodid findet vielfach Verwendung als Gegenfärbung für andere Fluoreszenzfärbungen (Garner et al. 1986).

Ethidiumhomodimer, ein stark positiv geladener Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Molekülmasse, ist impermeable für lebende Zellen und färbt Nukleinsäuren in zerstörten Zellen rot. Althouse und Hopkins (1995) untersuchten die Kombination aus Calcein-Acetylmethylester (Calcein-ME) und Ethidiumhomodimer (ETHD-1) zur Viabilitätsbeurteilung porciner Spermatozoen. Calcein ist gebunden an Acetylmethylester nicht fluoreszierend, aber lipophil und gelangt dadurch ins Zellinnere, wo es in das nicht membranpermeable, grün fluoreszierende Calcein umgebaut wird. Sirivaidyapong et al. (2000) untersuchten den Einfluss verschiedener Verdüner auf die Akrosomenreaktion caniner Spermatozoen. Die Viabilitätsbestimmung erfolgte hier anhand des genannten kombinierten Verfahrens aus Calcein-ME und EthD-1.

2.2.2 Carboxyfluorescein und Kombinationen

Garner et al. (1986) untersuchten Samenzellen vom Bullen, Hengst, Eber, Rüde und Mann mittels Carboxyfluorescein Diacetat (CFDA) und Propidiumiodid (PI). Carboxyfluorescein Diacetat ist membranpermeable und wird durch intrazelluläre Esterasen zu grün fluoreszierendem 6-Carboxydiazetat umgewandelt, welches membranimpermeabel ist. Es färbt somit lebende Zellen grün. Propidiumiodid wurde wie oben genannt als Gegenfärbung toter Zellen verwendet, welche rot dargestellt werden. Eine weitere Subpopulation stellen rotgefärbte tote Samenzellen dar, deren erhaltenes Akrosom grün gefärbt ist. Somit ist eine Beurteilung der Vitalität einerseits sowie der Funktionalität möglich.

Eine weitere Methode zur Vitalitätsbeurteilung von Spermien stellt die Färbung mit dem Farbstoff Carboxy-Seminaphthorhodfluor (Carboxy-SNARF) dar. Dieser färbt lebende Zellen orange, in dem es als pH-Indikator wirkt (Rijsselaere, 2005). Peña et al. (1999) kombinierten diesen Farbstoff mit Propidiumiodid und FITC-markiertem PSA zur Beurteilung der Auswirkungen zweier unterschiedliche Einfrier- und Auftauprotokolle auf canine Spermatozoen, wobei lebende Zellen mit intaktem Akrosom als SNARF+, tote Zellen mit intaktem Akrosom als PI+ und tote Spermien mit zerstörtem Akrosom als PI+/PSA+ bezeichnet wurden. Es erfolgte sowohl eine

flowzytometrische als auch eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung, welche korrelierten.

2.2.3 Höchst 33258

Hierbei handelt es sich um eine Färbemethode zur Darstellung der Vitalität von Spermien. Höchst 33258, ein Bisbenzimidazolderivat, ähnelt in seinem Färbeverhalten DAPI und interagiert spezifisch mit Adenin-Thymin-Basenpaaren der DNA (Brunk et al., 1979), kann aber nur die Membranen toter Zellen durchdringen (Cross et al., 1986). In einer Untersuchung zum Kapazitationsstatus von Rüdenspermien (Chlortetracyclin-Färbung) sowie zur gleichzeitigen Vitalitätsbeurteilung verglichen Hewitt und England (1998) die Eosin/Nigrosin-Färbung mit den Ergebnissen der Höchst 33258-Färbung. Zunächst wurden die Samenproben aliquotiert und die Samenzellen einer Portion in einem 60 °C Wasserbad abgetötet. Anschließend wurden die unbehandelten Proben mit den geschädigten Spermien gemischt, sodass sie definierte Anteile toter Spermien enthielten. Diese wurden mit der Eosin/Nigrosin-Methode untersucht und mit der Höchst 33258-Färbung verglichen. Dabei wurde die Konzentration des Farbstoffes solange angepasst, bis sich die Ergebnisse der zwei Methoden deckten. Die Viabilitätsbeurteilung erfolgt mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 330 - 380 nm Anregungs- und 420 nm Barrierefilter, wobei tote Spermatozoen hellblau erscheinen.

2.2.4.SYBR-14 und Kombinationen

Beim Einsatz dieses Farbstoffes handelt es sich um eine Methode zur Detektion von Spermien mit unversehrter Membranintegrität (Garner et al., 1994). Bei einer Anregung von 488 nm fluoreszieren Membranen lebender Zellen grün. Garner et al. (1994) testeten als erste die Brauchbarkeit der SYBR-14 Färbung in Kombination mit Propidiumiodid zur Viabilitätsbeurteilung boviner Spermien und untersuchten gleichzeitig, ob die Methode auch für tiefgefrorene Proben mit einem Verdünner auf Milchbasis möglich ist. Nach erfolgreicher Erprobung führten sie weitere Versuche mit Spermatozoen von Bulle, Eber, Ziegenbock, Maus, Kaninchen und Mann durch,

welche sowohl flowzytometrisch als auch fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet wurden (Garner und Johnson, 1995). Cheuquemán et al. (2012) untersuchten unterschiedliche flowzytometrische Funktionsparameter von sechs verschiedenen caninen Samenproben, darunter die Viabilität anhand der SYBR-14/PI-Färbung. Zusammengefasst kamen die Autoren zu dem Ergebnis objektive Daten zur Funktion und Struktur von Hundesperma mit guter Samenqualität gewonnen zu haben und in der Hundezucht gezielt auf diese zu selektieren und als Grundlage für zukünftige Evaluierungen in der caninen Reproduktionsmedizin zu nutzen. Die Autoren weisen dabei darauf hin, dass fluoreszenzmikroskopische Auswertungen aufgrund der geringeren Zahl ausgewerteter Spermien im Vergleich zur Flowzytometrie ungenau scheinen, was sich in diesem Fall darin zeigte, dass eine starke Diskrepanz zwischen Gesamtmotilität, welche mikroskopisch erfasst wurde, und Viabilität, welche flowzytometrisch mittels SYBR-14/PI-Färbung bestimmt wurde, bestand.

2.2.5 Rhodamine 123

Rhodamine 123 detektiert eine veränderte Anzahl von Mitochondrien in der Zelle und ein verändertes Membranpotential der Mitochondrien, was indirekt Stoffwechselprozesse in der Zelle anzeigt (Evenson et al., 1982). In Kombination mit einer Gegenfärbung mittels Ethidium-Bromid, welches aus lebenden Zellen ausgeschlossen wird, kann somit eine Unterscheidung in lebende und tote Samenzellen vorgenommen werden. Lebende Zellen fluoreszieren grün im Mittelteil, während tote Zellen rot gefärbt sind. Strzezek und Fraser (2009) untersuchten die Auswirkungen unterschiedlicher Osmolaritäten auf Rüdensperma und nutzen hierzu unter anderem die Rhodamine 123-Färbung zur Detektion der Mitochondrienfunktion. Dabei wurde das von Fraser et al. (2002) verwendete Protokoll für Eberspermien verwandt. Zunächst wurde eine Stammlösung aus 5 mg/ml in DMSO hergestellt. Die Gebrauchslösung besteht aus 30 µl dieser Rhodaminstammlösung und 120 µl DMSO. Ein Milliliter der Samenprobe mit $30 \cdot 10^6$ Spermien/ml wurde in ein Eppendorfgefäß gegeben und 3 µl der Rhodaminlösung, sowie 10 µl einer 0,5 mg/ml Propidiumjodidlösung in PBS zugegeben.

Nach 15 Minuten Inkubation bei 37 °C wird die Probe fünf Minuten bei 500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Abschließend wurden 5 µl der Suspension auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt und ausgewertet.

2.2.6 5,5,6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide (JC-1)

JC-1, auch als 1H-Benzimidazolium bezeichnet, zählt zu den Carbocyaninen und wird in der Andrologie zur Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials verwendet (Sabnis, 2010). Der Farbstoff lagert sich an Mitochondrien an und fluoresziert als Monomer grün. Durch Aggregatbildung kommt es bei Zellen mit gesteigertem mitochondrialen Membranpotential zu einem Farbshift nach orange (Cossarizza et al., 1993). Volpe et al. (2009) setzten erstmals JC-1 zur Bewertung des inneren mitochondrialen Membranpotentials bei caninen Spermatozoen ein und schätzten es als wertvolles Mittel zur weiteren Untersuchung von Veränderungen, die mit Unfruchtbarkeit in Verbindung stehen. Auch dieser Fluoreszenzfarbstoff findet vorwiegend in der Flowzytometrie Verwendung.

2.2.7 Akridinorange

Der Fluoreszenzfarbstoff Akridinorange bindet an Einzelstrang-DNA als Polymer, was zu einer roten Fluoreszenz führt, während es an Doppelstrang-DNA als Monomer interagiert, was in einer grünen Fluoreszenz resultiert (Rigler et al., 1969; Kosower et al., 1992). Es wird davon ausgegangen, dass chromatininstabile DNA empfindlicher auf Hitze- (Darzynkiewicz et al., 1975; Evenson et al., 1980) und Säuredenaturierung (Darzynkiewicz et al., 1977) in situ reagiert als stabiles Chromatin. Deshalb wird die Färbung mittels Akridinorange dazu genutzt, die Chromatinkondensation einerseits flowzytometrisch, als auch per Fluoreszenzmikroskop zu beurteilen.

Evenson et al. (1980) entwickelten den Spermienchromatinstrukturassay (SCSA), eine flowzytometrische Methode zur Beurteilung der Chromatinintegrität für humane, bovine und murine Spermatozoen und verglichen diese später mit dem

fluoreszenzmikroskopischen Akridinorangetest nach Tejada et al. (1984). Die Autoren nennen eine Vielzahl von Vorteilen des SCSA, z.B., dass in weniger als 5 Minuten 500 - 10000 Spermien unter objektiven Bedingungen untersucht werden können, wobei eine sehr hohe Wiederholbarkeit erzielt und ein Schwellenwert für eine Fertilitätsprognose erfasst werden konnte (Evenson et al., 1999). Auch für bovine Spermatozoen fanden Ballachey et al. (1987) einen Zusammenhang zwischen Ergebnissen aus dem SCSA und der Fertilität.

Garcia-Macias et al. (2006) untersuchten sowohl ejakulierte Samenzellen als auch Spermatozoen aus der Nebenhodenpassage von Hund, Rothirsch und Schafbock mittels SCSA. Beim Hund fanden sich im Nebenhodenkopf mehr chromatininstabile Spermien als im Körper und Schwanz. Zwischen Spermien des Nebenhodenkörpers und des Nebenhodenschwanzes existierten keine Unterschiede, genau wie zwischen Spermien des Nebenhodenschwanzes und den ejakulierten Spermien.

Da die Flowzytometrie trotz der genannten Vorteile ein sehr teures Verfahren ist, wurde immer wieder versucht, den fluoreszenzmikroskopischen Akridinorangetest zu optimieren bzw. zu standardisieren. So verglich Acevedo (2001) ein modifiziertes fluoreszenzmikroskopisches Verfahren (mfSCSA) für den Bullen mit den SCSA. Es wurde DTT als Stabilisator der Thiolgruppen eingesetzt, da die Autorin nach 10 Minuten einen kritischen Punkt mit einem Farbwechsel von rot nach grün beobachtete und eine Reoxidation der Thiolgruppen vermutet wurde. Die Ergebnisse des SCSA und des fluoreszenzmikroskopischen Verfahrens korrelierten miteinander, sodass die gleichzeitige Beurteilung der Spermienmorphologie als Vorteil dieses Verfahrens zu nennen war. Biege (2004) übertrug das von Acevedo (2001) entwickelte Verfahren auf canine Spermatozoen, welches mittels Fluoreszenzmikroskop und Computerprogramm ausgewertet wurde. Es wurden 42 Rüden unterschiedlichen Alters und verschiedener Rassen untersucht und sowohl Nativsperma als auch schockgefrorenes und tiefgekühltes Sperma untersucht. In den methodischen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Akridinorange-Färbung auch vier Wochen nach Färbung bei gekühlter und lichtgeschützter Aufbewahrung noch ohne signifikante Unterschiede auswertbar ist. Obwohl eine hohe Reproduzierbarkeit festgestellt wurde, sind laut der Autorin noch weitere

Untersuchungen zum Zusammenhang mit der Fertilität, sowie die Schaffung repräsentativer Normbereiche für den Rüden notwendig.

2.2.8 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick-end labeling assay (TUNEL)

Die TUNEL-Färbung dient dem Nachweis von DNA-Strangbrüchen, wobei das Enzym Terminale deoxynucleotidyl Transferase (TdT) an die freien OH'-Enden mit Fluoreszenzfarbstoff beladene Nukleotide (d-UTP) anlagert und dadurch fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Nachdem Gorczyca et al. (1993) die Anwendbarkeit des TUNEL-Tests für den Nachweis von Apoptose bei menschlichen Spermien erprobt haben, fand dieser Test Anwendung in zahlreichen Studien und wurde als Fertilitätsparameter etabliert (Chohan et al. 2006, Lopes et al. 1998).

Für den Hund gibt es bisher wenige Studien, in denen der TUNEL-Test angewendet wurde und hauptsächlich flowzytometrische Auswertungen stattfanden.

Lange-Consiligo et al. (2010) untersuchten das Ejakulat von 11 Rüden drei italienischer Hunderassen (Cirneco dell' Etna, Piccolo Levriero Italiano und Segugio Maremmano) mittels TUNEL Assay und morphologisch. Es sollte geklärt werden wie sich der Chromatinstatus bei klinisch fertilen Rüden darstellt und ob morphologische Kopfveränderungen von der Rasse abhängen und ob sie in Zusammenhang mit der Chromatinstruktur stehen. Hier fanden die Autoren rassenabhängige Unterschiede in der Kopfmorphologie und einen Zusammenhang zwischen einer elliptischen Kopfform und einem erhöhten Anteil an DNA-Fragmentierungen. Zudem wurde ein Bezug zur Fertilität hergestellt, weil bei einem Rüden ein erhöhter Prozentsatz von DNA-Fragmentationen gefunden wurde, der auch eine verminderte Fertilität aufwies, was sich in einer kleinen Wurfgröße (1 Welpen) zeigte.

Sánchez et al. (2011) untersuchten die DNA-Fragmentierung von Hundespermien nach Vitrifikation und den Einfluss unterschiedlicher Gefriermedien, wobei die Auswertung fluoreszenzmikroskopisch erfolgte. In dieser Studie wurde im Mittel $5,6 \pm 0,6$ % DNA-Fragmentationen in TG-Sperma einer Gruppe von Kontrollrüden

gefunden, wobei dieser Anteil mit dem Zusatz von Sucrose auf $2,8 \pm 0,5$ % abgesenkt werden konnte.

2.2.9 Annexin V

Ein morphologisches Zeichen der Apoptose ist die Externalisierung des Phospholipides Phosphatidylserin von der inneren Plasmamembran nach außen (Meurer und Wolf, 2007), welches durch die Bindung des Calcium-abhängigen Protein Annexin V, auch genannt Vaskuläres Antikoagulant α (VACA α), angezeigt werden kann (Andree et al., 1990; Bratton et al., 1997). Diese Bindung wird durch die Markierung mittels Fluorochromen wie FITC (grüne Fluoreszenz) oder Alexa Fluor 568 (rote Fluoreszenz) sichtbar gemacht (Kim et al., 2010) und häufig in Kombination mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen zur Viabilitätsbeurteilung eingesetzt, wodurch eine Unterscheidung lebender, früh und spät apoptotischer, sowie nekrotischer Zellen möglich ist (Mota und Ramalho-Santos, 2006). Grundsätzlich kann diese Methode fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden, wobei der flowzytometrische Einsatz häufiger gefunden wird.

2.2.10 YO-PRO 1

Der zu den Cyaninen zählende Farbstoff YO-PRO 1, auch genannt Quinolinium oder Oxazole yellow (Sabnis, 2010), dient der Detektion apoptotischer Zellen, wobei auch eine Einteilung in unterschiedliche Apoptosestadien möglich ist. Dies wurde getestet, indem Idziorek et al. (1995) bei Immunzellen eine Apoptose induzierten und die YO-PRO-1-Färbung mit anderen Methoden verglichen. Der Farbstoff wird vorwiegend in der Flowzytometrie eingesetzt, aber der fluoreszenzmikroskopische Einsatz ist ebenfalls möglich. Núñez-Martínez et al. (2007) benutzten ein von Peña et al. (2005) für Eberspermien konzipiertes Verfahren, eine Dreifachfärbung aus SNARF, EthD und YO-PRO-1 und modifizierten es für den Rüden zu einer Kombination aus YO-PRO-1 und EthD. Es existieren vier mögliche Subpopulationen: Lebende Zellen ohne Membranveränderungen sind ungefärbt, während frühapoptotische Zellen grün fluoreszieren. Zellen, die sich im frühen nekrotischen Stadium befinden, fluoreszieren

sowohl grün (YO-PRO-1) als auch rot (EthD), während spätnekrotische Spermien rot fluoreszieren.

2.2.11 Lektine

Diese Methode dient der Darstellung des Akrosomstatus. Hierbei werden unterschiedliche Lektine mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert und eine Bindung somit sichtbar gemacht. Die Akrosomregion akrosom-intakter Spermien fluoresziert grün, während die restlichen Spermien keine Fluoreszenz zeigen (Nieschlag et al. 2012).

Es werden unterschiedliche Lektine verwendet, z. B. Peanut Agglutinin PNA (Agglutinin von *Arachis hypogea*), welches spezifisch an den Glykokonjugaten der äußeren Akrosomenmembran bindet, PSA (*Pisum sativum* Agglutinin), welches mit Saccharidgruppen des Glycoproteins Pro-Akrosins interagiert oder RCA (*Ricinus communis* agglutinin) (Rijsselaere et al., 2005). Kawakami et al. (1993) setzten die FITC-RCA beim Rüden ein und verglichen es mit der lichtmikroskopischen Triple-Stain-Methode. Beide korrelierten hinsichtlich des Anteils lebender und akrosomaktiver Spermien. Die Methode ist zum Einsatz mit dem Fluoreszenzmikroskop oder dem Flowzytometer geeignet, allerdings beschreiben Peña et al. (1999), dass die flowzytometrische Auswertung nur für gewaschenes frisches Sperma möglich ist, da der Flowzytometer bei verdünnten Spermien Probleme mit der richtigen Identifikation ungefärbter, lebender Zellen hatte. Vom Flowzytometer wurden Bestandteile des Eidotter-Verdünners als ungefärbte Spermien erfasst.

2.2.12 Chlortetracyclin

Mittels der Chlortetracyclin-Färbemethode (CTC) lässt sich sowohl der Kapazitationsstatus von Spermien als auch die Akrosomreaktion bestimmen.

CTC bindet an membran-assoziierte Kationen, genauer an Calciumionen. Beim Eindringen in die Samenzelle bindet CTC freies Calcium und die Calcium-CTC-

Komplexe fluoreszieren und binden an hydrophobe Stellen der Zellmembran. Fluoresziert der ganze Spermienkopf, handelt es sich um eine unkapazitierte, akrosom-intakte Zelle. Eine dunkle postakrosomale Region mit leuchtendem Akrosom repräsentiert den kapazitierten und akrosom intakten Zustand. Fluoresziert dagegen nur die äquatoriale Region handelt es sich um eine Samenzelle nach Kapazitation mit reaktivem Akrosom (Guérin et al., 1999). Wird CTC mit Gegenfärbungen wie Höchst 33258 oder Promidiumjodid kombiniert, kann gleichzeitig die Viabilität bestimmt werden (Hewitt und England, 1998). Während diese Methode von Fraser et al. (1995) für Bullenspermien etabliert wurde, testeten Hewitt und England (1998) das Verfahren für Rüdenspermien in Kombination mit Höchst 33258.

Zunächst wird eine Höchst-Stammlösung aus 10 mg Höchst 33258 in 100 µl destilliertem Wasser hergestellt, mit Alufolie ummantelt und bei 4 °C aufbewahrt. Die Gebrauchslösung besteht aus 1 µl Stammlösung und 10 ml proteinfreiem Medium und wird ebenfalls bei 4 °C aufbewahrt. Aus 2 g Polyvinylpyrrolidone (PVP) wird mit 100 ml phosphate buffered saline (PBS) eine 2 %ige PVP-Lösung hergestellt. Zusätzlich wird aus 12,11 g TRIS in 100 ml destilliertem Wasser ein Fixationspuffer hergestellt. Dieser wird 1:1 mit 25 % Glutaraldehyde zur Herstellung einer Fixierungslösung mit pH 7,4 vermischt. Nach Herstellung und Filtration eines CTC-Puffers aus 240 mg TRIS und 760 mg NaCl gelöst in 100 ml destilliertem Wasser, wird die CTC-Lösung aus 2 mg CTC Puffer hergestellt.

Die Samenproben werden zunächst mit einem proteinfreien Gewebemedium 3:1 verdünnt, dann 20 Minuten lang bei 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet zu einer Konzentration von $5 - 10 \cdot 10^6$ Spermien verdünnt. 396 µl der Samenprobe werden mit 4 µl Höchst 33258 für 2 Minuten inkubiert. Anschließend werden 4 ml der PVP-Lösung zugegeben und es erfolgt eine weitere Zentrifugation für 5 Minuten bei 900 g. Ein weiteres Mal wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 45 µl Earlsmedium mit BSA resuspendiert. 45 µl der CTC-Lösung und 8 µl der Fixierlösung werden zu der Samenprobe gegeben, der pH auf 7,8 eingestellt und ein Tropfen auf einem Objektträger ausgestrichen und mit einem Tropfen Vectashield versetzt.

Die Viabilitätsbeurteilung erfolgt mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 330 – 380 nm Anregungs- und 420 nm Barrierefilter, wobei tote Spermatozoen hellblau erscheinen.

Zur Beurteilung der CTC-Färbung werden nur die lebenden Zellen bei einer Wellenlänge von 400 - 440 nm Exzitation und 470 nm Emission beurteilt.

Die Autoren fanden vergleichbare Ergebnisse mit anderen Säugetierspermien, weswegen die bestehende Klassifizierung übernommen wurde. „F“ bezeichnet unkapazitierte, akrosom intakte Zellen, „B“: kapazitiert, akrosom-intakt und „AR“ sind kapazitiert und akrosomreaktiv.

2.2.13 Merocyanin 540

Merocyanin 540 wird zur flowzytometrischen Detektion des Kapazitationsstatus benutzt und beruht auf dem Prinzip, dass der hydrophobe Farbstoff sich an Membranen mit veränderter Lipidzusammensetzung, wie es bei der Kapazitation der Fall ist, anreichert (Williamson et al., 1983). Rathi et al. (2001) verglichen diese Methode mit der Chlortetracyclin-färbung und stellten fest, dass Merocyanin 540 Kapazitationen beim Hengst früher darstellt und zu dem genauer ist. Auch beim Rüden kamen Steckler et al. (2015) zu dem Entschluss, dass mittels Merocyanin-540-Flowzytometrie erfasste Membrandestabilisierungsprozesse im Zuge der Kapazitation früher erfasst werden als bei vergleichbaren Methoden (Tyrosinphosphorylierung). Nizański et al. (2012) sehen die Merocyanin 540-Färbung und die damit gewonnene Chance einer Früherkennung der Kapazitation als gute Möglichkeit, Spermien mit verminderter Lebensdauer und verminderter Befruchtungsfähigkeit v.a. bei aufgetauten Samenproben zu erkennen. Bisher findet der Farbstoff jedoch keine Verwendung in der fluoreszenzmikroskopischen veterinärmedizinischen Andrologie.

2.2.13 Chromomycin A 3

Bei Chromomycin A3 handelt es sich um ein Aureolsäure-Analogon, das aus dem Pilz *Streptomyces griseus* 7 isoliert wird und als Chemotherapeutikum gegen

Tumoren eingesetzt wird (Slavik und Carter., 1975) und zunächst seine Bedeutung in seiner bakteriostatischen Wirkung auf gram negative Bakterien fand (Gause, 1965).

Chromomycin A3 bindet an Guanin-/Cytosinreiche Stellen der DNA und konkurriert mit Protaminen um die Bindungsstelle (Ward et al., 1965), weshalb dort eine Fluoreszenzfärbung erfolgt, wo eine unvollständige Protamination in der Spermatogenese stattgefunden hat und damit eine verminderte Chromatinkondensation vorliegt.

Bianchi et al. (1993) untersuchten den Zusammenhang der Anfärbbarkeit muriner und humaner Spermatozoen mit Chromomycin A3 und dem Gehalt an Protamin und zusätzlich die Detektion von DNA-Strangbrüchen in Form der In-Situ-Nick-Translation in Abhängigkeit von der Protamination. Murine Spermatozoen und humane künstlich protamierte Spermatozoen zeigten eine verminderte Anfärbbarkeit mit Chromomycin zum einen und zum andern eine höhere Resistenz gegen DNA-Strangbrüche. Es wurde gefolgert, dass murines Spermienchromatin einen höheren Anteil an Protamin aufweist und deshalb stabiler kondensiert ist als humanes.

Somit wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Grad der Protamination und dem wahrscheinlichen Kondensationsgrades hergestellt. Daraus resultierte für die Autoren der mögliche Nutzen der Chromomycin A3-Färbung für die Detektion des Protaminationsgrades von Spermatozoen und somit für eine gute Chromatinkondensation.

In der Humanmedizin ist der Test zur Beurteilung der Chromatinkondensation bzw. Chromatinqualität etabliert (Bianchi et al., 1996, Kazerooni et al., 2009, Manochantr et al., 2012) und die Chromomycinfärbung hat sich zu einem guten Indikator für Fertilitätsstörungen entwickelt (Iranpour et al., 2000), da der Anteil chromomycinpositiver Spermien negativ mit der Fruchtbarkeit korreliert.

Simões et al. (2009) untersuchten die Anfärbbarkeit boviner Spermatozoen mit CMA3 und kamen zu dem Entschluss, dass die CMA3 Färbung ein guter Indikator für Protaminmangel beim Bullen ist. Die Autoren fanden keine deutlichen Unterschiede in der CMA3 Auswertung verschiedener Bullen. Lediglich 2 von 14 Bullen zeigten erhöhte CMA3 Werte, wobei alle unter 0,25 % CMA3-positiver Spermien lagen.

Zum jetzigen Zeitpunkt sind keine Untersuchungen zur Anfärbarkeit caniner Spermatozoen mit Chromomycin A3 bekannt. Warntjen (2012) untersuchte die Protamination unterschiedlicher Spezies. Es wurden Samenproben von Kaninchen, Schwein, Ziege, Schaf, Ratte und Rhesusaffe untersucht, wobei alle Tiere signifikant geringere Anteile CMA3 positiver Spermien aufwiesen als der Mensch. Humane Spermatozoen wiesen im Mittel 58,77 % auf, Rhesusaffen 1,35 % Schweine 0,52 %, Schafe 0,24 %, Ziegen 0,13 %, Kaninchen 0,85 % und Ratten 0,19 %. Diese Untersuchung zeigt, dass die humanen Spermien mit einem Durchschnitt von $58,77 \pm 19,48$ % die höchste und die Spermien der Ziege mit $0,13 \pm 0,13$ % die niedrigste Fehlerrate bei der Protaminierung aufweisen.

3 Material und Methoden

3.1 Probanden

Insgesamt wurde der Samen von 48 Rüden in die Untersuchungen einbezogen.

Untersucht wurde das Nativsperma von 20 fertilen Rüden aus Privathaushalten, die in der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie zur Samenuntersuchung bzw. zum Herstellen von Tiefgefriersperma vorgestellt wurden. Es handelte sich um Rüden unterschiedlichen Alters und unterschiedlicher Rasse, welche zum Zeitpunkt der Untersuchung gesund waren. Es wurden vier Yorkshire Terrier, zwei Leonberger, drei Deutsche Schäferhunde, ein Gordon-Setter, ein Border Collie, ein Riesenschnauzer, zwei Deutsche Doggen, ein Rottweiler, ein Rhodesian Ridgeback, ein Großer Schweizer Sennenhund, ein Landseer und zwei Mischlinge in die Untersuchungen von Nativsamen eingezogen.

Zusätzlich wurde von 20 weiteren fertilen Rüden tiefgefrorene Samenproben untersucht, wobei von elf die Rasse nicht bekannt war und der Rest von einem Rottweiler, einem Groenendael, einem Bullmastiff, zwei Bullterrier, einem Boxer, einem Mischling und einem Deutschen Schäferhund stammten. Des Weiteren wurden acht Samenproben, die nach Kastration aus dem Nebenhodenschwanz gewonnen wurden, in die Untersuchungen einbezogen. Dabei handelte es sich um zwei Mischlinge, einen Labrador, einen deutschen Schäferhund, einen Papillon, einen Chihuahua, einen Beagle und einen Jack Russel Terrier.

Der Status fertil wurde den Rüden zugeteilt, weil bisher alle von den Rüden gedeckten Hündinnen trächtig geworden waren.

3.2 Probengewinnung und Aufbereitung

3.2.1 Samenentnahme

Die Samenentnahme erfolgte in ruhiger Umgebung durch manuelle Stimulation in Anwesenheit einer läufigen Hündin. Nach Reinigung des Präputiums wurde wie von Hoffmann (2003) beschrieben vorgegangen.

Zunächst wurde der Bulbus glandis massiert. Danach erfolgte ein Vorlagern des teilerigierten Penis aus dem Präputium, in dem der Penis mit Daumen und Zeigefinger hinter dem Bulbus glandis umfasst und massiert wurde. Nach dem Umsteigen des Rüden wurde zur Simulation des Hängens der Penis in kaudoventrale Richtung verlagert.

Das Ejakulat wurde getrennt nach Vorsekret, spermienreicher Fraktion und Nachsekret mittels tulpenförmigen Gläsern aufgefangen, die zuvor auf 37 °C vorgewärmt wurden.

3.2.2 Anfertigung von sprühfixierten Ausstrichpräparaten

Für die mikroskopischen Färbungen wurden, mit Ausnahme der Eosinfärbungen, Ausstrichpräparate vorgefertigt und für eine spätere Untersuchung fixiert.

Zur besseren Beurteilung der Ausstriche wurde das Ejakulat zunächst 1:1 mit einer Nährlösung (HAM's F10) verdünnt. Dann wurden 5 µl der Spermiesuspension mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Nach ca. zehn Minuten Lufttrocknung erfolgte eine Fixierung mittels Merckofix® Sprühfixierlösung, indem die Objektträger mit zwei bis drei Sprühhüben in waagerechter Richtung berieselt wurden. Nach Lufttrocknung wurden die Ausstriche nun bis zur Färbung in Präparatekästen bei Zimmertemperatur gelagert.

3.3 Samenuntersuchung

3.3.1 Makroskopische Untersuchung

Von jedem Ejakulat wurde zunächst Volumen, Farbe, Konsistenz, Geruch und eventuellen Beimengungen dokumentiert.

Das Volumen wurde anhand einer Skala auf den Auffanggläsern abgelesen, während Farbe, Konsistenz und Geruch grobsinnlich erfasst wurden (Hoffmann, 2003).

3.3.2 Computerassistierte Samenanalyse (CASA)

3.3.2.1 Aufbau

Die Konzentrationsbestimmung und Motilitätsanalyse der Spermien erfolgte mittels computerassistierter Samenanalyse, wobei das Programm Sperm Vision® (Fa. Minitüb, Tiefenbach) Verwendung fand.

Dieses ist folgendermaßen aufgebaut:

- Labormikroskop Olympus BX41 (Okular 10 x, Olympus BX41, Fa. Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) mit beheizbarem (integrierte Heizplatte HT 200; Minitüb GmbH, Tiefenbach) und mit Joystick steuerbarem motorisiertem Kreuztisch und negativem Phasenkontrast (Negativ-Hoch-Kontrast-Objektiv; UPlanFINH 20 x/0,5 Ph1, Fa. Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan)
- Hochgeschwindigkeitsdigitalkamera (schwarz/weiß) mit 60 Bildern/Sekunde, Belichtungszeit bis zu 1/20.000 pro Sekunde
- TV-Adapter
- Rechner (Pentium® 4D(Dual Core) mit 3.0 GHz Prozessor und Betriebssystem Microsoft Windows XP Professional, Vista comp. Grafikkarte, 19“ TFT-Monitor)
- Sperm Vision™-Softwarepaket (Version 3.5.6.2. - Juli 2009)
- Leja-Messkammern (Leja® Standard Count 4 Chamber Slide; Leja Products B. V., Nieuw Vennepe, Niederlande)

3.3.2.2 Ablauf

Zunächst wurden die Messkammern und Pipettenspitzen auf einer Wärmplatte vorgewärmt. Währenddessen wurde der Patient im Computerprogramm angelegt und im Analysefenster die Tierart und Verdünnung ausgewählt.

Anschließend wurden die Messkammern mit 2,5 µl des Ejakulats befüllt, wobei besonders darauf zu achten war, dass die Kammer durch Kapillarkräfte und ohne Luftblasen befüllt wurde.

Gegebenenfalls wurde die Probe 1:9 verdünnt, was bei der Konzentrationsmessung zu berücksichtigen war.

Abschließend wurde mittels des integrierten Lichtmessers die Lichtstärke eingestellt, worauf die Auswertung begonnen werden konnte.

Pro Gesichtsfeld wurden vom Messsystem innerhalb von 0,5 Sekunden 30 Bilder erstellt, durch deren Vergleich die Motilitätsparameter errechnet wurden (Klaus 2012, Miss 2012).

3.3.2.3 Untersuchungsparameter

Von insgesamt 20 Nativsamenproben wurden dreizehn Rüden mittels computerassistierter Samenanalyse untersucht. Bei acht Rüden wurde die Sperm Vision®-Software eingesetzt, während bei weiteren fünf Proben eine Umstellung auf das AndroVision®-System erfolgte. Hier wurden die Konzentration, Gesamtmotilität und Vorwärtsbeweglichkeit erfasst.

Folgende Parameter wurden mittels Sperm Vision® erfasst und in der Datenbank der Software gespeichert (Sperm Vision™-Benutzerhandbuch 12049/0586, WHO Laborhandbuch):

- Concentration: $10^9/\text{ml}$ Bestimmung der Konzentration anhand gezählter Spermien während der Motilitätsanalyse in Kombination mit dem Volumen und dem Verdünnungsfaktor
- % Motile: Gesamtbeweglichkeit
- % Progressive: Vorwärtsbeweglichkeit
- Total Cells: Zahl der untersuchten Spermien pro Bild
- DAP: distance average path (µm) = «durchschnittliche Strecke»: „Die Strecke in geglätteter Linie“ (Boyer et al., 1989)

- DCL: distance curved line (μm) = «Kurvenstrecke»: „Die tatsächlich zurückgelegte Strecke“ (Boyer et al., 1989)
- DSL: distance straight line (μm) = »gradlinige Strecke « (Boyer et al., 1989)
- VAP: verage path velocity ($\mu\text{m/s}$) – »Pfadgeschwindigkeit«: „Die in einer bestimmten Zeit gemessene räumliche Wegstrecke wird, rechnerisch geglättet durch den Algorithmus des CASA-Systems, in Geschwindigkeit umgerechnet“ (Nieschlag et al., 2012)
- VCL: curvilinear velocity: ($\mu\text{m/s}$) – »Spurgeschwindigkeit«: „Die in einer bestimmten Zeit gemessene zurückgelegte Geschwindigkeit des Spermienkopfes entlang seiner tatsächlich zurückgelegten kurvilinearen Bahn, wie sie sich in zwei Dimensionen im mikroskopischen Blickfeld darstellt“. (Nieschlag et al., 2012)
- VSL: straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$) – »Progressivgeschwindigkeit«: „Die in einer bestimmten Zeit zurückgelegte Strecke des Spermienkopfes wird in einer gedachten Linie von der Startposition bis zur Endposition gemessen“ (Nieschlag et al., 2012)
- STR: straightness (ohne Einheit) - »Linearitätsindex«: „Das Maß für die Gestrecktheit des gemittelten Weges, VSL/VAP “ (Nieschlag et al., 2012)
- LIN: (ohne Einheit) – »Linearität«: „Das Maß für die Gestrecktheit der kurvilinearen Bahn, VSL/VCL “ Nieschlag et al., 2012)
- WOB: WOB – wobble (ohne Einheit) – »Flattrigkeit«, »Seitenausschlag«: „Rechnerisches Maß für die Oszillation des Spermiums anhand des wirklich zurückgelegten Weges im Vergleich zur rechnerisch geglätteten Laufbahn, VAP/VCL “ (Nieschlag et al., 2012)
- ALH: amplitude of lateral head displacement (μm) »seitliche Kopfauslenkung«: „Die Größe der lateralen Kopfauslenkung entlang seines mittleren Bewegungspfad es wird berechnet“ (Nieschlag et al., 2012)

- BCF: beat-cross frequency (Hz) – »Kopfschlagfrequenz«: „Das Maß für die mittlere Rate, in der der kurvlineare Pfad den gemittelten Pfad kreuzt“ (Nieschlag et al., 2012)

3.3.3 Mikroskopische Färbemethoden

3.3.3.1 Spermiovitalität und Pathomorphologie (Eosin-Färbung)

Zunächst wurde ein Tropfen des Ejakulats mittig auf einen entfetteten und erwärmten Objektträger platziert. Anschließend wurde die doppelte Menge an 2 %iger Eosinlösung (Fa. Merck, Darmstadt) hinzugefügt. Die Tropfen wurden ca. 20 Sekunden vermischt und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers ausgestrichen. Nach Lufttrocknung erfolgt die Beurteilung von 200 Spermien bei einer 400er Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop (Miss 2012; Wehrend und Bostedt, 2013).

Tote Spermien zeigen eine Rotfärbung, während lebende Spermien keinen Farbstoff aufnehmen.

3.3.3.2 Spermienreifung (Anilinblaufärbung)

Die Färbung mittels Anilinblau erfolgt nach dem Protokoll von Terquem und Dadoune (1983), welches von Hingst et al. (1995) für feline Spermatozoen modifiziert wurde.

Zunächst wird aus einer 50 %igen Glutardialdehydlösung eine 3 %ige Fixierlösung hergestellt.

Dafür wurden 4,2 ml der 50 %-Lösung mit 65,8 ml PBS ca. drei Minuten mit dem Magnetrührer gemischt und anschließend in eine Glasküvette gefüllt.

In dieser Fixierlösung wurden die sprühfixierten Objektträger für 30 Minuten fixiert, anschließend auf einer saugfähigen Unterlage abgeklopft und für ca. fünf Minuten luftgetrocknet.

Der Färbeprozess erfolgt in einer industriell gefertigten, mit Essigsäure auf einen pH von 3,5 eingestellten 5 %igen Anilinblaulösung (Fa. Morphisto, Evolutionsforschung und Anwendung GmbH). Die Objektträger wurden fünf Minuten in einer Glasküvette gefärbt und nach viermaligem Waschen in vier verschiedenen mit PBS befüllten Küvetten luftgetrocknet und anschließend mit Entellan® eingedeckt.

Nachdem das Eindeckmedium vollständig getrocknet war, wurden die Ausstriche lichtmikroskopisch bei 1000facher Vergrößerung und mittels Ölimmersion ausgewertet.

Es wurden auf jedem Objektträger 500 Spermien ausgezählt, wobei die Spermien anhand ihrer Färbung in Anilinblau positive und negative Spermien eingeteilt wurden. Positiv wurden die Spermien gewertet, deren Köpfe vollständig oder teilweise dunkelblau gefärbt waren.

3.3.3.3 Chromatindissoziation (Toluidinblaufärbung)

Für die Toluidinblaufärbung wurde das von Erenpreiss et al. (2001) entwickelte Verfahren angewandt. Nach einer 30 minütigen Fixierung in einer 1:1 Mischung aus 96 %igem Ethanol und Aceton bei 4 °C erfolgte eine Hydrolyse in 0,1 N HCL für 5 Minuten bei ebenfalls 4 °C. Daraufhin wurden die Objektträger jeweils dreimal zwei Minuten lang in destilliertem Wasser gewaschen. Es folgte eine 10 minütige Färbung in einer 0,05 % Toluidinblaulösung in McIlvaine-Puffer mit einem pH von 3,5. Die Präparate wurden vorsichtig mit destilliertem Wasser gespült, dann zwei mal drei Minuten mit tertiärem Butanol bei 37 °C dehydriert, zwei mal drei Minuten in Xylol geklärt und anschließend mit Entellan® eingedeckt.

Die Beurteilung erfolgte bei einer 1000fachen Vergrößerung mit Immersionsöl. Spermienkerne mit gut kondensiertem Chromatin können wenig Farbstoff binden, weshalb diese hellblau erscheinen. Dunkelblaue bzw. lila Spermienköpfe binden aufgrund einer geringeren Kondensation viel Farbstoff und somit tritt eine Metachromasie von Blau nach Violett auftritt.

3.3.3.4 Chromatinkondensation (Chromomycin A3-Färbung)

Nach Bianchi et al. (1993) wurden die sprühfixierten Objektträger in 90 ml Carnoy-Lösung (Methanol/Essigsäure 3:1) für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Glasküvette fixiert.

Es war darauf zu achten, dass die Fixierlösung ca. zwei Minuten mittels Magnetrührer gerührt wird, um eine vollständige Durchmischung zu erreichen. Zudem wurde die Küvette mit einem Deckel verschlossen, damit die leichtflüchtige Fixierung in benötigter Menge erhalten blieb.

Nach Ablauf der Fixierdauer wurden die Objektträger aus der Lösung entnommen und in fast senkrechter Position auf einer saugfähigen Unterlage luftgetrocknet.

Zum Färben wurden die Präparate mit 100 µl CMA3 Lösung (25 mg/ml CMA3 in PBS) bedeckt, mit einem Deckgläschen abgedeckt und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 20 Minuten gefärbt. Nachdem die Proben in PBS gewaschen und luftgetrocknet wurden, erfolgte das Eindecken der Objektträger mit Glycerin. Nach Auftragen eines Deckgläschens erfolgte die Untersuchung mit dem Fluoreszenzmikroskop (Fa. Olympus BH2-RFCA) mit einem 490 nm Exzitationsfilter bei 1000facher Vergrößerung mit Immersionsöl.

Zur Auswertung wurden 500 Spermatozoen ausgezählt und deren Färbung betrachtet. Chromomycin A3-positive Spermatozoen fluoreszieren hellgrün, während die restlichen dunkler grün erscheinen.

Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle mittels Deprotamination durchgeführt, wobei das Protokoll von Bizzaro (1998) verwendet wurde, welches bei Simões et al. (2009) bereits für Bullenspermatozoen Verwendung fand. Dafür wurde der Samen vor der Fixierung mit einer Lösung aus 5 mM DTT und 0,1 % Triton X-100 in PBS für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dabei soll es zu einem Bruch der Disulfidbrücken zwischen den Protaminketten kommen und die Plasmamembran teilweise permeabilisiert werden. Nach zweimaligem Waschen der Proben folgte der Fixierungs- und Färbevorgang, wie oben beschrieben.

3.3.3.5 DNA-Integrität (Akridinorange-Test)

Die Färbung mittels Akridinorange erfolgt gemäß dem Protokoll von Tejada et al. (1984). Die sprühfixierten Objektträger wurden für zwei Stunden in Carnoys-Lösung (Methanol: Essigsäure 3:1) in einer Glasküvette fixiert, wobei auch hier auf eine vollständige Durchmischung der Substanzen geachtet werden musste. Nach anschließendem Abtropfen und Lufttrocknen, senkrecht stehend auf einer saugfähigen Unterlage, erfolgte der eigentliche Färbevorgang. Es wurden zunächst die benötigten Stammlösungen hergestellt:

40 ml der 0,1 molaren Zitronensäurestammlösung bestehen aus 0,84 g Zitronensäuremonohydrat und 40 ml destilliertem Wasser.

2,5 ml 0,3 molare di-Natriumhydrogenphosphatlösung werden aus 0,33 g di-Natriumhydrogenphosphat und 2,5 ml destilliertem Wasser hergestellt.

Für zehn ml Akridinorange-Stammlösung werden 0,01 g Akridinorange in zehn ml destilliertem Wasser gelöst.

Alle Vorgänge, bei dem Akridinorange Verwendung fand, wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt und die entsprechenden Lösungen in lichtundurchlässigen Gefäßen aufbewahrt.

Alle Stammlösungen wurden zwei bis drei Minuten mit dem Magnetrührer gerührt um eine vollständige Lösung zu erzielen. Die Natriumhydrogenphosphatlösung wurde zusätzlich ca. eine Minute auf dem Vortexer durchmischt.

Nach dem Zusammengeben und Mischen der Stammlösungen unter UV-Lichtausschluss wurde eine Glasküvette mit Alufolie umwickelt und mit der Färbelösung befüllt. Anschließend wurden die Objektträger eingelegt und für 5 Minuten gefärbt.

Danach wurden die Präparate aus der Färbelösung entnommen, auf einer saugfähigen Unterlage abgeklopft und mit destilliertem Wasser gewaschen.

Nach erneutem Abklopfen und Lufttrocknen wurden die Objektträger mit Glycerin eingedeckt und sofort untersucht.

Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Fa. Olympus BH2-RFCA) mittels eines Exzitationsfilters von 460 nm.

Es wurden bei einer 1000er Vergrößerung mit Immersionsöl 500 Spermien ausgezählt, wobei alle roten, gelben und orangen Spermien als positiv bewertet wurden, während sich die negativen grün darstellten.

3.3.3.6 Modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatinstrukturassay (mfSCSA)

Alle tiefgekühlten Samenproben wurden zusätzlich mit dem von Biege (2004) beschriebenen modifizierten Spermienchromatinstrukturassay untersucht. Da diese Färbung für frische Samenausstriche etabliert wurde, wurde auf eine Untersuchung der sprühfixierten Präparate verzichtet.

Zunächst wurden tiefgefrorenen Samenproben in einem 38 °C warmem Wasserbad aufgetaut und anschließend mit 2,9 % Natriumcitratpuffer versetzt und mit 3000 U/min bei 20 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschvorganges wurden 10 µl der Probe auf einen Objektträger pipettiert, ausgestrichen und bei Raumtemperatur für ca. 20 Minuten getrocknet.

Zur Herstellung einer Dekondensationslösung für 10 Objektträger wurden 0,015 g DTT in 20 ml Natriumcitratpuffer gelöst und 1420 µl DMSO mit 630 µl destilliertem Wasser gesättigt, wobei eine exotherme Reaktion erfolgte. Nach dem Abkühlen wurden die Lösungen zusammen gegeben, geschwenkt und je zwei Milliliter Dekondensationslösung pro Objektträger aufgetragen.

Nach vierzig Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit Natriumcitratpuffer gespült und für 10 Minuten in einer Glasküvette gewaschen und für weitere 10 Minuten senkrecht stehend getrocknet.

Die Fixierung bzw. Säuredenaturierung erfolgt in Carnoylösung bestehend aus 60 ml Methanol und 30 ml Essigsäure für 12 Minuten in einem abgedunkelten Raum.

Während der Fixierzeit wurde eine Glasküvette im Gefrierschrank kalt gestellt zum späteren Befüllen mit der Färbelösung, während gleichzeitig eine mit Natriumcitratpuffer gefüllte Küvette bei ca. 4 °C kaltgestellt wurde.

Zur Herstellung der Färbelösung wurden zunächst die Stammlösungen vorbereitet, in dem 0,84 g Zitronensäuremonohydrat in 40 ml destilliertem Wasser gelöst wurde (Zitronensäurestammlösung), und 0,33g di-Natriumhydrogenphosphat in destilliertes Wasser gegeben und mittels Vortexer gelöst wurde.

Die Akridinorange-Stammlösung wurde im Dunkeln angesetzt. 0,01 g Akridinorangepulver wurden in 10 ml Wasser gelöst, gerührt und filtriert.

Bis zum Ende der Fixierdauer wurden die Lösungen gekühlt und dann im vorgekühlten Gefäß zusammen gegeben und gerührt.

Nach Entnahme aus der Fixierlösung und zwei Minuten Trocknung, erfolgte eine 14 minütige Färbung unter Lichtausschluss. Anschließend wurden die Proben in den gekühlten Natriumcitratpuffer umgesetzt und für 10 Minuten dort belassen, worauf weitere 10 Minuten getrocknet wurde.

Bis zur Auswertung erfolgt eine Lagerung bei 5 °C in lichtundurchlässigen Kästen.

Ausgewertet wurde mittels Fluoreszenzmikroskop (Olympus BH2-RFCA) visuell, wobei immer 500 Spermien ausgewertet wurden.

Grün fluoreszierende Zellen wurden als negativ gewertet, wobei, rote, orange und gelbe Spermien als chromatininstabil gewertet wurden.

3.3.3.7 DNA-Fragmentierung (TUNEL-Test)

Die TUNEL-Färbung erfolgt anhand des für das kommerzielle Testkit der Fa. Roche (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein) modifizierten Protokolls nach Watanabe et al. (2011).

Die Ausstriche wurden zunächst für 60 Minuten bei Raumtemperatur in 4 %iger Paraformaldehydelösung in einer Glasküvette fixiert. Nach Ablauf der Fixationsdauer

wurden die Präparate aus der Lösung entnommen, mit destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

Die Permeabilisation erfolgte in 100 ml einer 0,1 %igen Triton X-100-Lösung bei 4 °C, welche aus 0,1 ml Triton X-100 und 0,1 % Natriumcitrat hergestellt wurde.

Bei der Herstellung der Permeabilisationslösung war darauf zu achten, dass das Triton X-100 zunächst mit wenigen Millilitern Natriumcitrat in Lösung gebracht und dann auf 100 ml aufgefüllt wurde. Nach dem Permeabilisieren wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

Die Färbung erfolgte nach Herstellung der TUNEL-Reaktionsmischung (bestehend aus Label Solution und Enzym in einem Verhältnis 10:1). Es wurden pro Objektträger jeweils 25 µl des Gemisches bestehend aus 22,5 µl Farbstoff und 2,5 µl des anlagernden Enzyms aufgetragen, wobei eine gleichmäßige Färbung durch das Auflegen eines Deckglases gewährleistet wurde.

Die Inkubation erfolgte in einer mit destilliertem Wasser gefüllten feuchten Kammer bei einer Bebrütungstemperatur von 37 °C über Nacht.

Alle Schritte der Färbung erfolgen unter Ausschluss von UV-Licht.

Die Objektträger wurden in destilliertem Wasser gewaschen, luftgetrocknet und mit 10 µl einer 0,1 %igen DAPI-Lösung für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37 °C gegengefärbt. Nach erneutem Waschen und Trocknen der Präparate wurden diese mit Antifade eingedeckt und mit einem Fluoreszenzmikroskop mit 488 nm Exzitationsfilter und 500 - 560 nm Detektionsfilter bei 1000er Vergrößerung mit Immersionsöl beurteilt.

Es wurden 500 Spermien ausgewertet, wobei grünfluoreszierenden Spermien als TUNEL-positiv gezählt wurden.

Pro Färbedurchgang wurde jeweils eine Negativkontrolle durchgeführt, indem auf einen Objektträger Fluoreszenzfarbstoff ohne anlagerndes Enzym aufgetragen wurde.

Für die tiefgefrorenen Proben wurde zusätzlich pro Färbedurchgang eine Positivkontrolle durchgeführt. Nach Fixation und Permeabilisieren wurde 1000 U/ml

DNase recombinant der Firma Roche aufgetragen. Laut Hersteller wurden 3 U/ml empfohlen, da aber bei Untersuchungen von Villani et al. (2010) deutlich wurde, dass im Vergleich zum Menschen bovines und murines Spermienchromatin erst bei deutlich höheren Konzentrationen gesteigerte DNA-Fragmentierungen aufweist, wurde eine Konzentration von 1000 U/ml gewählt. Beim Anfertigen dieser Positivkontrolle und Negativkontrollen musste eine strikte Trennung bei allen weiteren Vorgängen wie Waschen, Trocknen und Eindecken erfolgen um eine Kontamination der Proben mit DNase bzw. der Negativkontrollen mit Enzym zu vermeiden.

3.3.3.8 Apoptosenachweis (Caspase-3-Aktivität)

Ähnlich wie beim TUNEL dient diese Methode dem Apoptosenachweis. Dabei wird die Aktivität der Effektorcaspase-3 mittels fluoreszierender Antikörper angezeigt.

Unter der Verwendung des APO Active 3™ FITC – Antibody Specific Active Caspase-3 FITC Detection Kit der Fa. Cell Technology wurde durch indirekte Immunhistochemie aktive Caspase-3 nachgewiesen.

Zunächst wurde eine Vorverdünnung der im Kit enthaltenen Antikörper hergestellt.

Der Primäre Kaninchen Anti-Caspase-AK (55 µl) wurde 1:20 mit 1045 µl PBS mit 2 % bovinem Serumalbumin verdünnt und in Portionen à 50 µl eingefroren.

Der sekundäre FITC-markierte AK wurde im Dunkeln 1:10 mit PBS mit 2 % BSA verdünnt und ebenfalls in 50 µl Portionen tiefgefroren.

Vor Versuchsbeginn wurde zunächst eine 1:10 Verdünnung der im Kit enthaltenen Fixierlösung hergestellt. Da jeder Objektträger mit 50 µl Fixierlösung bedeckt werden sollte, wurden je nach Anzahl der zu färbenden Präparate (optimaler Weise 20 OT) je 5 µl des Fixierkonzentrats entnommen und mit 45 µl PBS verdünnt.

Die Objektträger wurden mit 50 µl sowie einem Deckglas bedeckt und in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht fixiert.

Am nächsten Tag wurde erst eine weitere 1:20 Gebrauchsverdünnung des primären Anticaspase-Antikörpers hergestellt. Dafür wurde eine 50 µl Portion der

Vorverdünnung aufgetaut und mit 950 µl 2 % BSA in PBS versetzt. Zusätzlich wurden 10 µl Ziegen Serum als Blockserum zur Reduktion der Hintergrundfärbung zugegeben.

Nach drei Waschgängen à fünf Minuten in einer Lösung bestehend aus 0,1 % Triton X-100 in PBS wurde der primäre Antikörper aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt.

Nach einer 90 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten erneut drei Waschungen für jeweils 10 Minuten, diesmal in einer 1 % Triton X-100-Lösung.

Auch der sekundäre fluoreszierende Antikörper wurde unter UV-Lichtausschluss aufgetaut und mit 950 µl PBS mit 2 % BSA verdünnt. Die Objektträger wurden mit 50 µl bedeckt und für weitere 90 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend durch dreimaliges Dippen in einer 0,1 % TritonX-100-Lösung gereinigt.

Die Präparate wurden entweder direkt fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet oder mit Antifade eingedeckt und bis zur Auswertung unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert.

Die Beurteilung erfolgte bei einer Anregung von 490 nm und einem Barrierefilter von 520 nm. Samenzellen mit aktiver Caspase-3 zeigten eine leuchtend grüne Fluoreszenz, während negative Zellen dunkel blieben.

3.4. Erfassen von Praktikabilitätskriterien für die veterinärmedizinische Praxis

3.4.1 Erfassen der Zeitdauer

Für die zu etablierenden Untersuchungsmethoden wurde die Gesamtdauer für die Anfertigung der Ausstriche erfasst. Dabei wurde unterschieden zwischen reinen Wartezeiten für Inkubation, Färbung und Trocknung, sowie Arbeitsschritten wie z. B. das Einsetzen in Färbe- und Fixierlösungen. Es wurde einerseits die Arbeitszeit pro Objektträger erfasst, andererseits die Gesamtdauer für einen Färbevorgang von 20 Objektträgern von Anfang bis Ende.

3.4.2 Berechnung der Materialkosten

Es wurden alle verwendeten Substanzen in die Berechnung der Kosten pro Ausstrich einbezogen und die Gesamtkosten für einen Färbedurchgang von 20 Objektträgern ermittelt, da ein Sammeln von sprühfixierten Ausstrichpräparaten für Anilinblau, Akridinorange, Chromomycin A3, Toluidinblau, TUNEL und Caspase-3-Aktivität möglich ist. Der modifizierte fluoreszenzmikroskopische Spermienchromatinstrukturassay ist nicht für fixierte Präparate etabliert, weshalb hier keine Sammelfärbevorgänge vorgenommen werden können. Die Preise wurden aktuellen Laborkatalogen entnommen und für die vernünftigen lagerbaren Mengen an Grundsubstanzen bestimmt. Kosten für Objektträger, Deckgläser und Pipettenspitzen wurden nicht in die Berechnung einbezogen.

3.4.3 Bewertung der verwendeten Substanzen bezüglich Gesundheits- und Umweltbelastung

Anhand der Sicherheitsdatenblätter der verwendeten Substanzen wurde das Gefährdungspotential für Labormitarbeiter und Umwelt recherchiert und bei der Bewertung und dem Vergleich der Praktikabilität der verschiedenen Methoden einbezogen und diskutiert.

3.5 Statistische Auswertung

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin erfolgte die statistische Auswertung unter Verwendung der Statistiksoftware BMDP/ Dynamic Release 8.1 (Statistical Solutions Ltd., Cork, Irland).

Mittels Q-Q-Plot und Residualanalyse wurde die Normalverteilung der Färbungen geprüft und ergab eine rechtsschiefe Verteilung, weshalb die Daten für die weitere statistische Auswertung logarithmisch transformiert wurden. Nullwerte wurden dabei für die Logarithmierung mit dem Wert 0,1 ersetzt. Die Residualanalysen erfolgten mit der Statistiksoftware R (Comprehensive R Archive Network; <http://www.r-project.org>.)

Zunächst wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich der Färbung durchgeführt, um die Färbungen global miteinander zu vergleichen und herauszufinden, ob die Varianz zwischen den Färbemethoden größer ist, als innerhalb einer Methode. Das heißt, es sollte geprüft werden, ob sich die Ergebnisse der getesteten Färbungen grundsätzlich unterscheiden, obwohl alle das gleiche Ziel haben, nämlich Aussagen über die Chromatinkondensation zu erbringen.

Mittels Student-Newman-Keuls-Test wurden anschließend die Mittelwerte der einzelnen Färbungen paarweise verglichen, um zu ermitteln, welche Untersuchungsergebnisse sich im Einzelnen unterscheiden.

Da beim Einsatz des Farbstoffes Akridinorange zwei unterschiedliche Verfahren (AOT und mfSCSA) eingesetzt wurden, die sich vor allem durch den Arbeitsaufwand unterscheiden, wurden diese gezielt mittels T-Test verglichen.

Anschließend erfolgt eine Korrelationsanalyse aller Paare mittels Korrelationskoeffizienten nach Pearson mit logarithmierten Werten.

Für den Nativsamen erfolgte zusätzlich eine Korrelationsanalyse zwischen den Ergebnissen der klassischen Samenuntersuchung (Vitalität, Vorwärtsbeweglichkeit und Pathomorphologie) und den Ergebnissen der Untersuchungen zur Chromatinkondensation um die Bedeutung der Chromatinfärbungen als unabhängige Samenparameter einschätzen zu können. Vitalität und Vorwärtsbeweglichkeit wurden in Avitalität (100-vitale Spermien) und nicht progressiv motile Spermien (100-progressiv motile Spermien) umgeformt, wodurch eine rechtsschiefe Verteilung auftrat, die auch für die pathomorphen Spermien bestand. Daraus resultierte eine logarithmische Transformierung der Ergebnisse zur weiteren statistischen Auswertung.

Ob sich die Wahl des Probenmaterial (Tiefgefriersperma, aus dem Nebenhoden gewonnene tiefgefrorene Samenproben und Nativsamen) auf die Ergebnisse der Färbemethoden auswirkt und ob sich die Ergebnisse signifikant unterscheiden, wurde anhand einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich Färbung untersucht. Damit sollte geklärt werden, ob eine Wechselwirkung bezüglich der Probenart und Färbemethode besteht.

Dazu wurden die Probenmaterialien gruppenweise verglichen, das heißt die Ergebnisse der Nativsamenproben und des Tiefgefrierspermas, der Nativsamen mit den Nebenhodenspermaproben und das Tiefgefriersperma mit den tiefgefrorenen epididymalen Samenproben.

4 Ergebnisse

4.1 Makroskopische Untersuchung

Bei der grobsinnlichen Samenuntersuchung (Tabelle 1) ergaben sich bei allen 20 Nativsamenproben keine Abweichungen von der Norm, während bei der pH-Wert-Ermittlung zwei Rüden mit 5,8 (NS-10) und 5,9 (NS-5) unterhalb des physiologischen Wertes von 6,2 - 6,8 lagen. Die Volumina der spermienreichen Fraktion lagen zwischen 0,5 und 4,5 ml und somit im physiologischen Bereich. Farbe und Geruch der Proben zeigten ebenfalls keine Auffälligkeiten.

4.2 Motilität

Sowohl die mikroskopisch ermittelte Vorwärtsbeweglichkeit, also auch die computerassistierte Samenanalyse ergab größtenteils physiologische Werte von mehr als 70 % vorwärtsbeweglicher Spermien (Tabelle 1). Lediglich ein Rüde (NS-5) zeigte in der computer-gestützten Auswertung eine Vorwärtsbeweglichkeit von weniger als 20 %, welche aber mikroskopisch nicht bestätigt werden konnte, sondern bei 90 % lag.

Bei drei (NS-11, NS-15 und NS-18) der zwanzig untersuchten Rüden wurde mikroskopisch eine verminderte progressive Motilität (60 %, 10 % und 40 %) nachgewiesen, wobei es sich um Deutsche Schäferhunde handelte und bei einem Rüden (NS-15) eine Beimengung von Leukozyten gefunden wurde.

4.3 Spermienzahl

Die Spermiengesamtzahl der Nativsamenproben lag zwischen 205 Millionen und 2,6 Milliarden Spermien, wobei zwei Rüden (NS-1 und NS-2) die von Günzel-Apel et al. (1994) ermittelte Mindestgrenze von 300 Millionen unterschritten (Tabelle 1). Bei diesen Proben handelte es sich allerdings um zwei Ejakulate einer Zwerggrasse. Bei der Ermittlung der Spermienzahl pro μl unterschritt ein Rüde (NS-6) die Mindestgrenze von 200 000 Spermien pro μl (Riesenbeck et al. 2001).

Tabelle 1: Übersicht der Ergebnisse der klassischen Samenuntersuchung von zwanzig caninen Nativsamenproben

Probennummer NS-	Volumen ml (spermienreiche Fraktion)	Farbe	Konsistenz	Beimengungen	pH	Vorwärt-beweglichkeit %	Lebend %	Dichte/ μ l $\times 10^4$	Gesamtzahl $\times 10^6$	Pathomorphologie %
1	0,8	weiß	milchig	Einzelzellen	6,2	85	86	27	216	3
2	0,5	weiß	rahmig	Einzelzellen	6,4	90	85	41	205	9
3	2	elfenbein	rahmig	Zellen + Bakterien	6,7	90	85	43	860	11
4	1,5	gelb.-klar	wässrig	Einzelzellen	6,2	85	92	28	420	7
5	3,5	elfenbein	wässrig	Zellen	5,9	90	89	48	1680	9
6	3,8	ggr. rötlich	milchig	Erythrozyten + Zellen	6,3	80	85	17	646	14
7	3,5	weiß	milchig	Einzelzellen	6,2	80	92	23	805	6
8	3,5	gelb	milchig	Zellen	6,6	80	82	24	840	7
9	2,2	weiß	milchig	Zellen+Bakterien	6,3	90	92	31	682	17

Ergebnisse

10	4,5	weiß	milchig	keine	5,8	90	82	59	2655	19
11	2,5	weiß	molzig	Leuko- zyten	6,2	60	67	41	1025	51
12	3,2	grau- weiß	molzig	keine	6,2	70	70	21	672	19
13	2	weiß	molzig	Epithel- zellen	6,4	80	84	56	1120	24
14	2,4	weiß	obB	keine	6,2	90	91	11	264	28
15	1	grau- braun	molzig	Leuko- zyten +++	6,8	10	49	141	1410	68
16	1,1	grau- weiß	molzig	keine	6,8	90	90	31	341	7
17	0,5	weiß	molzig	Erythro- zyten + Zellen	6,2	70	73	117	585	12
18	2,3	grau- weiß	wäss- rig	Epithel- zellen	6,7	40	80	12	276	48
19	0,6	grau- weiß	molzig	Epithel- zellen	6,7	80	83	73	438	8
20	0,5	grau- weiß	molzig	keine	5,4	80	84	51	255	9
\bar{x}						76,5	82,1	44,8	769,8	18,9
SD						19,5	10,2	31,7	571,9	17,1

4.4 Eosinfärbung

Bei den Nativsamenproben lag der arithmetische Mittelwert bei 82,1 % lebender Spermatozoen, wobei maximal 92 % und minimal 49 % lebende Spermien nachgewiesen wurden. Insgesamt wiesen fünf Rüden weniger als 80 % lebende Spermien auf (NS-11, NS-12, NS-15, NS-17 und NS-18). Wie in Tabelle 1 und 2 deutlich wird wies das Vorkommen von pathomorphologischen Zellen eine größere Spannweite auf und lag zwischen 3 % und 68 % pathomorpher Spermien, wobei im Durchschnitt 18,9 % Pathomorphologien festgestellt wurden. Somit lagen die morphologischen Werte weitgehend im physiologischen Bereich, welcher laut Günzel-Apel et al. (1994) bei maximal 30 % morphologisch auffälliger Spermien liegt. Bei drei (NS-14, NS-15 und NS-18) der 20 Rüden wurden mehr als 30 % pathomorpher Spermien nachgewiesen. Dabei wurde bei dem Rüden mit dem höchsten Anteil pathomorphologischer Spermien (NS-15: 68 %) auch am wenigsten lebende Spermien (49 %) und die geringste Vorwärtsbeweglichkeit (10 %) gefunden.

Tabelle 2: Verteilung der pathomorphologischen Veränderungen in Nativsamenproben (NS) von 20 verschiedenen Rüden

Probennummer	Plasma-tropfen %	geknickter Schwanz %	schleifenförm. Schwanz %	aufgerollter Schwanz %	Halsbruch %	kleine Köpfe %	lose Köpfe %	Gesamt %
NS-1	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0
NS-2	3,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	4,0	9,0
NS-3	8,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,0
NS-4	0,0	6,5	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	6,5
NS-5	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	8,5
NS-6	0,0	4,0	2,0	0,0	0,0	2,0	8,0	14,0
NS-7	2,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	6,0
NS-8	3,0	0,5	2,5	0,5	0,0	0,0	0,5	7,0
NS-9	0,0	10,0	2,0	0,0	5,5	0,0	5,0	17,0
NS-10	3,0	2,5	3,5	0,0	2,0	0,0	4,0	18,5
NS-11	6,5	7,0	27,0	1,0	2,0	0,0	8,5	51,0

NS-12	1,0	9,0	4,0	0,0	1,5	0,0	2,0	19,0
NS-13	8,0	3,0	9,5	0,0	1,0	0,0	1,5	23,5
NS-14	19,5	2,5	1,0	0,0	0,0	0,0	3,5	27,5
NS-15	16,0	4,0	18,0	6,0	0,0	0,0	24,0	68,0
NS-16	4,0	1,0	0,0	1,0	2,0	0,0	1,0	7,0
NS-17	5,0	1,0	0,0	3,0	3,5	0,0	1,0	12,0
NS-18	6,0	11,5	16,0	10,0	0,0	0,0	1,5	48,5
NS-19	4,0	1,0	2,0	0,0	0,0	0,0	1,0	8,0
NS-20	1,0	5,0	1,0	0,0	0,0	0,0	2,0	9,0
Anteil an gesamten Patho- morpho- logien %	25,9	19,9	24,5	5,8	4,8	0,5	18,6	100,0

4.5 Anilinblau

4.5.1 Problematik der Anilinblaufärbung

Bei der Auswertung ergaben sich Probleme, da die anilinblaunegativen Samenzellen nur sehr schwach gefärbt waren, was die Auszählung von 500 Spermien erschwerte.

4.5.2 Finanzieller und zeitlicher Aufwand der Anilinblaufärbung

Der Vergleich des zeitlichen und finanziellen Aufwandes aller Färbemethoden wird im Anhang in Tabelle 17 und 18 dargestellt. Die Anilinblaufärbung ist mit die schnellste der verwendeten Methoden, bei der pro Objektträger 21 Sekunden Arbeitszeit gerechnet werden muss und je Färbegang eine Vorbereitungszeit von 5 Minuten, sowie weitere 52 Minuten in Form von Inkubations- und Trocknungszeiten hinzugerechnet werden müssen (Tabelle 17). Obwohl der Preis pro gefärbtem Objektträger mit 0,73 € nicht die günstigste Methode darstellt, ist zu bemerken, dass

die angesetzte Färbelösung für mehrfache Färbedurchgänge benutzt werden kann, was die Kosten dementsprechend reduziert.

4.5.3 Auswertung der Anilinblaufärbung

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgeführt und lagen bei den Nativspermaausstrichen zwischen 0 und 1,6 % dunkelblau gefärbter und somit anilinblaupositiver Spermien, wobei bei fünf (NS-1, NS-3, NS-6, NS-9 und NS-20) der insgesamt zwanzig Ausstriche keine schlecht kondensierten Spermien gefunden werden konnten. Eine fehlerhafte Färbung konnte ausgeschlossen werden, da beim Durchmustern der Proben immer wieder positive Spermien gefunden werden konnten (Abbildung 1). Mit $0,33 \pm 0,41$ % lag der Mittelwert der Nativsamenpräparate deutlich unter dem Wert, der für die tiefgefrorenen ejakulierten Spermien ermittelt wurde ($0,75 \pm 1,2$ %).

Tabelle 3: Ergebnisse der Anilinblaufärbung von 48 verschiedenen Rüden, davon 20 Nativspermaausstrichen (NS), 20 kryokonservierte Ejakulaten (TG) und 8 aus dem Nebenhoden gewonnene kryokonservierte Spermatozoen (TG-NH)

Probennummer NS-	Anilinblaupositiv %	Probennummer TG-	Anilinblaupositiv %	Probennummer TG-NH-	Anilinblaupositiv %	Gesamte 48 Proben
1	0,0	1	5,4	1	0,8	
2	0,4	2	0,0	2	0,2	
3	0,0	3	0,0	3	0,8	
4	0,6	4	0,0	4	0,2	
5	0,4	5	0,6	5	0,6	
6	0,0	6	0,6	6	0,2	
7	1,6	7	0,4	7	0,2	

Ergebnisse

8	0,2	8	0,0	8	0,0	
9	0,0	9	1,0			
10	0,0	10	0,0			
11	0,6	11	0,8			
12	0,2	12	0,2			
13	1,2	13	0,6			
14	0,2	14	1,0			
15	0,2	15	0,6			
16	0,2	16	2,4			
17	0,4	17	0,2			
18	0,4	18	0,4			
19	0,0	19	0,8			
20	0,0	20	0,0			
\bar{x}	0,33		0,75		0,38	0,51
Var.	0,17		1,44		0,08	0,73
SD	0,41		1,20		0,29	0,85

Bei den 20 tiefgefrorenen Ejakulatproben wurde ein Maximalwert von 5,4 % nachgewiesen, wobei in sieben Proben (TG-2, TG-3, TG-4, TG-8, TG-10, TG-20, TG-NH-28) keine gefärbten Samenzellen beim Auszählen gefunden werden konnten. Weitere acht tiefgefrorene Proben von Spermien, die nach Kastration aus dem Nebenhodenschwanz gewonnen wurden, wiesen einen maximalen Anteil von 0,8 % Anilinblau-positiven Spermien auf, mit einem Mittelwert von 0,38 %. Das Mittel aller kryokonservierten Samenproben ergab 0,64 %, während die Gesamtheit aller 48 verwendeten Proben bei durchschnittlich 0,51 % lag, mit einem Median von 0,2 %.

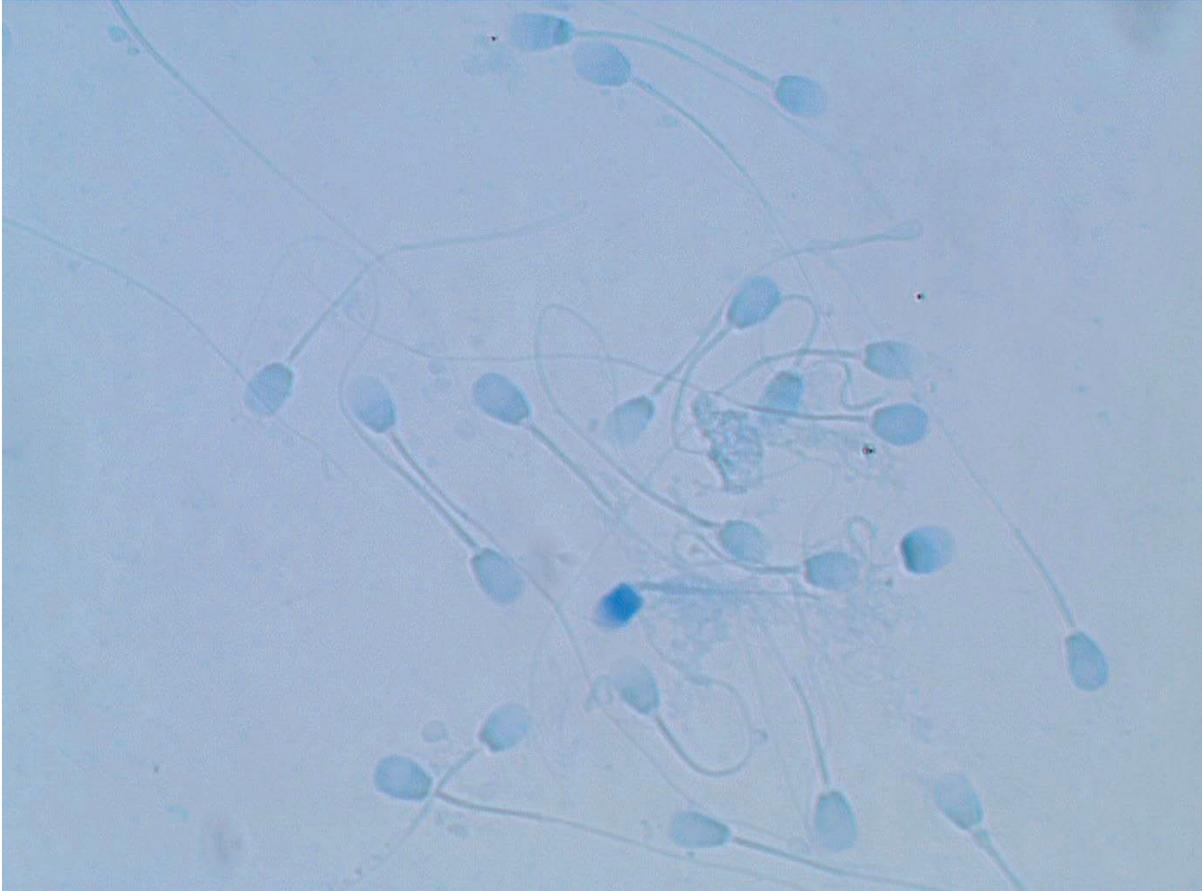


Abbildung 1: Anilinblaufärbung eines Tiefgefriersperma-Ausstriches eines Rüden, 1000fache Vergrößerung, 23 Samenzellen mit zentral einem positiv gefärbten Spermium

4.6 Toluidinblau

4.6.1 Problematik der Toluidinblaufärbung

Im Vergleich zur Anilinblaufärbung gestaltete sich die Auswertung der Toluidinblaufärbung als einfacher, da die ungefärbten Spermatozoen deutlich besser gefärbt sind als im Anilinblautest. Zu dem scheint das Ansprechen der positiven Spermien eindeutiger, da der metachromatische Farbstoff dunkellila Spermien hervorbringt, die sich gut von den hellblauen negativen Samenzellen abgrenzen lassen (Abbildung 2).

4.6.2 Finanzieller und zeitlicher Aufwand der Toluidinblaufärbung

Ähnlich wie bei der Anilinblaufärbung gestaltete sich die Färbung mit Toluidinblau als schnell und im Vergleich zu den fluoreszenzmikroskopischen Färbemethoden kostengünstig. Allerdings werden zusätzliche Arbeitsschritte wie z. B. Hydrolyse nach Fixierung, sowie Dehydrierung und Klärung benötigt. Dies ergibt eine Verdopplung der Arbeitszeit zum Anfertigen der Ausstrichpräparate, welche bei 49 Sekunden pro Objektträger exklusive einer 15 minütigen Vorbereitungsphase, sowie Wartezeiten (Inkubation, Trocknung) von 72 Minuten liegt. Auch der finanzielle Aufwand erhöht sich auf 1,72 €. Die Substanzen zur Dehydrierung und Klärung (Butanol, Xylol) könnten zur Kostenreduzierung auch für mehrere Färbevorgänge verwendet werden.

4.6.3 Auswertung der Toluidinblaufärbung

Die Ergebnisse lagen bei den Nativspermaausstrichen zwischen 0 und 3,4 % (Tabelle 4), wobei der Rüde (NS-7) mit dem zweithöchsten Anteil toluidinblaupositiver Spermien, auch den höchsten Wert bei der Anilinblaufärbung zeigte. Der Mittelwert der tiefgefrorenen Ejakulate lag bei 1,3 %, wobei eine Spannbreite zwischen 0,6 % und 6 % zu finden war. Bei der Untersuchung der Nebenhodenspermienpräparate wurde bei einem Rüden der Maximalwert von 9 % positive Spermien gefunden bei einem durchschnittlichen Wert von 2,33 %. Alle 48 Proben ergaben im Mittel 1,31 % mit einem Median von 0,8 % toluidinblaupositiver Spermien.

Tabelle 4: Ergebnis der Toluidinblaufärbung von 20 Nativspermaausstrichen (NS), 20 Tiefgefrierspermaausstrichen (TG) und 8 Nebenhodenspermaausstrichen (TG-NH) verschiedener Rüden

Probennummer NS-	Toluidinblau- positiv %	Probennummer TG-	Toluidinblau- positiv %	Probennummer TG-NH-	Toluidinblau- positiv %	Gesamte 48 Proben
1	0,8	1	6,0	1	9,0	
2	1,0	2	1,2	2	0,6	
3	0,4	3	0,2	3	1,0	
4	0,4	4	1,0	4	0,2	
5	1,2	5	0,6	5	0,8	
6	0,6	6	0,6	6	4,2	
7	2,4	7	1,4	7	1,4	
8	0,0	8	1,0	8	1,4	
9	0,2	12	1,0			
10	0,6	13	0,4			
11	1,4	14	1,0			
12	2,0	15	0,4			
13	1,4	16	0,6			
14	0,0	17	1,6			
15	3,4	18	0,6			
16	0,8	19	4,6			
17	0,4	20	1,0			
18	0,8		0,6			
19	0,2		1,8			
20	0,4		0,4			
\bar{x}	0,92		1,30		2,33	1,31
Var.	0,71		1,99		7,67	2,64
SD	0,84		1,41		2,77	1,62

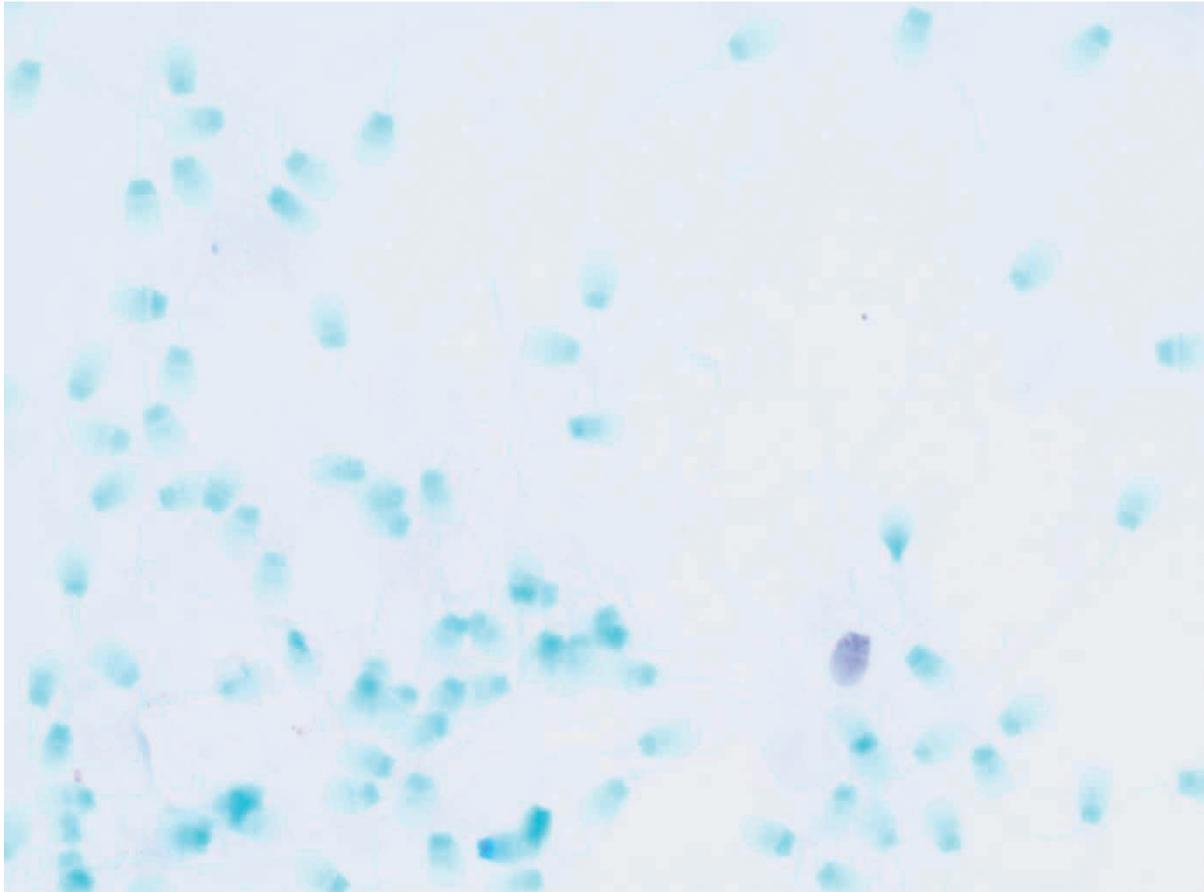


Abbildung 2: Toluidinblaufärbung eines caninen Nativspermapräparates, 1000fache Vergrößerung mit Immersionsöl. Zu sehen ist die deutliche Metachromasie und der gute Kontrast zwischen hellblauen negativen Samen und toluidinblaupositivem, lila Spermium.

4.7 Chromomycin A3

4.7.1 Problematik der CMA3-Färbung

Beim Umgang mit Chromomycin A3 sollte sehr vorsichtig vorgegangen werden, da der Stoff laut Sicherheitsdatenblatt sowohl als „sehr giftig“ eingestuft wird und außerdem als fruchtbarkeitsgefährdend gilt. Die Auswertung gestaltete sich einfach, da sowohl die reifen Spermatozoen ohne CMA3-Einlagerung gut zählbar waren als

auch die positiven Spermien deutlich gegenüber den restlichen Spermien hervortraten und somit sicher angesprochen werden konnten (Abbildung 3). Im Gegensatz zum Akridinorangetest, Caspase-3-Nachweis und TUNEL-Test wurde bei der CMA3-Färbung nur ein geringes Verblässen der Fluoreszenz im Verlauf der Untersuchung beobachtet. Die Ausstriche waren nach Lagerung bei -18 °C im Dunkeln auch wochenlang nach der Färbung noch auswertbar

4.7.2 Finanzieller und zeitlicher Aufwand der CMA3-Färbung

Mit 0,58 € ist der finanzielle Aufwand der CMA3-Färbung mit Akridinorange die drittgünstigste der getesteten fluoreszenzmikroskopischen Färbemethoden. Der sehr geringe Zeitaufwand kommt als weiterer Vorteil hinzu, da pro Objektträger nur 21 Sekunden benötigt werden. Während der 160 minütigen Fixierungs- und Trocknungszeit, können andere Laborarbeiten verrichtet werden.

4.7.3 Auswertung der CMA3-Färbung.

Wie in Tabelle 5 aufgeführt lag der Maximalwert bei den Nativspermaausstrichen bei 3,6 % (NS-5), während bei den tiefgefrorenen Proben bei einem Rüden (TG-1) ein Maximalwert von 8,0 % CMA3-positiver Spermien ausgewertet wurde. Alle acht aus dem Nebenhodenschwanz gewonnenen Proben lagen zwischen 0 und 2,0 % mit einem Mittelwert von 0,88 %. Durchschnittlich wurden bei allen untersuchten Präparaten 1,09 % CMA3-positiver Spermien erreicht. Dabei unterschritt der Mittelwert der Nativsamenproben von 0,90 % diesen Wert, während die kryokonservierten Präparate (Ejakulate und Nebenhoden) im Durchschnitt 1,22 % erreichten. Der Median der CMA3-positiven Spermien aller untersuchten Rüden lag bei 0,8 %.

Tabelle 5: Ergebnisse der CMA3-Färbemethode. Übersicht über 20 canine Nativsamenproben (NS) und 20 Tiefgefrierproben aus Ejakulaten (TG) sowie 8 aus dem Nebenhodenschwanz gewonnene kryokonservierte Samenproben (TG-NH)

Probennummer NS-	ChromomycinA3 positiv %	Probennummer TG-	ChromomycinA3 positiv %	Probennummer TG-NH-	ChromomycinA3 positiv %	Gesamte 48 Proben
1	0,8	1	8,0	1	2,0	
2	1,4	2	0,2	2	0,8	
3	0,0	3	0,8	3	1,0	
4	1,4	4	0,4	4	0,4	
5	3,6	5	1,0	5	0,2	
6	0,8	6	0,4	6	1,2	
7	1,0	7	0,2	7	0,8	
8	0,0	8	1,6	8	0,6	
9	0,0	9	3,6			
10	0,8	10	0,6			
11	1,4	11	1,8			
12	1,2	12	0,2			
13	0,4	13	0,8			
14	0,8	14	0,4			
15	1,0	15	0,2			
16	0,2	16	3,0			
17	0,8	17	0,6			
18	1,6	18	1,4			
19	0,4	19	1,0			
20	0,4	20	1,0			
\bar{x}	0,90		1,36		0,88	1,09
Var.	0,62		3,12		0,27	1,65
SD	0,79		1,77		0,52	1,29

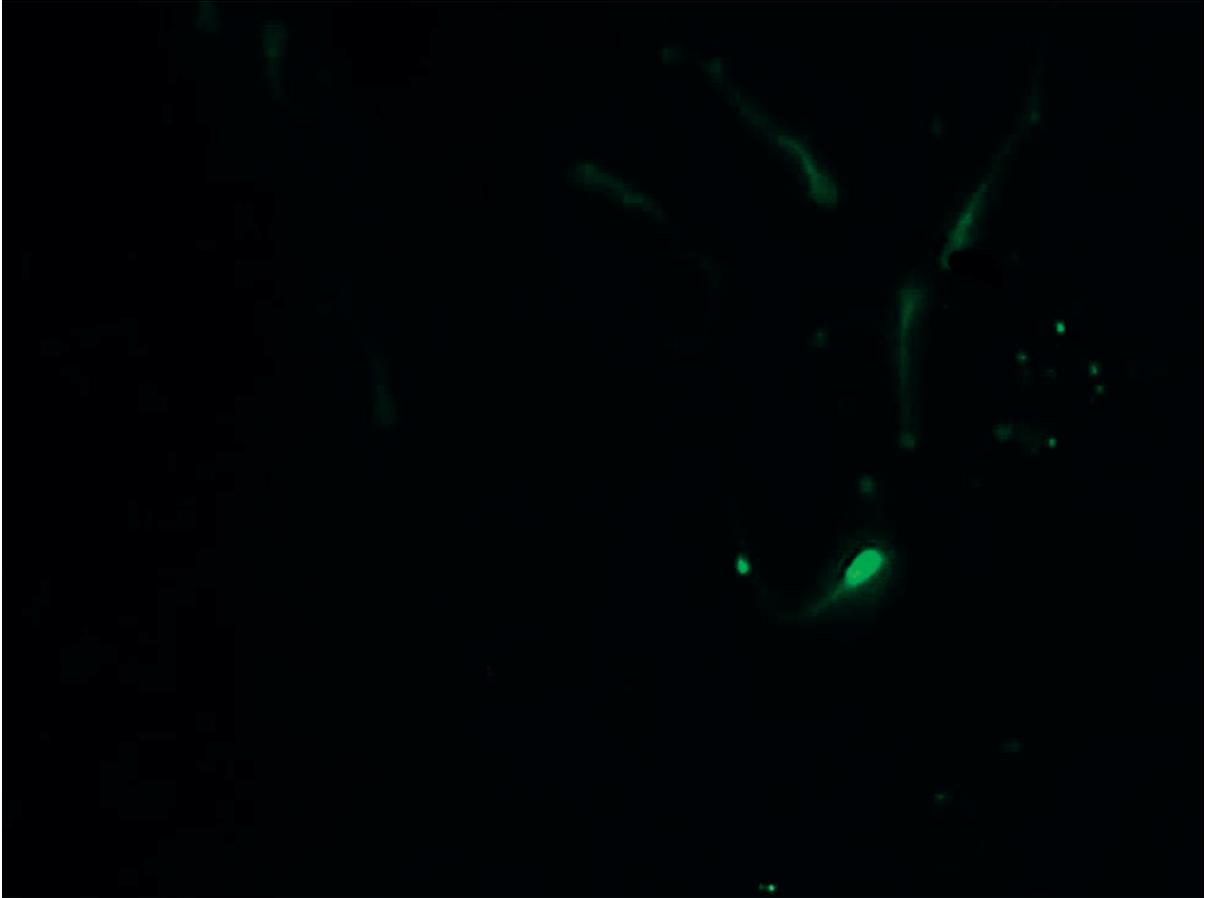


Abbildung 3: ChromomycinA3-Färbung einer Nativsamenprobe eines Rüden bei 1000facher Vergrößerung. Zu sehen sind sechs nicht fluoreszierende Samenzellen und ein CMA3-gefärbtes fluoreszierendes Spermium.

4.8. Akridinorangetest

4.8.1 Problematik der Akridinorangefärbung

Bei Beurteilung der Akridinorange-gefärbten Präparate traten unterschiedliche Probleme auf. Zunächst musste der Objektträger in der Übersicht durchmustert werden, um Areale zu finden, die gleichmäßig gefärbt waren, d. h. Stellen, in denen rote und grüne Spermien nebeneinander lagen (Abbildung 4). Es fand häufig eine Arealbildung statt, wobei in bestimmten Bereichen des Objektträgers nur orange und

rote Spermien zu sehen waren, während sich angrenzende Bereiche grün darstellten (Abbildung 5).

Als Vorteil gegenüber des mfSCSA ist die Möglichkeit der Verwendung sprühfixierter Ausstrichpräparate zu nennen, da Proben somit für einen Färbedurchgang gesammelt werden können um den Kosten- und Zeitaufwand zu reduzieren.

4.8.2 Finanzieller und zeitlicher Aufwand des AOT

Der Akridinorangetest stellt mit 0,12 € die günstigste der untersuchten Methoden dar und ist gleichzeitig mit dem geringsten Arbeitsaufwand verbunden. Durchschnittlich werden 19 Sekunden pro Objektträger zum Fixieren und Färben benötigt, bei einer ca. 13 minütigen Vorbereitungszeit und insgesamt 147 Minuten Inkubations- und Trocknungszeit, welche für andere Tätigkeiten zur Verfügung steht.

4.8.3 Auswertung des AOT

Bei der Untersuchung von zwanzig Nativsamenproben wurden durchschnittlich 1,28 % chromatininstabile Samenzellen gefunden (Tabelle 6), während der Mittelwert bei den kryokonservierten Präparaten bei 1,94 % lag. Bei dem Maximalwert von 8,2 % handelte es sich um eine kryokonservierte Probe aus dem Nebenhodenschwanz gewonnener Spermien (TG-NH-1). Der höchste ermittelte Wert der Nativsamenprobe lag mit 3,6 % (NS-7) deutlich darunter. Die kryokonservierten Nebenhodenspermien wiesen im Mittel 2,53 % rote Zellen auf und der Mittelwert des TG-Spermas lag bei 1,71 % (Tabelle 6). Der Median liegt beim Einbeziehen aller 48 Samenproben bei 1,1 %.

Tabelle 6: Vergleich der Untersuchungsergebnisse zwei unterschiedlicher Färbemethoden mittels Akridinorange: AOT und modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatinstrukturassay (mfSCSA) anhand 20 Nativsamenproben (NS), 20 Tiefgefrierspermaproben (TG) und 8 Nebenhodenspermaausstrichen (TG-NH) von 48 bzw. 28 verschiedenen Rüden

Probennummer NS-	AOT positiv %	mfSCSA positiv %	Probennummer TG-	AOT positiv %	mfSCSA positiv %	Probennummer TG-NH-	AOT positiv %	mfSCSA positive %	Gesamte 48 Proben AOT	Gesamte 28 Proben mfSCSA
1	0,4	*	1	7,0	7,8	1	8,2	1,0		
2	0,8	*	2	0,4	0,2	2	0,6	0,2		
3	0,0	*	3	1,0	5,6	3	2,2	1,2		
4	2,0	*	4	0,4	0,2	4	1,4	0,4		
5	3,0	*	5	4,0	0,8	5	2,6	0,2		
6	1,4	*	6	0,2	0,0	6	0,6	1,0		
7	3,6	*	7	0,0	0,2	7	2,0	0,0		
8	1,4	*	8	0,6	0,4	8	2,6	0,2		
9	0,2	*	9	1,0	1,2					
10	0,6	*	10	0,4	1,6					
11	2,0	*	11	0,8	0,6					
12	1,2	*	12	0,2	0,4					
13	0,6	*	13	1,6	1,8					
14	0,4	*	14	1,6	2,6					
15	1,0	*	15	0,4	1,2					
16	0,6	*	16	8,0	1,4					
17	1,6	*	17	1,2	1,0					
18	2,4	*	18	2,6	1,2					
19	2,0	*	19	2,0	1,4					
20	0,4	*	20	0,8	1,6					
\bar{x}	1,28			1,71	1,56		2,53	0,53	1,67	1,26
Var.	0,91			4,61	3,47		5,16	0,19	3,34	1,99
SD	0,95			2,15	1,86		2,27	0,44	1,83	1,66

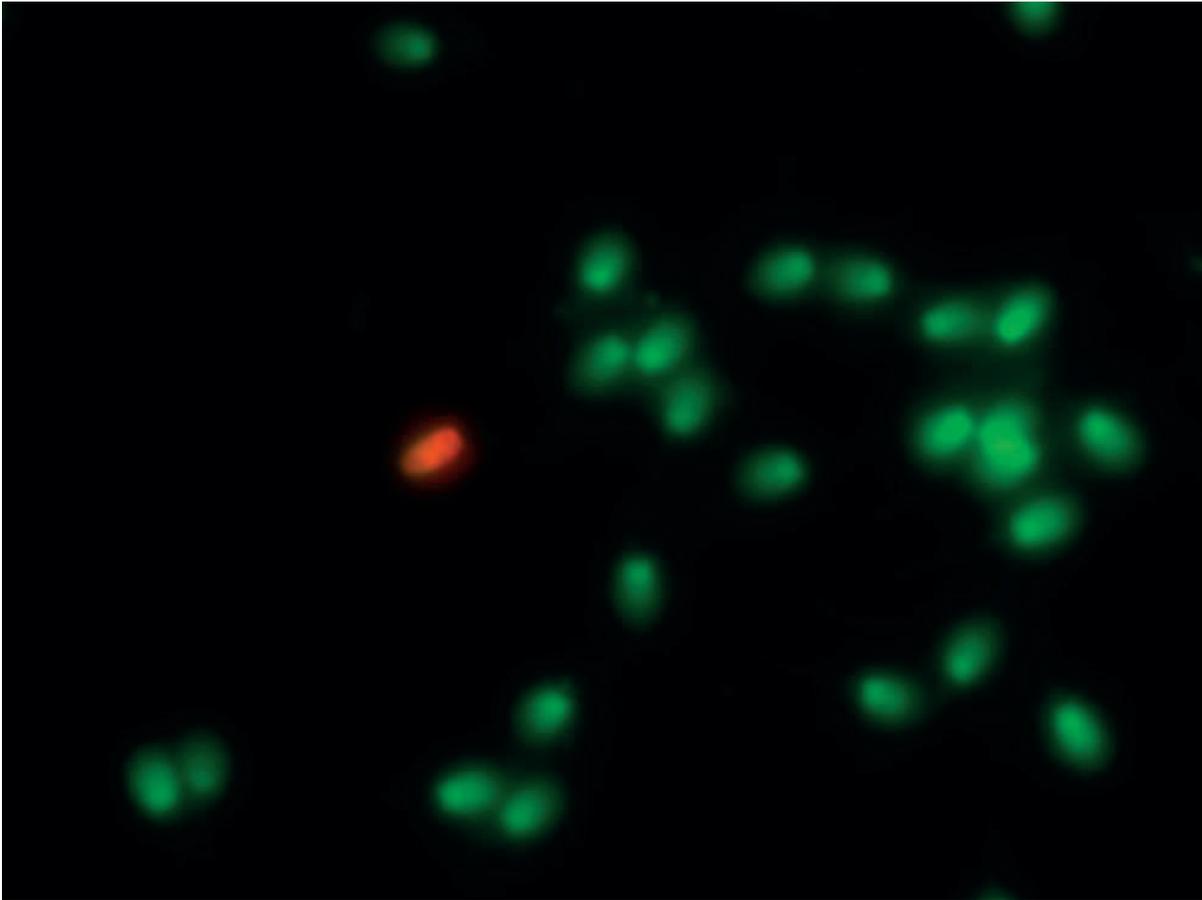


Abbildung 4: Darstellung eines akridinorangegefärbten Ausstriches einer caninen Tiefgefrierspermaprobe bei 1000facher Vergrößerung. Zu sehen ist ein guter Kontrast zwischen grünen Spermien mit stabiler DNA und einem roten Spermium mit denaturierter DNA.

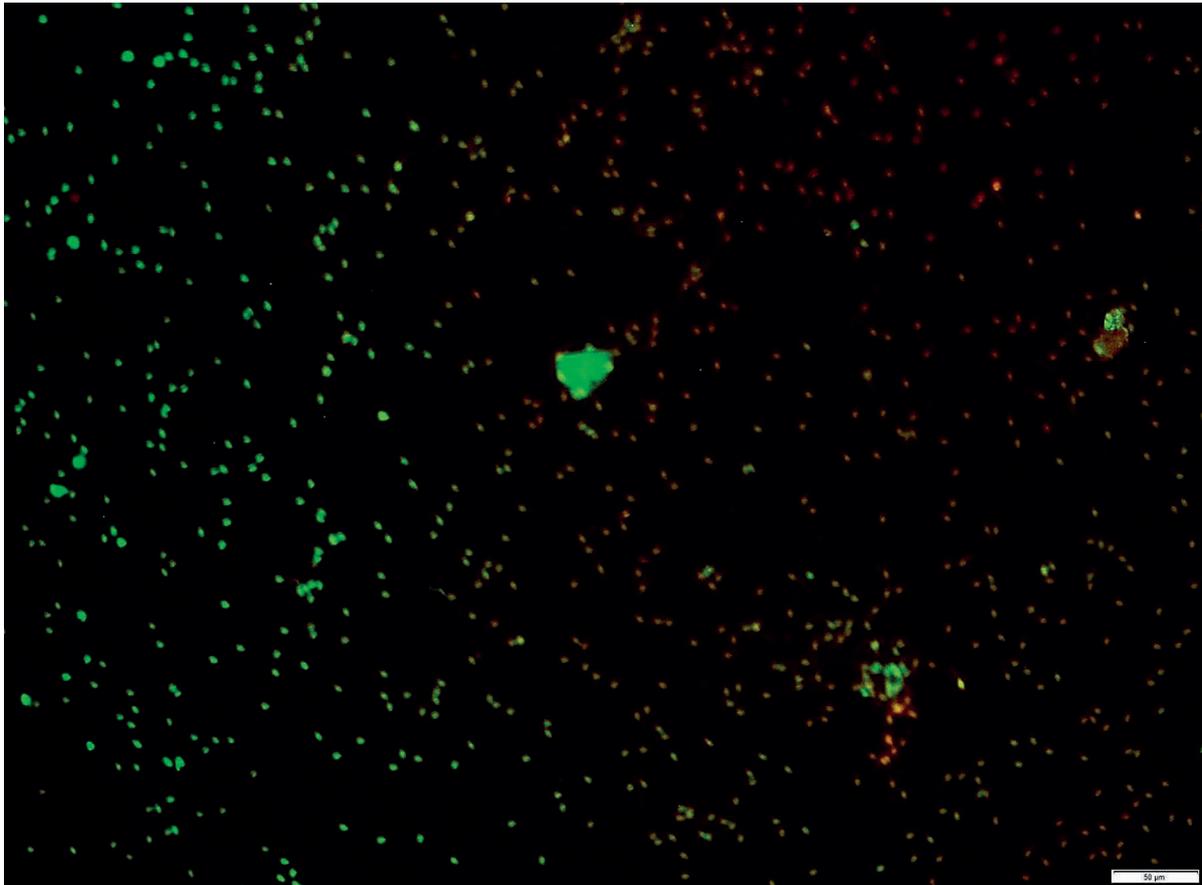


Abbildung 5: Darstellung von Beurteilungsschwierigkeiten durch ungleichmäßige Akridinorangefärbung eines Tiefgefrierspermaausriches eines Rüden. Zu sehen ist bei 100facher Vergrößerung eine rote Arealbildung im rechten oberen Bildbereich im Vergleich zum grünen Areal in der linken Bildhälfte.

4.9 Modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatinstruktur-Assay (mfSCSA)

4.9.1 Problematik des mfSCSA

Dieses Verfahren konnte nur für die frisch angefertigten Ausstriche der aufgetauten Samenproben verwendet werden, da es nicht für sprühfixierte Präparate etabliert ist und zwischen dem Anfertigen der Nativsamenausstriche und den Färbevorgängen sowohl eine zeitliche als auch eine räumliche Trennung vorlag.

Da die Präparate unmittelbar nach dem Ausstreichen behandelt und gefärbt werden müssen, können keine Proben für größere Färbedurchgänge gesammelt werden, was als deutlicher Nachteil zu werten ist. In der Abbildung 6 ist ein mittels mfSCSA gefärbter Ausstrich guter Qualität zu sehen, wobei die beim AOT beschriebene Arealbildung auch beim mfSCSA beobachtet wurde.

4.9.2 Finanzieller und zeitlicher Aufwand des mfSCSA

Pro gefärbten Objektträger entstehen beim modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstrukturassay Materialkosten von 0,24 €. Auch der zeitliche Aufwand ist mit 46 Sekunden pro Objektträger, einer pauschalen Vorbereitungszeit von ca. 23 Minuten und zuzüglicher Wartezeit gesteigert. Somit ist der mfSCSA nach dem Nachweis der Caspase-3-Aktivität die zeitaufwendigste Methode. Die Angaben über Materialkosten und Zeitaufwand richten sich nach einem Färbedurchlauf von ca. 20 Objektträgern, wodurch sich die Kosten beim Färben einzelner Präparate deutlich erhöhen.

4.9.3. Auswertung des mfSCSA

Mittels mfSCSA untersuchte Samenproben zeigten, wie in Tabelle 6 aufgeführt, durchschnittlich einen Wert von 1,26 % säuredenaturierter Spermien. Der Maximalwert im mfSCSA lag bei 7,8 % (TG-1). Die kryokonservierten Ejakulate zeigten im Mittel 1,56 % rote Spermatozoen, während der Wert der Nebenhodenspermien bei 0,53 % lag. Der Median aller Rüden lag bei 1,0 % säureinstabiler Spermatozoen.

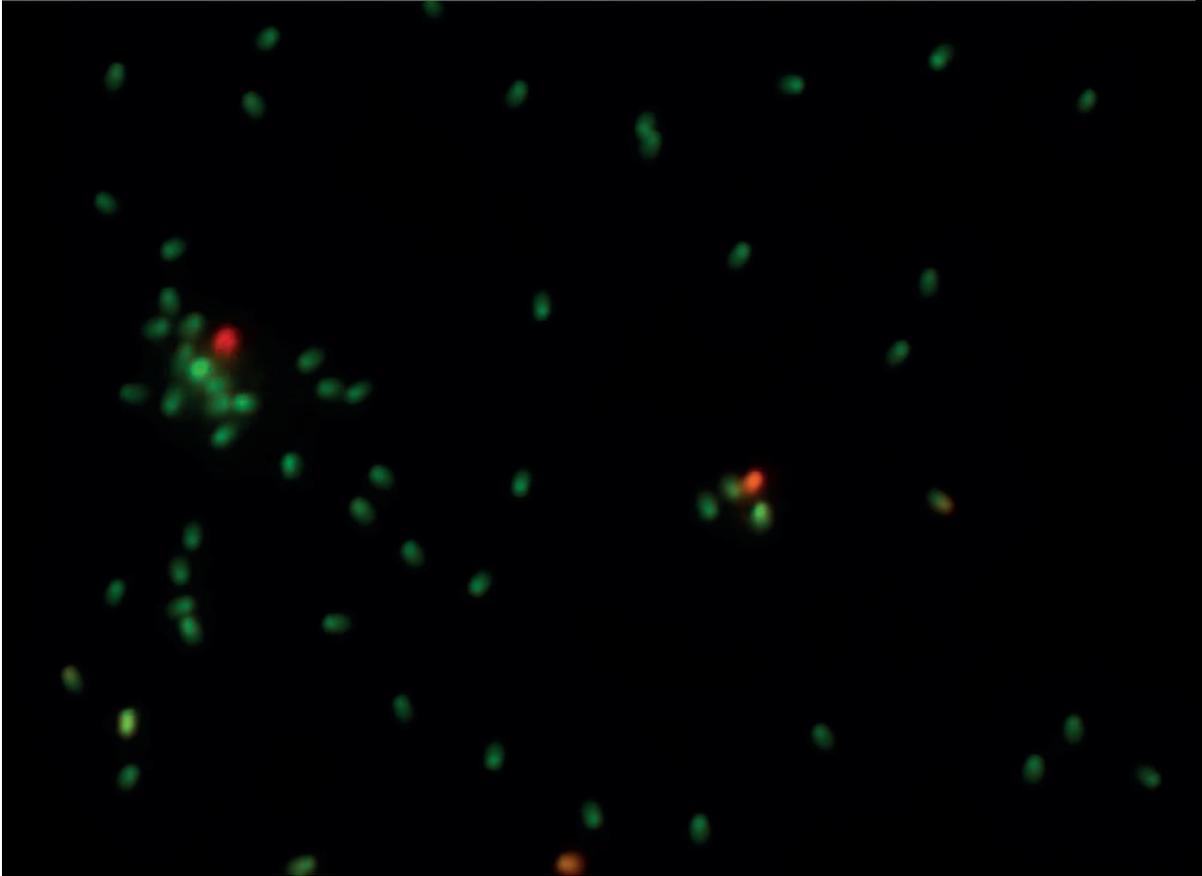


Abbildung 6: mfSCSA gefärbter TG-Spermaausstrich eines Rüden bei 400er Vergrößerung. Zu sehen sind überwiegend chromatininstabile (grüne) Spermatozoen mit drei chromatininstabilen Spermien (zweimal orange, einmal rot).

4.10 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling assay (TUNEL)

4.10.1 Problematik des TUNEL-Tests

Abgesehen von der langen Inkubation über Nacht, gestaltete sich der TUNEL-Test relativ einfach. Die Auswertung erfordert mehr Zeit als bei den übrigen Tests, da aufgrund der DAPI-Gegenfärbung immer zunächst in jedem Filter mit der Digitalkamera Bilder aufgenommen und zusammengeführt werden müssen, da sich die TUNEL-positiven Spermien im grünen FITC-Filter schlecht von den übrigen Samenzellen abheben. Abbildungen 7 und 8 verdeutlichen die Gegenfärbung mittels DAPI, bei der die Spermienzellen ohne DNA-Fragmentierung blau dargestellt sind. Hierbei ist darauf zu achten die Belichtungszeit kurz zu halten um kein vorzeitiges

Verblasen der Fluoreszenz zu vermeiden. Eine Positivkontrolle mit experimenteller DNA-Fragmentierung, bei der alle Spermien eine Anlagerung des grünen Fluoreszenzfarbstoffes zeigen wird in Abbildung 9 dargestellt. Wie bei allen Fluoreszenzfärbemethoden muss ein lichtgeschützter Raum zum Anfertigen der Proben zur Verfügung stehen.

4.10.2 Finanzieller und zeitlicher Aufwand des TUNEL-Test

Der TdT-mediated dUTP nick end labeling-Assay ist mit mehr als 5 Euro pro Ausstrich die teuerste der angewandten Methoden. Der Zeitaufwand für die TUNEL-Färbung mit 30 Sekunden pro Objektträger und einer Vorbereitungsphase von ca. 13 Minuten ist moderat, wobei zu beachten ist, dass eine Inkubationszeit über Nacht eingeplant werden muss.

4.10.3 Auswertung des TUNEL-Tests

Im Mittel lagen die Nativsamenproben bei 0,95 % TUNEL-positiver Spermien und die kryokonservierten Ejakulate bei durchschnittlich 1,42 %, während die tiefgefrorenen Nebenhodenspermien bei 0,7 % DNA-fragmentierten Spermien lagen .

Alle untersuchten Proben enthielten im Mittel 1,1 % Spermien mit DNA-Fragmentierung, wobei ein Maximalwert von 9,8 % (NS-13) ermittelt wurde, während bei einer von 20 TG-Proben und bei sechs der zwanzig Nativsamenproben beim Auszählen von 500 Spermien keine TUNEL-positive Zelle gefunden wurden (Tabelle 7). Der Median lag bei 0,4 %.

Tabelle 7: Ergebnisübersicht der TUNEL-gefärbten Samenproben, 20 Nativsamenproben (NS), 20 tiefgefrorene Ejakulate (TG), 8 tiefgefrorene Nebenhodenspermien (TG-NH). \bar{x} : arithmetrischer Mittelwert; Var.: Varianz; SD: Standardabweichung

Probennummer NS-	TUNEL positiv %	Probennummer TG-	TUNEL positiv %	Probennummer TG-NH-	TUNEL positiv %
1	0,0	1	4,0	1	1,0
2	0,2	2	1,0	2	0,4
3	0,0	3	6,2	3	1,0
4	0,0	4	0,4	4	0,6
5	0,6	5	0,0	5	0,8
6	0,0	6	1,4	6	0,0
7	1,2	7	0,4	7	0,6
8	0,2	8	1,0	8	1,0
9	0,0	9	1,0		
10	0,0	10	1,0		
11	0,6	11	2,0		
12	1,0	12	0,4		
13	9,8	13	0,2		
14	1,2	14	0,6		
15	1,0	15	1,0		
16	0,6	16	4,2		
17	0,8	17	0,6		

Ergebnisse

18	0,4	18	1,8		
19	0,4	19	0,8		
20	1,0	20	0,4		
\bar{x}	0,95		1,42		0,70
Var.	4,30		2,40		0,13
SD	2,07		1,55		0,36

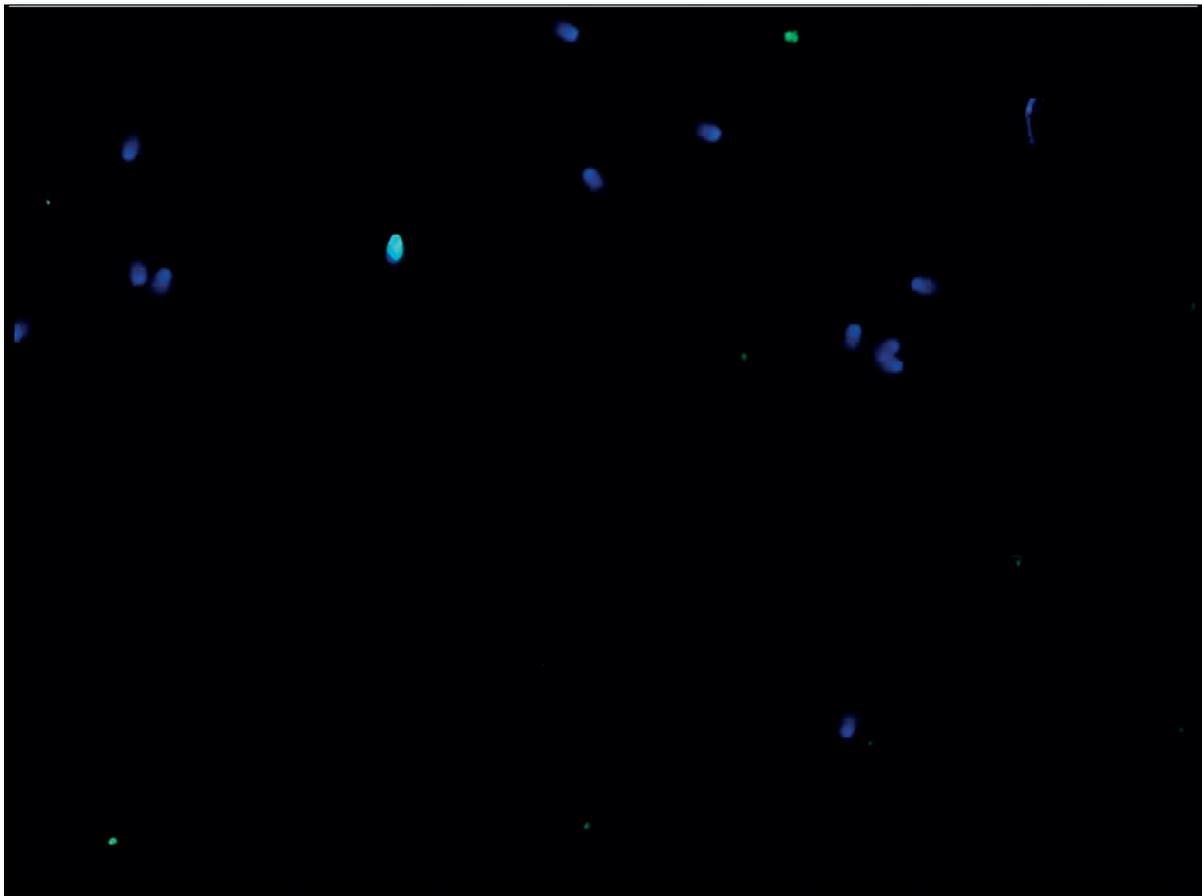


Abbildung 7: TUNEL gefärbter Tiefgefriersperma-Ausstrich eines Rüden. Zu sehen sind 13 Spermatozoen bei 400facher Vergrößerung, welche durch DAPI blau gefärbt sind, während eine Zelle im linken oberen Bildviertel grün, also mit fragmentierter DNA dargestellt wird.

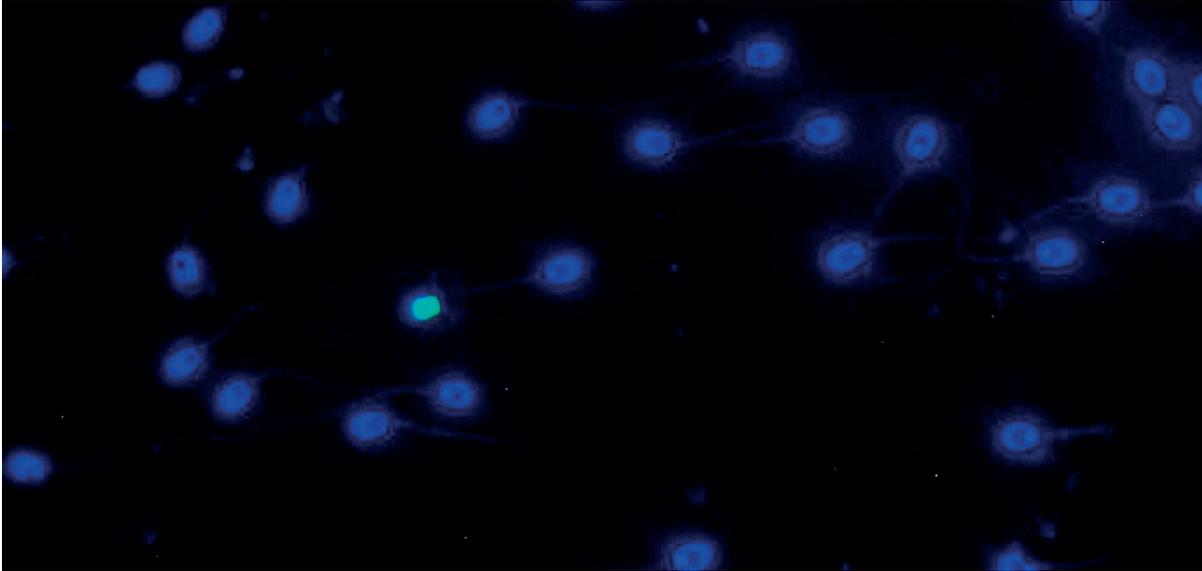


Abbildung 8: TUNEL gefärbter Tiefgefriersperma-Ausstrich eines Rüden. Es wird ein Ausschnitt des Objektträgers bei 1000facher Vergrößerung dargestellt, wobei ein deutlicher Kontrast zwischen grünem TUNEL-positivem Spermium und blauen mittels DAPI gegengefärbten Spermien ohne DNA-Fragmentierung besteht.

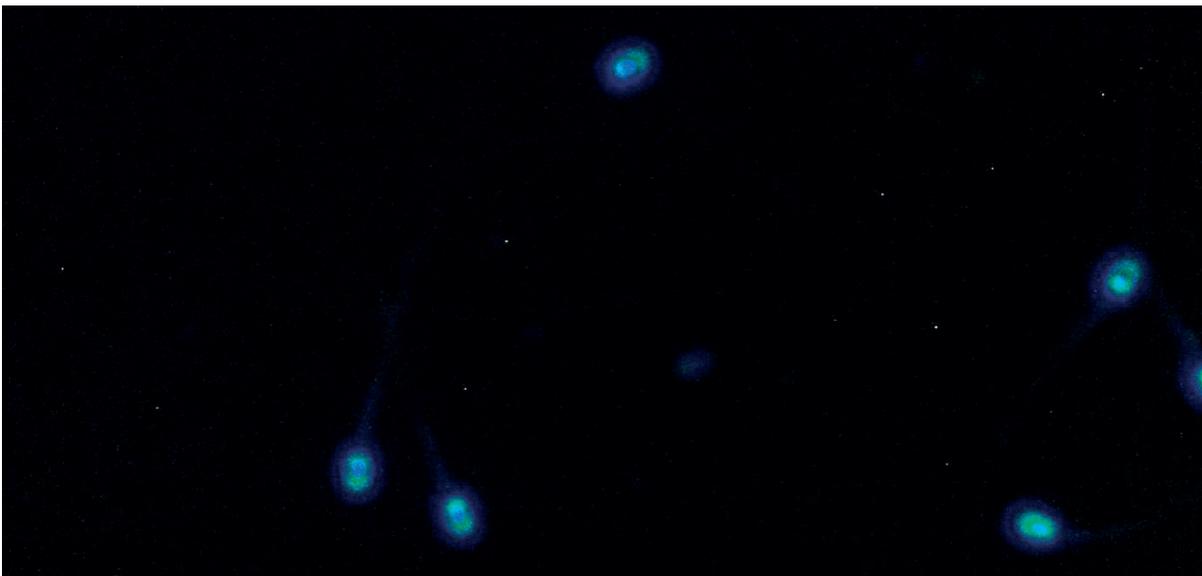


Abbildung 9: Positivkontrolle eines TUNEL- gefärbten Tiefgefriersperma-Ausstriches eines Rüden mittels DNase. Alle abgebildeten Spermien zeigen grüne Fluoreszenz als Hinweis auf DNA-Fragmentierung

4.11 Caspase-3-Nachweis

4.11.1 Problematik des Caspase-3-Nachweises

Aufgrund des sehr geringen Anteils Caspase-3-aktiver Spermatozoen und einer schlechten Darstellung der übrigen Spermien stellte sich bei der Auswertung die Frage, ob die Färbung erfolgreich war. Zudem musste darauf geachtet werden, die Auswertung im zentralen Bereich des Objektträgers vorzunehmen, da hier offensichtlich eine bessere Verteilung der Antikörper bzw. eine ausreichende Antikörperkonzentration erreicht wurde (Abbildung 10).

4.11.2 Finanzieller und zeitlicher Aufwand des Caspase-3-Nachweises

Da beim Nachweis aktiver Caspase-3 eine starke Verdünnung der im Kit enthaltenen Antikörper stattgefunden hat und die Antikörpermenge pro Objektträger auf das Mindestmaß reduziert wurde, waren die Kosten pro Objektträger mit 2 Euro geringer als beim TUNEL. Es wurde der maximale vom Hersteller empfohlene Verdünnungsfaktor gewählt. Im Vorversuch konnte kein Unterschied zu einer minimalen Verdünnung gefunden werden, bei der die Materialkosten bei ca. 6 € pro Objektträger lägen.

Der Zeitaufwand ist bei dieser Methode im Vergleich zu den übrigen Methoden mit 56 Sekunden reiner Bearbeitungszeit pro Objektträger am größten. Zusätzlich wird zur Fixation eine Inkubation über Nacht sowie weitere Inkubations- und Wartezeiten von insgesamt 225 Minuten nach einer vorherigen Vorbereitungszeit von ca. 15 Minuten benötigt.

4.11.3 Auswertung des Caspase-3-Nachweises

Die fluoreszenzmikroskopische Färbemethode zum Nachweis apoptotischer Zellen erbrachte am wenigsten positive Spermien aller getesteten Methoden. Durchschnittlich 0,3 % der untersuchten Zellen wiesen eine Caspase-3-Aktivität auf mit einem Median von 0,2 %. Auffällig war hierbei, dass bei 18 der 48 untersuchten

Proben beim Auszählen von jeweils 500 Zellen keine gefärbten Spermien nachgewiesen werden konnten und der Maximalwert von 2,0 % (NS-15) verhältnismäßig niedrig war. Kryokonservierte Ejakulate wiesen im Mittel eine Caspaseaktivität von 0,29 % auf, während tiefgefrorene Nebenhodenspermien bei 0,45 % lagen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Prozentsatz Caspase-3-positiver Spermien von 20 caninen Nativsamenproben (NS), 20 kryokonservierten Ejakulaten (TG) und 8 aus dem Nebenhoden gewonnener kryokonservierter Samenproben (TG-NH). \bar{x} : arithmetrischer Mittelwert; Var.: Varianz; SD: Standardabweichung

Probennummer NS-	Caspase-3- Nachweis %	Probennummer TG-	Caspase-3- Nachweis %	Probennummer TG-NH-	Caspase-3- Nachweis %
1	0,2	1	0,2	1	0,4
2	0,6	2	0,0	2	0,6
3	0,0	3	0,0	3	1,2
4	0,0	4	0,0	4	0,6
5	0,2	5	0,0	5	0,0
6	0,2	6	0,8	6	0,0
7	0,0	7	0,6	7	0,2
8	0,6	8	0,2	8	0,6
9	0,0	9	0,0		
10	0,6	10	0,0		
11	0,2	11	0,0		
12	0,0	12	0,0		
13	0,2	13	0,4		
14	0,4	14	0,0		
15	2,0	15	0,6		
16	0,0	16	1,2		
17	0,0	17	0,8		
18	0,4	18	0,4		
19	0,2	19	0,4		
20	0,2	20	0,2		
\bar{x}	0,30		0,29		0,45
Var.	0,19		0,12		0,14
SD	0,44		0,34		0,37



Abbildung 10: Darstellung eines caninen Spermiums mit aktiver Caspase-3 im linken oberen Bildbereich. Die übrigen Spermien der Tiefgefrierprobe zeigen keine Fluoreszenz und somit keine Caspaseaktivität bei 1000facher Vergrößerung.

4.12 Ergebnisse der computerassistierten Samenanalyse

Wie in Tabelle 9 dargestellt lag die Vorwärtsbeweglichkeit bei 12 Proben über 75,0 %. Lediglich Probe NS-5 wies eine Vorwärtsbeweglichkeit von 17,2 % auf, welche gemäß der mikroskopischen Schätzung bei 90,0% lag. Es wurde ein Höchstwert von 99,7 % (NS-19) progressiv motiler Spermien von der Software ermittelt, welcher den mikroskopisch erfassten Wert von 80,0 % deutlich überschritt.

Tabelle 9: Ergebnisübersicht der computer assistierten Samenanalyse von 13 caninen Nativsamenproben (NS). promotil: Progressiv motile Spermien; Konz.: Konzentration, ALH: amplitude of lateral head displacement; WOB: wobble; LIN: Linearität; STR: straightness; VSL: straight-line velocity; VCL: curvilinear velocity; VAP: verage path velocity; DSL: distance straight line; DCL: distance curve line; DAP: distance average path; TC; Total Cells

Proben-Nr NS-	1	2	3	4	5	6	7	8	12	17	18	19	20
ALH	8,0	6,2	7,2	6,8	4,9	6,9	3,9	6,0					
WOB	0,5	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,8	0,6					
LIN	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,7	0,5					
STR	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,9	0,8					
VSL	68	59	69	74	38	68	123	82					
VCL	194	130	183	160	109	151	168	159					
VAP	102	79	96	100	51	94	135	101					
DSL	28	24	29	31	17	28	54	35					
DCL	80	55	77	67	48	64	74	68					
DAP	42	33	40	42	22	39	59	43					
TC	1268	759	636	753	175	762	127	316					
promotil %	90,4	76,1	81,8	86,3	17,2	83,9	77,7	81,8	91,9	92,7	77,4	99,7	93,5
motil %	95,7	83,6	87,7	90,7	30,4	89,5	79,3	85,9	95,0	97,5	83,3	99,9	95,0
Konz. 10 ⁹ /ml	0,5	0,6	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,5	0,4

4.13 Statistische Auswertung

Sowohl bei den Nativsamenproben und Tiefgefrierproben als auch für die Nebenhodenspermien existieren globale Unterschiede beim Vergleich aller Färbemethoden, die mittels einfaktorieller Varianzanalyse ermittelt wurden. Das heißt die Färbemethoden sind aufgrund ihrer Resultate nicht gleichwertig, sondern es liegen statistisch relevante Unterschiede vor. Es kann nicht pauschal vom Ergebnis einer Färbemethode auf das Resultat einer anderen Methode geschlossen werden.

Anschließend erfolgte ein paarweiser Vergleich aller Gruppen-Mittelwerte nach Student-Newman-Keuls (Posthoc), bei dem es zu folgenden Ergebnissen kam:

Signifikante Unterschiede mit $p < 0,01$ ergaben sich, wie in Tabelle 10 angegeben, zwischen folgenden Färbemethoden: Für die Nativsamenproben unterscheidet sich die Toluidinblaufärbung signifikant von der Caspase-3-Aktivität und Anilinblaufärbung.

Ebenso unterscheiden sich die Ergebnisse der Chromomycin A3-Färbung signifikant von denen der Caspase-3-Aktivität und der Anilinblaufärbung. Des Weiteren besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Akridinorange-Färbung und der Caspase-3-Aktivität, sowie Anilinblaufärbung.

Für das tiefgefrorene Probenmaterial gelten für die CMA3-Färbung die gleichen signifikanten Unterschiede. Ebenso differenziert sich die Caspase-3-Aktivität neben den genannten Färbungen signifikant mit $p < 0,01$ von der TUNEL-Färbung und dem mfSCSA (Tabelle 11). Zudem unterscheiden sich die Ergebnisse des Anilinblautests und der TUNEL-Färbung signifikant mit $p < 0,01$ und es liegen Differenzen mit $p < 0,05$ zwischen Anilinblau und Toluidinblau, AOT, Caspase und mfSCSA vor.

In Tabelle 12 sind die signifikanten Unterschiede der Färbemethoden bezüglich der Nebenhodenspermien dargestellt. Hochsignifikante Differenzen liegen zwischen dem Akridinorangetest und der Anilinblaufärbung, dem mfSCSA und der Caspaseaktivität vor. Außerdem unterscheiden sich die Ergebnisse der Anilinblaufärbung und der Toluidinblaufärbung signifikant voneinander.

Tabelle 10: Übersicht über die signifikanten Unterschiede zwischen sieben verschiedenen Färbemethoden zur Beurteilung der Chromatinkondensation anhand von 20 caninen Nativsamenproben. x: kein Vergleich; --: kein signifikanter Unterschied; +: signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$; ++: signifikanter Unterschied mit $p < 0,01$

	Anilin- blau	Toluidin- blau	AOT	CMA3	TUNEL	Caspase
Anilinblau	x	++	++	++	--	--
Toluidinblau	++	x	--	--	--	++
AOT	++	--	x	--	+	++
CMA3	++	--	--	x	--	++
TUNEL	--	--	+	--	x	--
Caspase	--	++	++	++	--	x

Tabelle 11: Übersicht über die signifikanten Unterschiede zwischen sieben verschiedenen Färbemethoden zur Beurteilung der Chromatinkondensation anhand von 20 caninen TG-Samenproben. x: kein Vergleich; --: kein signifikanter Unterschied; +: signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$; ++: signifikanter Unterschied mit $p < 0,01$

	Anilin- blau	Toluidin- blau	AOT	mfSCSA	CMA3	TUNEL	Caspa- se
Anilin- blau	x	+	+	+	++	++	+
Toluidin- blau	+	x	--	--	--	--	++
AOT	+	--	x	--	--	--	++
mfSCSA	+	--	--	x	--	--	++
CMA3	++	--	--	--	x	--	++
TUNEL	++	--	--	--	--	x	++
Caspase	+	++	++	++	++	++	x

Tabelle 12: Signifikante Unterschiede sieben unterschiedlicher Chromatinfärbemethoden von acht caninen Nebenhodenspermienproben. x: kein Vergleich; --: kein signifikanter Unterschied; +: signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$; ++: signifikanter Unterschied mit $p < 0,01$

	Anilin- blau	Toluidin- blau	AOT	mfSCSA	CMA3	TUNEL	Caspase
Anilin- blau	x	++	++	--	--	--	--
Toluidin- blau	++	x	--	+	--	--	+
AOT	++	--	x	++	--	+	++
mfSCSA	--	+	++	x	--	--	--
CMA3	--	--	--	--	x	--	--
TUNEL	--	--	+	--	--	x	--
Caspase	--	+	++	--	--	--	x

Im Vergleich der Ergebnisse des AOT und mfSCSA mittels T-Test wurde für die tiefgefrorenen Samenproben kein signifikanter Unterschied zwischen den Färbemethoden gefunden, wobei die Resultate des Akridinorangetest bei den gefrorenen Nebenhodenspermien signifikant höher lagen als im mfSCSA.

Wie in Tabelle 13 dargestellt, bestand eine signifikante Korrelation mit $p < 0,01$ für die Nativsamenproben zwischen dem Akridinorange-Test und der Anilinblaufärbung (Korrelationskoeffizient $r = 0,567$), sowie der Chromomycin A3-Färbung ($r = 0,645$).

Mit einem p-Wert unter 0,05 korrelierte Anilinblau mit Toluidinblau ($r = 0,455$) und der TUNEL-Färbung ($r = 0,557$). Zwischen Toluidinblau und Chromomycin A3 besteht eine Korrelation von $r = 0,538$.

Wie in Tabelle 14 dargestellt korrelierten beim Vergleich der tiefgefrorenen Samenproben Anilinblau mit Toluidinblau ($r = 0,698$) und dem Akridinorangetest ($r = 0,582$) sowie der Akridinorangetest mit dem mfSCSA ($r = 0,682$) und der Chromomycin A3-Färbung ($r = 0,752$) mit $p < 0,01$. Zudem korrelierte die CMA3 Färbung mit $p < 0,05$ mit Anilinblau ($r = 0,536$), Toluidinblau ($r = 0,453$) und dem mfSCSA ($r = 0,544$), während Toluidinblau ebenfalls mit dem Akridinorangetest ($r = 0,474$) mit $p < 0,05$ korreliert.

Tabelle 13: Korrelationskoeffizienten nach Pearson sechs unterschiedlicher Chromatinuntersuchungsmethoden für 20 canine Nativsamenproben. r: Korrelationskoeffizient; p: probability-value/Signifikanzwert; *: p-Wert < 0,05; **: p-Wert < 0,01; -: keine Korrelation; x: keine Analyse

	Anilin- blau	Toluidin- blau	AOT	CMA3	TUNEL	Caspase
Anilin- blau	x	*	**	-	*	-
r		0,455	0,567	0,434	0,557	0,122
p		0,044	0,009	0,056	0,011	0,610
Toluidin- blau	*	x	-	*	-	-
r	0,455		0,320	0,538	0,357	0,070
p	0,044		0,169	0,014	0,122	0,769
AOT	**	-	x	**	-	-
r	0,567	0,320		0,645	0,223	0,066
p	0,009	0,169		0,002	0,345	0,783
CMA3	-	*	**	x	-	-
r	0,434	0,538	0,645		0,187	0,183
p	0,056	0,014	0,002		0,429	0,441
TUNEL	*	-	-	-	x	-
r	0,557	0,357	0,223	0,187		0,027
p	0,011	0,122	0,345	0,429		0,912
Caspase	-	-	-	-	-	x
r	0,122	0,070	0,066	0,183	0,027	
p	0,610	0,769	0,783	0,441	0,912	

Tabelle 14: Übersicht über die Korrelationsanalyse nach Pearson sieben verschiedener Untersuchungen zur Chromatinkondensation 20 caniner Tiefgefrier-Samenproben. r: Korrelationskoeffizient; p: probability-value/Signifikanzwert; *: p < 0,05; **: p < 0,01; -: keine Korrelation; x: keine Analyse

	Anilin-blau	Toluidin-blau	AOT	mfSCSA	CMA3	TUNEL	Caspase
Anilin-blau	x	**	**	-	*	-	-
r		0,698	0,582	0,353	0,536	0,245	0,325
p		<0,001	0,007	0,127	0,015	0,298	0,162
Toluidin-blau	**	x	*	-	*	-	-
r	0,698		0,474	0,104	0,453	0,255	0,325
p	<0,001		0,035	0,664	0,045	0,277	0,162
AOT	**	*	x	**	**	-	-
r	0,582	0,474		0,682	0,752	0,243	0,093
p	0,007	0,035		<0,001	<0,001	0,303	0,697
mfSCSA	-	-	**	x	*	-	-
r	0,353	0,104	0,682		0,544	0,346	0,108
p	0,127	0,664	<0,001		0,013	0,135	0,652
CMA3	*	*	**	*	x	-	-
r	0,536	0,453	0,752	0,544		0,431	0,007
p	0,015	0,045	<0,001	0,013		0,058	0,975
TUNEL	-	-	-	-	-	x	-
r	0,245	0,255	0,243	0,346	0,431		0,132
p	0,298	0,277	0,303	0,135	0,058		0,578
Caspase	-	-	-	-	-	-	x
r	0,325	0,300	0,093	0,108	0,007	0,132	
p	0,162	0,199	0,697	0,652	0,975	0,578	

Bei den acht aus dem Nebenhoden gewonnenen tiefgefrorenen Samenproben wurde lediglich zwischen der Chromomycin A3-Färbung und der Toluidinblaufärbung ($r = 0,719$), sowie zwischen der AOT-Färbung und der TUNEL-Färbung ($r = 0,760$) eine Korrelation mit einem p-Wert von $< 0,05$ gefunden (Tabelle 15). Durch die geringe Zahl an Daten ist die Korrelationsanalyse der Nebenhodenspermien allerdings nicht beweisend.

Tabelle 15: Korrelationsanalyse sieben verschiedener Methoden zur Darstellung der Chromatinkondensation anhand von 8 tiefgefrorenen Nebenhodenspermienproben. r: Korrelationskoeffizient; p: probability-value/Signifikanzwert *: p < 0,05, **: p < 0,01, -: keine Korrelation, x: keine Analyse

	Anilin- blau	Toluidin- blau	AOT	mfSCS A	CMA3	TUNEL	Caspase
Anilin- blau	x	-	-	-	-	-	-
r		0,280	0,533	0,529	0,152	0,392	0,035
p		0,501	0,174	0,178	0,720	0,337	0,934
Toluidin- blau	-	x	-	-	*	-	-
r	0,280		0,398	0,425	0,719	0,167	0,315
p	0,501		0,329	0,294	0,045	0,693	0,447
AOT	-	-	x	-	-	*	-
r	0,533	0,398		0,127	0,133	0,760	0,142
p	0,174	0,329		0,764	0,753	0,028	0,737
mfSCSA	-	-	-	x	-	-	-
r	0,529	0,425	0,127		0,553	0,133	0,202
p	0,178	0,294	0,764		0,155	0,754	0,631
CMA3	-	*	-	-	x	-	-
r	0,152	0,719	0,133	0,553		0,171	0,242
p	0,720	0,045	0,753	0,155		0,686	0,564
TUNEL	-	-	*	-	-	x	-
r	0,392	0,167	0,760	0,133	0,171		0,560
p	0,337	0,693	0,028	0,754	0,686		0,149
Caspase	-	-	-	-	-	-	x
r	0,035	0,315	0,142	0,202	0,242	0,560	
p	0,934	0,447	0,737	0,631	0,564	0,149	

Da die Nativsamenproben auch mittels klassischer Samenuntersuchung bewertet wurden, wurden die Ergebnisse der Chromatinuntersuchungen zusätzlich einer Korrelationsanalyse mit diesem Samenparameter unterzogen.

Es wurde zunächst die Differenz der vorwärtsbeweglichen Spermien von der Gesamtheit der Spermien und die Differenz der vitalen Spermien von der Spermiengesamtzahl erfasst und logarithmiert und der Anteil pathomorpher Spermien logarithmiert und schließlich einer Korrelationsanalyse mit den Ergebnissen der Chromatinuntersuchungen unterzogen. Die Logarithmierung erfolgte aufgrund der rechtsschiefen Verteilung der Ergebnisse der klassischen Samenanalyse.

Wie in Tabelle 16 dargestellt, ergaben sich Korrelationen mit einem p-Wert von $< 0,05$ zwischen einem verminderten Anteil progressivmotiler Spermien und gemäß AOT ermittelter chromatingeschädigter Spermien ($r = 0,450$) sowie bezüglich Spermatozoen mit Caspaseaktivität und Avitalität ($r = 0,463$) sowie Pathomorphologie ($r = 0,445$).

Tabelle 16: Korrelationsanalyse sechs verschiedener Methoden zur Darstellung der Chromatinkondensation mit klassischen Samenparametern anhand von 20 caninen Nativsamenproben. r: Korrelationskoeffizient; p: probability-value/Signifikanzwert; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; -: keine Korrelation; x: keine Analyse

	Anilin- blau	Toluidin- blau	AOT	CMA3	TUNEL	Caspase
Amotilität	-	-	*	-	-	-
r	0,230	0,435	0,450	0,295	0,348	0,343
p	0,329	0,055	0,046	0,207	0,133	0,138
Avitalität	-	-	-	-	-	*
r	0,072	0,389	0,160	0,189	0,226	0,463
p	0,762	0,090	0,502	0,425	0,337	0,040
Patho- morpho- logie	-	-	-	-	-	*
r	0,129	0,248	0,049	0,213	0,340	0,445
p	0,588	0,291	0,838	0,367	0,142	0,049

Um heraus zu finden ob die Wahl des Probenmaterials die Ergebnisse signifikant beeinflusst, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich Färbung angefertigt.

Es wurde keine Abhängigkeit der Ergebnisse der Färbemethode von der Art des Probenmaterial (Nativsamen, Tiefgefriersperma und Nebenhodensperma) nachgewiesen.

Beim paarweisen Vergleich der Gruppen (NS, TG, TG-NH) wurden zwischen den Nativsamenproben und den Tiefgefrierspermaproben, sowie zwischen den Nativsamenproben und Nebenhodenspermien keine signifikanten Unterschiede gefunden. Bei diesem Vergleich wurden alle Färbemethoden, außer der mfSCSA einbezogen, da dieser nicht für sprühfixierte Nativsamenproben geeignet ist. Der mfSCSA konnte deshalb nur beim Gruppenvergleich der kryokonservierten Ejakulate und tiefgefrorenen Nebenhodenspermien erfasst werden, die vor dem Färben frisch aufgetaut wurden. Hier bestand eine Wechselwirkung der Probenart und den Färberesultaten.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

In humanmedizinischen Studien wurden bereits viele Methoden zur Beurteilung der Chromatinkondensation verglichen. Zudem wurde untersucht, ob konventionelle Samenparameter einen Hinweis auf die Stabilität des Chromatins geben, bzw. inwiefern es möglich ist anhand bestimmter Samenparameter auf die Fertilität eines Individuums zu schließen.

Chohan et al. (2006) verglichen Ergebnisse des flowzytometrischen Spermienchromatinstrukturassays (SCSA), des fluoreszenzmikroskopischen Akridinorangetests (AOT), des Spermienchromatindispersionstests (SCD) sowie des Terminal desoxynucleotidyl transferase -mediated d-UTP nick end labeling (TUNEL)-Tests miteinander und untersuchten die Unterschiede zwischen fertilen und infertilen Männern. TUNEL, SCSA und SCD lieferten vergleichbare Ergebnisse, während der AOT nicht mit den anderen Testergebnissen korrelierte. Zwischen fertilen und infertilen Männern unterschieden sich die Resultate des TUNEL, SCD und SCSA, während im AOT keine solchen Tendenzen zu erkennen waren. In dieser Studie wurden mittels AOT deutlich erhöhte Anteile chromatininstabiler Spermien nachgewiesen.

Auch Erenpreiss et al. (2004) beschrieben eine positive Korrelation des fluoreszenzmikroskopischen TUNELs mit den Ergebnissen der Toluidinblaufärbung und fanden ebenfalls bei der flowzytometrischen Auswertung positive Korrelationen zwischen Toluidinblau, SCSA und TUNEL. Lopes et al. (1998) fanden eine negative Korrelation zwischen der Fertilisationsrate bei der intracytoplasmatischen Spermieninjektion und dem Anteil an TUNEL-positiven Spermien beim Mann. Die gleichen Autoren zeigten eine positive Korrelation zwischen Motilitätsparametern und DNA-Fragmentierungen, jedoch kein Zusammenhang der DNA-Integrität mit der Spermienkonzentration und Spermiengesamtzahl.

In der Veterinärmedizin sind bisher wenige Vergleiche unterschiedlicher Färbemethoden veröffentlicht und Untersuchungen zur Fertilität in Zusammenhang mit unterschiedlichen Samenparametern begrenzt. Evenson et al. (1980) versuchten

einen Bezug zwischen der Empfindlichkeit bezüglich Hitzedenaturierung von bovinem Spermienchromatin und der Fertilität herzustellen. Ein subfertiler Bulle enthielt flowzytometrisch mehr Akridinorange positive Zellen als die fertilen Tiere. Ballachey et al. (1987) beschreiben eine negative Korrelation zwischen der Fertilität und dem Anteil von Einzelstrang-DNA in Bullenspermien, in Form von mittels Akridinorange rot gefärbten Spermien, welche per Flowzytometer erfasst wurden. In einer weiteren Studie der gleichen Autoren wurde die Fertilität von Bullen anhand der Resultate einer heterospermatischen Insemination beurteilt. Das heißt weibliche Tiere wurden mit einer Mischung von Spermazellen unterschiedlicher Vätertiere besamt und anhand der Nachkommen wurden Rückschlüsse über das Befruchtungsvermögen der Tiere gezogen. Als Maß der Fertilität wurde der sogenannte „Competitive Index“ erfasst. Der Samen wurde mittels SCSA untersucht und folgende Parameter bestimmt: Motilität (visuell, photomotility technique und computergestützt), Akrosomintegrität und Morphologie. Alle Samenqualitätsparameter korrelierten mit dem „Competitive Index“, während die Resultate des SCSA mit der Motilität und Akrosomintegrität korrelierten. Die Korrelation der SCSA-Ergebnisse mit der Spermienmorphologie war nicht signifikant (Ballachey et al. 1988). Acevedo (2001) dagegen fand einen Zusammenhang zwischen Chromatinintegrität und Morphologie. Auch Bochenek et al. (2001) untersuchten flowzytometrisch die Chromatinstabilität beim Bullen mittels SCSA und verglichen die Ergebnisse mit der Fertilität, d. h. mit der Non-Return-Rate nach instrumenteller Besamung. Hierbei korrelierte die Fertilität mit Ergebnissen aus dem SCSA. Auch beim Hengst wurde ein direkter Zusammenhang des Chromatinstatus, erfasst mittels SCSA bzw. mfSCSA, mit der Trächtigkeitsrate der Saison für nativ schockgefrorenes Sperma gefunden (Thießen, 2006). In der gleichen Studie bestand eine negative Korrelation des DNA-Fragmentierungsindex nativ schockgefrorener Hengstpermien mit der initialen Motilität und eine positive Korrelation mit dem Prozentsatz morphologisch veränderter Spermien. Paradowska-Dogan et al. (2014) untersuchten die DNA-Integrität von 55 Hengsten, die in vier Fertilitätsgruppen eingeteilt wurden, mittels flowzytometrischer Akridinorangegefärbung und fanden zwischen den Gruppen keine Unterschiede bezüglich der DNA-Integrität im Gegensatz zu Thießen (2006). Die Autoren stellten dagegen einen Zusammenhang der Fertilität mit dem Verhältnis von Protamin 1 zu Protamin 2 fest.

Laut Ardon (2005), die den modifizierten Spermienchromatinstrukturassay einsetzte, korreliert der Anteil chromatininstabiler Spermatozoen beim Eber signifikant mit dem Anteil an Spermien mit Zytoplasmotropfen während keine Korrelation zwischen dem Anteil chromatininstabiler Spermatozoen und anderen klassischen Samenparametern, wie z.B. der Motilität und anderen Pathomorphologien als Zytoplasmotropfen bestand.

Penfold et al. (2003) untersuchte die Fertilitätsrate nach intracytoplasmatischer Spermien Injektion von felinen normospermen und teratospermen Samenproben und fand eine veränderte Chromatinstruktur mittels SCSA ($13,8 \pm 2,4$ % vs. $48,5 \pm 6$ %), aber eine unveränderte Fertiliätsrate der teratospermen Proben.

Es sind bisher nur vereinzelt Untersuchungen zur Chromatinkondensation beim Rüden veröffentlicht, weshalb vor allem im Vergleich zum Menschen in diesem Bereich eine diagnostische Lücke besteht. Aber auch in der Veterinärmedizin wurden in der Vergangenheit für andere Tierarten häufiger Färbungen zum Chromatinstatus eingesetzt, weshalb eine Etablierung für den Rüden sinnvoll erscheint. Strotmann (2009) beschreibt beim Rüden eine große Variationsbreite bezüglich der Stabilität des Spermienchromatin und schreibt dies einer fehlenden Selektion der männlichen Zuchttiere auf Fertilität zu. Somit scheinen weitere Untersuchungsmethoden zur detaillierten Beurteilung caniner Spermatozoen als Hilfsmittel für eine spezifische Zuchtselektion wünschenswert. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Chromatinstatus mit der Fertilität beim Mensch und anderer Tierarten dienen als Motivation, Untersuchungen zur Chromatinkondensation für den Rüden einzuführen. Der Zusammenhang konventioneller Samenparameter mit der Fertilität beim Hund wurde in den letzten Jahren in unterschiedlichen Studien belegt. Dabei bestehen kontroverse Ergebnisse bezüglich korrelierender Samenparameter und deren Auswirkungen auf die Fruchtbarkeit. Mickelsen et al. (1993) untersuchten anhand der instrumentellen Besamung von 31 Hündinnen die Konzeptionsrate von Hundespermien. Die Trächtigkeitsrate wurde signifikant von der Gesamtzahl progressiv-motiler Spermien und morphologisch unauffälliger Spermien pro Ejakulat beeinflusst, nicht aber vom Prozentsatz motiler Spermatozoen bzw. dem Prozentsatz morphologisch abweichender Zellen an der Gesamtspermienzahl. Das bedeutet, dass laut dieser Quelle, eine Mindestzahl progressiv-motiler Spermien bzw.

morphologisch unauffälliger Spermien entscheidend für die Fruchtbarkeit ist und ein hoher Prozentsatz Spermien mit guter Qualität irrelevant ist, wenn die Spermien Gesamtzahl nicht hoch genug ist.

Zur Bedeutung der computerassistierten Samenanalyse beim Hund betrachteten Rijsselaere et al. (2007) die Samenqualität von 110 Rüden, bei denen das Körpergewicht positiv mit der Gesamtspermienzahl und negativ mit der curvilinear velocity korrelierte. Es gab deutliche Unterschiede bei den meisten CASA-Resultaten zwischen fertilen und subfertilen Rüden. Choi et al. (2011) untersuchten einerseits konventionelle Samenparameter, die mittels CASA erfasst wurden und andererseits die DNA-Fragmentierung mittels Spermienchromatindispersionstest. Hierbei zeigten sich sowohl bei der Morphologie und Motilität als auch beim der Fragmentierungsrate signifikante Unterschiede zwischen infertilen Rüden und der gesunden Kontrollgruppe. Zudem korrelierten die CASA-Ergebnisse mit den Ergebnissen der Chromatinuntersuchung.

Bei den flowzytometrischen SCSA-Untersuchungen von Strotmann (2009) unterschieden sich die DFI-Werte (%) von Rüden mit Normospermie und Dysspermie von denjenigen der Ejakulate mit Pathospermie signifikant.

Prinosilova et al. (2012) bestimmten die DNA-Fragmentierung von 60 Rüden unterschiedlicher Fertilität mittels flowzytometrischem SCSA und verglichen die Ergebnisse mit konventionellen Samenparametern. Es wurde Frischsamen, flüssigverdünntes Sperma, sowie tiefgefrorenes Sperma verwendet. Sie fanden eine negative Korrelation zwischen fragmentierter DNA und Gesamtspermienzahl, Prozentsatz gesamt motiler und progressiv motiler Spermien, Spermienvitalität und Anteil morphologisch unauffälliger Spermien, auch wenn die Korrelationsindizes niedrig waren. Zusätzlich wurden die Rüden mit verminderter Fertilität anhand ihrer konventionellen Samenparametern eingeteilt. Es zeigte sich ein höherer Fragmentierungsindex bei den subfertilen Rüden im Vergleich zu den fertilen Rüden, jedoch waren die Fragmentierungsindizes insgesamt so niedrig, dass laut dieser Autoren nicht davon auszugehen ist, dass dieser sich signifikant auf die Fertilität auswirkt.

Rota et al. (2005) konnten im Vergleich zu Prinosilova et al. (2012) keine Korrelation der Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopisch ausgewerteten Akridinorangegefärbung von fünf fertilen Rüden mit konventionellen Samenparametern wie der Motilität oder dem Hyperosmotischem Schwelltest ermitteln.

Vieytes et al. (2008) fanden eine geringe Korrelation zwischen Chromatinkondensation, ermittelt durch Toluidinblaufärbung und anderen spermatologischen Parametern wie Motilität, Vitalität (Eosin) und Membranintegrität (Hyperosmotischer Schwelltest) beim Bullen. Der Autor hält weitere Studien mit einem einer größeren Zahl an Probanden mit unterschiedlicher Fertilität bzw. Infertilität für erforderlich, um diese Tests sorgfältiger bezüglich des Zusammenhangs mit der Fruchtbarkeit bewerten zu können. Mello (1982) fand bei einem Bullen mit verminderter Fertilität einen zwölffach höheren Wert toluidinblaugefärbter Spermatozoen im Vergleich zu einem fertilen Tier. Da beide Werte aber in einem Bereich unter einem Prozent liegen ist es fraglich, welche Aussage mit diesem getroffen werden kann. Khalifa et al. (2008) fanden bei ihren Untersuchungen der Chromatininstabilität beim Bullen mittels Anilinblaufärbung keinen Zusammenhang zur Rasse oder Anzahl an Ejakulationen, während eine Korrelation zur Vitalität, Kopfanomalien und dem Vorhandensein von Zytoplasmotropfen bestand. Dagegen fanden sie rasseabhängige Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber Dekondensation ausgelöst durch Natriumlaurylsulfat und DTT. Interessanterweise war hierbei die Spermien-DNA von Limousinebullen in gekühltem Samen weniger empfindlich als Samen von Blonde d'Aquitaine, obwohl dieser im Frischzustand weniger DNA-Dekondensation aufwies. Außerdem fanden die Autoren eine verbesserte Resistenz gegenüber Dekondensation ermittelt durch Akridinorangegefärbung, wenn auch die konventionellen Samenparameter, wie Konzentration, Motilität, Anteil lebender Spermien und eine normale Morphologie gesteigerte Werte zeigten. Khalifa et al. (2008) beschrieben eine negative Korrelation zwischen dem Auftreten von Chromatininstabilitäten erfasst mittels Akridinorange und der Befruchtungsrates bei der In-vitro-Embryo-Produktion. Dies galt sowohl für die Befruchtungsrates als auch die Embryonenreifung nach 18 Stunden.

Aufgrund unterschiedlicher Ansichten über die Bedeutung und Zusammenhänge verschiedener Samenparameter mit der Fertilität, die Tierart übergreifend bestehen,

scheinen weitere Untersuchungen zur Chromatinkondensation beim Rüden sinnvoll. So hält auch Biege (2004) nach der Etablierung des modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstrukturassays trotz dessen hoher Reproduzierbarkeit weitere Untersuchungen zum Zusammenhang mit der Fertilität und die Schaffung repräsentativer Normbereiche für den Rüden für notwendig.

5.2 Diskussion der Methoden

Zur Untersuchungen der Chromatinkondensation caniner Spermatozoen wurde eine heterogene Gruppe von Rüden verwendet, die als fertil eingestuft wurden. Dies war notwendig, da die beschriebenen Methoden bei gesunden Tieren etabliert werden sollten, um Vergleichswerte für zukünftige Untersuchungen infertiler bzw. subfertiler Rüden zu erhalten.

Bei der Wahl der Methoden wurden darauf geachtet, dass diese in der Humanmedizin bereits etabliert sind und Erkenntnisse über die Samenqualität bzw. Fruchtbarkeit liefern. Es wurden Methoden, die bereits für den Rüden getestet sind (mfSCSA, TUNEL), mit Färbungen, die für andere Tierarten als den Rüden etabliert sind (Akridinorangetest, mfSCSA, TUNEL, Anilinblau, Toluidinblau), kombiniert. Zudem wurde mit dem Nachweis der Caspase-3-Aktivität eine Methode eingeführt, über die noch wenig in der veterinärmedizinischen Andrologie bekannt ist. Somit können aufgrund bereits untersuchter Korrelationen Hinweise auf die Plausibilität der Untersuchungsergebnisse geliefert werden. Die Anilinblaufärbung stellt als lichtmikroskopische Färbung eine sehr schnelle Methode mit wenigen Arbeitsschritten dar und korreliert laut Dadoune et al. (1988) beim Menschen mit der Fruchtbarkeit. Da für den Rüden noch keine Untersuchungen vorliegen, scheint eine Einführung in die Andrologie des Hundes sinnvoll. Ein negativer Aspekt dieser Methode ist das Gesundheitsrisiko ausgehend von der Glutaraldehydlösung zur Fixation, welche laut Sicherheitsdatenblatt nach VO EG 1907/2007 unter anderem giftig beim Einatmen sowie bei Berührungen der Haut ist. Für den Farbstoff Anilinblau besteht Gesundheitsgefahr lediglich beim Verschlucken. Für den Bullen (Vieytes et al., 2008; Khalifa, 2008) und den Kater (Hingst et al., 1995) liegen veterinärmedizinische Untersuchungen vor. Hingst et al. (1995) untersuchten die

Chromatinstabilität feliner Nebenhodenspermien mittels Akridinorange und Anilinblau und stellten eine Stabilisierung im Verlauf der Nebenhodenpassage fest. Aufgrund der Unabhängigkeit von Motilitätsparametern betrachten die Autoren die Chromatinkondensation als unabhängigen Fertilitätsparameter. Wegen der bestehenden Korrelation von Anilinblau und Akridinorange während der Nebenhodenpassage wurden in der eigenen Studie beide Parameter eingesetzt, da von Biege (2004) bereits eine Methode mit dem Farbstoff Akridinorange für den Rüden beschrieben wurde. Beim von Biege (2004) etablierten modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstrukturassay, das aus dem flowzytometrischen SCSA entwickelt wurde, wurden native Samenausstriche untersucht, was ein sofortiges Färben nötig macht. Auch wenn die Auswertung später erfolgen kann, ist ein erhöhter Aufwand aufgrund der technischen Ausstattung und fehlender Möglichkeit sprühfixierte Ausstriche für einen Färbevorgang mit mehreren Objektträgern zu sammeln, notwendig. Deshalb wurde entschieden, gleichzeitig die ursprüngliche Akridinorangegefärbung nach Tejada et al. (1984) durchzuführen, da in der Humanmedizin zahlreiche Studien existieren, in denen fixierte Ausstriche verwendet wurden. Es wurden zwei verschiedene Methoden zum Einsatz des Akridinorange-Farbstoffes verwendet und verglichen, da jede bestimmte Vor- und Nachteile hinsichtlich der Praktikabilität aufweist und somit sollte geklärt werden, welche besser für den Einsatz in der veterinärmedizinischen Andrologie geeignet ist und inwiefern sich die Ergebnisse unterscheiden. Das Phänomen der Arealbildung, das bei beiden Akridinorangegefärbungen auftritt, wurde bereits in der Vergangenheit beschrieben (Duran et al. 1998, Acevedo, 2001) und ist laut Evenson et al. (1999) der Tatsache geschuldet, dass das Objektträgerglas den Farbstoff Akridinorange adsorbiert. Zudem ist die Oberfläche der Objektträger und Deckgläser nicht absolut eben, wodurch es zu unterschiedlich hohen Konzentrationen vom Farbstoff auf dem einzelnen Objektträger kommt. Als weiteren Nachteil des AOT ist das Gesundheitsrisiko aufgrund des Farbstoffes zu nennen. Akridinorange ist gesundheitsschädlich und kann zu irreversiblen Schäden führen, da es vermutlich genetische Defekte hervorrufen kann. Zudem wird es mit Keimzellmutagenität in Verbindung gebracht und gilt als stark wassergefährdend (Sicherheitsdatenblatt VO EG 1907/2006, Sigma Aldrich). Ein wesentlicher Punkt, der die Praktikabilität des mfSCSA verbessert, ist die lange Lagerfähigkeit der gefärbten Ausstriche. Biege

(2004) wiederholte die Auswertung nach 4 Wochen lichtgeschützter Lagerung bei 4 °C und fand keine signifikante Abweichung zur sofortigen Untersuchung. Thießen (2006) testete den modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstrukturassay für equine Spermatozoen. Dabei wurde sogar bei einer Auswertung nach 6 Monaten noch eine signifikante Korrelation zur direkten Untersuchung gefunden.

Negativ zu bewerten ist die Auswertung des mfSCSA mittels Computerprogramm, die zwar die genaue Bestimmung der Fluoreszenz ermöglicht, aber mit einer relativ aufwendigen Einarbeitung in die Methodik verbunden ist. Von Biege (2004) wurden bei der Etablierung immer zwei SCSA-Werte angegeben, ein vom Computer ermittelter Wert und ein visuell korrigierter Wert. Einerseits nennt die Autorin die Möglichkeit der visuellen Erfassung als Vorteil gegenüber der Flowzytometrie, andererseits kommt sie aufgrund der signifikanten Korrelation der beiden Werte zu dem Entschluss, dass auf den visuell korrigierten Wert verzichtet werden kann. Nur im Einzelfall traten Abweichungen des computererfassten Wertes und der Korrektur aufgrund von Zwischenfarbstufen zwischen gelb und orange auf. Zudem fand Biege (2004) eine signifikante Steigerung der roten Spermienpopulation bei erhöhten Raumtemperaturen zwischen 26 und 27 °C. Dagegen bemerkte Acevedo (2001) bei Änderung der Umgebungstemperatur von 5 °C auf 25 °C einen Farbwechsel aller Spermien nach grün. Die ersten zehn Minuten nach der Färbung gelten als kritischer Zeitpunkt, an dem es vermutlich durch Reoxidation von Thiolgruppen zu einem Farbumschlag nach grün kommt. Deswegen wurde von ihr eine Behandlung mit DTT oder Mercapthoethanol zur Stabilisierung von Thiolgruppen empfohlen, was zur Entwicklung des modifizierten SCSA geführt hat. Auch in den eigenen Untersuchungen konnte die Beobachtung gemacht werden, dass sich eine Erhöhung der Raumtemperatur negativ auf die Färberesultate auswirkt. Da Biege (2004) eine gute Lagerfähigkeit der Ausstriche bei 5 °C beschreibt, ist zu empfehlen, diese auch erst unmittelbar vor der mikroskopischen Beurteilung aus der Kühlung zu nehmen, was sich bei räumlicher Trennung zwischen Fluoreszenzmikroskop und Kühlgelegenheit unter Umständen als schwierig erweist. Der mfSCSA erforderte mehr Zeit- und Materialaufwand als die Färbung nach Tejada et al. (1984) und es wurden ähnliche Probleme festgestellt. Im Gegensatz zu Biege (2004), welche bei der Etablierung dieser Methode die vorher genannten Probleme bezüglich einer

ungleichmäßigen Färbung des Objektträgers, sowie einem Verblässen der Farbe nicht beobachtete, ergaben sich bei den eigenen Untersuchungen die gleichen Probleme wie beim AOT.

Zu dem bereits oben beschriebenen Gesundheitsrisiko durch Akridinorange kommen beim mfSCSA noch weitere Gefahrenstoffe hinzu. So wird von DMSO ebenfalls eine Keimzellmutagenität sowie eine karzinogene Wirkung auf verschiedene Organe vermutet. Außerdem wirkt DTT reizend auf Atmungsorgane, Haut und Augen. (Sicherheitsdatenblatt VO EG 1907/2006, Sigma Aldrich). Die zur Verfügung stehende Version der Software CellSense bot keine Möglichkeit des computergestützten Zählens der Spermien, sodass die Auswertung visuell erfolgen musste. Der enorme Kostenaufwand für die Erweiterung des Programms mit dieser Funktion und der dem entgegenstehende verringerte Zeitaufwand scheint hier kaum in einem angemessenen Verhältnis, zumal eine visuelle Kontrolle der Ergebnisse aufgrund der sehr unterschiedlichen Färbeergebnisse ratsam scheint. Um die kontroversen Erkenntnisse, die über den Einsatz von Akridinorange in der veterinärmedizinischen Andrologie bestehen, genauer zu beleuchten, wurden beide Methoden getestet. Da lichtmikroskopische Methoden ein weniger teures Equipment als die Fluoreszenzmikroskopie erfordern und ein Lichtmikroskop zur Standardausstattung in einem veterinärmedizinischen Labor gehört, wurde zusätzlich die Toluidinblaufärbung für den Rüden getestet, da diese laut Erenpreiss et al. (2001) aufgrund ihrer Korrelation mit anderen Chromatinfärbungen eine gute Alternative zur Flowzytometrie bzw. Fluoreszenzmikroskopie darstellt. Es wurden vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen unterschiedliche Protokolle getestet (Krzanowska, 1982; Mello, 1982; Erenpreiss et al., 2001; Beletti und Mello, 2004) und die Methode nach Erenpreiss et al. (2001) aufgrund der besten Färbeergebnisse gewählt. Untersuchungen liegen für andere Tierarten bereits vor. So fand Mello (1982) einen unmittelbaren Zusammenhang mit der Fertilität beim Bullen und Beletti und Mello (2004) untersuchten Kaninchensperma mittels Toluidinblaufärbung. Rodriguez et al. (1985) untersuchten die Chromatinkondensation beim Schafbock mittels Toluidinblau und fanden deutliche Unterschiede zwischen Tieren mit unterschiedlicher Fertilität, obwohl diese anhand des Spermioграмms nicht zu unterscheiden waren. Carretero et al. (2012a), die die Methode für equine Spermatozoen testeten, erachten den Toluidinblautest als einfachen, schnellen und kostengünstigen Test mit einer hohen

Wiederholbarkeit, womit die Aktualität der Untersuchungsmethode belegt wird. Obwohl viele Untersuchungen zur Toluidinblaufärbung bereits vor dreißig Jahren gemacht wurden scheint die Frage nach der Etablierung der Toluidinblaufärbung beim Rüden somit berechtigt zu sein. Bei der Handhabung mit Toluidinblau besteht für den Untersucher kein Gesundheitsrisiko, allerdings wird der Stoff als „wassergefährdend“ eingestuft (Sicherheitsdatenblatt VO EG 1907/2006, Merckmillipore). Dennoch stellt der Umgang mit Butanol und Xylol im Anschluss an die Färbung ein Gesundheitsrisiko dar, da Butanol laut Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 453/2010 sowohl reizend für Augen und Atemwege ist, sowie gesundheitsschädlich beim Einatmen. Xylol gilt ebenfalls als reizend bis tödlich beim Verschlucken und Einatmen sowie als wassergefährdend.

Um neue Methoden zur Untersuchung der Chromatinkondensation beim Rüden zu etablieren, wurde zudem die fluoreszenzmikroskopische Chromomycin A3-Färbung getestet, die bisher beim Bullen und bei der Maus Verwendung fand (Simões et al., 2009; Bianchi, 1993). Simões et al. (2009) erklären den CMA3-Test zu einem einfachen und nützlichen Hilfsmittel zur Detektion einer Protamindefizienz beim Bullen. Zudem existieren für den Rhesusaffen, den Eber, den Schaf- und Ziegenbock, den Rammler und die Ratte Untersuchungen zur Protaminierung mittels CMA3 (Warntjen, 2012). Während diese Fluoreszenzfärbung in der humanmedizinischen Andrologie als guter Fertilitätsparameter gilt (Iranpour et al., 2000), beschreiben Simões et al. (2009), dass die Protamindefizienz nicht direkt mit der bovinen Fertilität zusammenhängt. Sie erklären dies mit den Erkenntnissen von Aoki et al. (2005) über die Bedeutung eines gestörten Verhältnisses von Protamin 1 zu Protamin 2 für die Fertilität beim Mann. Aufgrund lückenhafter veterinärmedizinischer Untersuchungen wurde die CMA3-Färbung für den Rüden getestet.

Im Gegensatz zur Chromomycin A3-Färbung existieren für die TUNEL-Methode bereits einige Untersuchungen zur DNA-Fragmentierung in Hundesamenzellen. Es liegen also einerseits Vergleichswerte vor, andererseits wurde in der Vergangenheit festgestellt, dass weitere Untersuchungen erfolgen sollten und Parameter untersucht werden müssen, die mit der DNA-Fragmentierung caniner Spermatozoen korrelieren (Lange-Consiligo et al., 2010). Bisherige Färbungen caniner Spermatozoen mittels

TUNEL wurden nur an Populationen bis zu elf Rüden durchgeführt (Lange-Consiligo et al., 2010). Die Autoren untersuchten elf Rüden flowzytometrisch. Sánchez et al. (2011) untersuchten die Ejakulate von vier Rüden und die Auswirkungen verschiedener Gefrierzusätze auf die DNA-Fragmentierung, sodass es sinnvoll erschien, die Probenanzahl zu erhöhen und aussagekräftigere Werte zu erzielen. Für Martins et al. (2007), die den TUNEL-Test und den Akridinorangetest anhand der Samenzellen eines fertilen Bullen verglichen, stellt der TUNEL-Test die Methode der Wahl zur Detektion der Spermienfertilität dar, wobei der Probenumfang kritisch zu betrachten ist und für die eigenen Untersuchungen eine größere Anzahl gewählt wurde. Zur Handhabung des TUNEL-Tests soll erwähnt werden, dass die angewendete Lösung laut Hersteller giftig beim Einatmen und Verschlucken und krebserregend bei Inhalation ist, was als negativer Aspekt dieser Färbemethode zu nennen ist. Triton X-100, das zum Permeabilisieren der Zellen benötigt wird, ist giftig für Wasserorganismen, sowie augenreizend und gesundheitsschädlich (Materialsicherheitsdatenblatt VO EG 1907/2006, Sigma Aldrich).

Im Vergleich zum TUNEL-Test existieren zum jetzigen Zeitpunkt weniger Untersuchungen zur Aktivität von Caspase in caninen Ejakulaten. Da es sich um einen Apoptosenachweis handelt, sind ähnliche Ergebnisse wie bei der TUNEL-Färbung zu erwarten. Laut Said et al. (2004) spielen Caspasen eine wichtige Rolle bei andrologischen Störungen, wie zum Beispiel einer unvollständigen Spermatogenese, verminderter Motilität und vermehrter DNA-Fragmentation. Sie sind wichtig für die Spermienentwicklung und Hodenreifung. Untersuchungen fanden hierzu beim Rüden in Form von histologischen Färbungen von Hodengewebe statt (Herr, 2010; Henning et al., 2014). Sokolowska et al. (2009) untersuchten die Caspaseaktivität mittels Pancaspase-Inhibitor FITC-VAD-fmk (fluorescein isothiocyanate-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) bei ejakulierten caninen Spermien vor und nach dem Einfrieren und Auftauen, ähnlich wie Muñoz et al. (2015), die die Caspase-3 und Caspase-7-Aktivität equiner Spermatozoen flowzytometrisch untersuchten. Muñoz et al. (2015) untersuchten den Gehalt an intrazellulären Thiolen, Samenqualitätsparameter, Caspase-3-Aktivität und mitochondriales Membranpotential als Hinweise auf Zellalterungsprozesse. Es wurden Ejakulate von sieben Hengsten vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen untersucht und es ergab sich eine Verminderung der intrazellulären Thiole, die positiv mit der Motilität,

Vorwärtsbeweglichkeit und lebenden Zellen ohne Caspase-3-Aktivität korrelierten. Dagegen korreliert die Anzahl lebender und toter Zellen mit Caspase-3-Aktivität negativ mit dem Anteil intrazellulärer Thiole. Durch deren Studien wird deutlich, wie aktuell das Thema der Caspaseaktivität zur Spermabeurteilung ist. Sie gibt Hinweise auf intrazelluläre Zusammensetzungen und deren Wirkweisen, die helfen die Fertilität besser zu beurteilen. Die Ergebnisse der Caspase-Färbung können mit den Resultaten der bereits beim Rüden angewandten TUNEL-Methode verglichen werden, weshalb die Einführung dieser Methode in die Andrologie des Rüden sinnvoll scheint. Da von Fouz (2010) der APO Active 3™ FITC – Antibody Specific Active Caspase-3 FITC Detection Kit der Fa. Cell Technology für humane sprühfixierte Ausstriche und mittels fluoreszenzmikroskopischer Auswertung erfolgreich verwendet wurde, wurde dieser zur Untersuchung caniner Spermatozoen in der eigenen Arbeit eingesetzt. Auch bei dieser Methode wird Triton X-100 eingesetzt, dessen Gesundheitsrisiken bereits erwähnt wurden. Die im Kit enthaltene Fixierlösung aus Formaldehyd ist giftig beim Einatmen und Verschlucken. Gesundheitsrisiken bestehen durch die im Kit enthaltenen Antikörperlösungen nicht.

Eine Methode zum Anfertigen einer Positivkontrolle konnte für die Chromomycin A3-Färbung vorgenommen werden, die bereits in Studien von Simões et al. (2009) für bovine Spermien und von Bizzaro (1998) für murine und humane Spermien eingesetzt wurde. Dabei handelt es sich um eine vorherige Dekondensation des Spermienkern und nachfolgende Protaminextraktion, welche ein Angriff des Fluoreszenzfarbstoffs ermöglicht und somit alle Spermien auf dem behandelten Objektträger fluoreszieren. Eine Negativkontrolle wäre gemäß Bianchi et al. (1993) mittels künstlicher Protaminierung möglich, worauf verzichtet wurde, da die Färbemethode bereits für bovine und murine Spermatozoen erfolgreich eingesetzt worden ist.

Für die TUNEL-Färbung konnte ebenfalls eine Positivkontrolle sowie eine Negativkontrolle angefertigt werden. Dabei wurde die vom Hersteller des In Situ Cell Death Detection Kit empfohlene DNase-Konzentration anhand von früheren Studien erhöht. Villani et al. (2010) untersuchten die Auswirkungen unterschiedlicher DNase-Konzentrationen auf die TUNEL-Resultate humaner, muriner und boviner Spermatozoen. Diese Studie ergab, dass humane Spermien bereits ab einer

Konzentration von 2 U/ml nahezu eine vollständige Fragmentierung der DNA aufwiesen, während bovine Spermien erst ab 500 U/ml und murine ab 1000 U/ml ähnlich viele DNA-Fragmentationen erreichten. Aufgrund dieser Untersuchungen wurde die Maximalkonzentration von 1000 U/ml zum Anfertigen der Positivkontrolle gewählt. Es ist zu erwähnen, dass Warntjen (2012) zur Induktion von DNA-Strangbrüchen in murinen epididymalen Spermatozoen eine Konzentration von 4 U/ml DNase mit unterschiedlichen Inkubationszeiten einsetzte. Die Autorin erreichte damit bei unterschiedlichen Mäusestämmen eine Erhöhung der TUNEL positiven Zellen von $0,56 \pm 0,02$ % auf $7,31 \pm 0,84$ % bzw. von $1,13 \pm 0,3$ % auf $7,8 \pm 1,96$ %. Des Weiteren wurden Objektträger angefertigt, auf die der Fluoreszenzfarbstoff ohne Enzym aufgetragen wurde, was zu einer fehlenden Anlagerung des Fluoreszenzfarbstoffs als Negativkontrolle führte.

Eine Positivkontrolle für die Akridinorange-Färbung gestaltet sich problematisch, da in der oben genannten Studie von Villani et al. (2010) bei einer DNase-Aktivität von 1000 U/ml zwar im TUNEL flowzytometrisch nahezu alle DNA fragmentiert war, im SCSA allerdings nur 9 % der Spermien akridinorange-positiv waren. Warntjen (2012) beschreibt schon bei längeren Inkubationszeiten mit geringeren DNase-Konzentrationen Interpretationsschwierigkeiten bei der mikroskopischen Auswertung bedingt durch Denaturierung. Somit scheint im Vergleich zur flowzytometrischen Auswertung ein Nachweis induzierter DNA-Strangbrüche mittels Akridinorange nicht sinnvoll. Kim et al. (2010) wiesen durch Untersuchungen an tiefgefrorenen und aufgetauten caninen Samenproben nach, dass der Gefrierprozess sowohl klassische Samenparameter beeinflusst, als auch der intrazellulären Anteil an Wasserstoffperoxid, die Apoptoserate (Phosphatidylserintranslokation) und die DNA-Integrität (SCSA) erhöht werden. Die Untersuchungen zum Einsatz von Wasserstoffperoxid zur Induktion von DNA-Strangbrüchen beziehen sich allerdings auf andere Methoden, wie zum Beispiel den Comet Assay und sind somit nicht auf die eigenen Untersuchungen übertragbar. Villani et al. (2010) stellten eine geringere Variationsbreite bezüglich einer tierartspezifischen Toleranzgrenze für Wasserstoffperoxid im Gegensatz zur DNase-Toleranz fest. Im Alkaline Comet Assay zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg an DNA-Strangbrüchen, welcher im Neutral Comet Assay nicht bestand. Die Autoren sind daher der Auffassung, dass Wasserstoffperoxid Einzelstrangbrüche verursacht und allein der Alkaline Comet

Assay in der Lage ist DNA-Strangbrüche zu detektieren, welche durch Wasserstoffperoxid verursacht wurden. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde auf den Einsatz von Wasserstoffperoxid zum Anfertigen von Positivkontrollen verzichtet.

Für die lichtmikroskopischen Färbemethoden Anilinblau und Toluidinblau wurden keine Positivkontrollen angefertigt. Bezüglich einer provozierten Färbung mittels Anilinblau konnten keine Informationen in der Literatur gefunden werden. Zudem konnte die Plausibilität der Färberesultate anhand des Vergleichs mit den anderen Chromatinfärbungen, insbesondere der Chromomycin A3-Färbung, geklärt werden, da hier ein sehr ähnlicher theoretischer Hintergrund vorliegt.

Carretero et al. (2012b) untersuchten das Spermienchromatin von 15 Alpakahengsten mittels Toluidinblaufärbung und verwendeten hierbei DTT als Positivkontrolle zur Chromatindekondensation. Da die Provokation der Dekondensation an frischen Spermaausstrichen durchgeführt wurde, war diese Positivkontrolle für die Versuchsdurchführung an sprühfixierten Präparaten nicht praktikabel. Aufgrund der guten Korrelation mit anderen Tests zur Chromatinkondensation (Erenpreiss et al., 2004) wurde deshalb auf die Positivprobe verzichtet.

Da bezüglich der Eignung der verschiedenen Methoden für tiefgefrorene Proben und den Ergebnissen des Chromatinstatus von kryokonserviertem Samen unterschiedliche Auffassungen vorliegen, wurden neben Nativsamenausstrichen auch TG-Proben in die Untersuchungen einbezogen. So fand Thießen (2006) signifikante Unterschiede nativer schockgefrorener Proben, frischer Samenproben und TG-Proben beim Hengst und kam zu dem Ergebnis, dass verdünnte Frischsamenproben und TG-Proben für den mfSCSA ungeeignet sind. Dagegen äußerte Biege (2004), die den mfSCSA für den Rüden etablierte, diesbezüglich keine Bedenken und beschrieb signifikant mehr chromatininstabile Spermien im Nativejakulat als in schockgefrorenen und tiefgefrorenen Proben. Gegensätzlich dazu fanden Kim et al. (2010) eine erhöhte DNA-Integrität caniner kryokonservierter Spermien, welche mittels SCSA erfasst wurde. Laut Prinosilova et al. (2012), die ebenfalls den flowzytometrischen SCSA einsetzen, wirkten sich weder Flüssigkonservierung bis zu zehn Tagen, noch Kryokonservierung auf die Chromatinstabilität aus. Auch bei den Untersuchungen der Auswirkungen der

Kryokonservierung auf die Chromatininstabilität caniner Nebenhodenspermien mittels Spermienchromatindispersionstest fanden Varesi et al. (2014) keine Beeinflussung der DNA-Integrität. Die Werte der frischen epididymalen Spermien lagen bei $3,3 \pm 3,6$ % fragmentierter DNA, während die TG-Proben je nach Verdünnerzugabe bei $4,2 \pm 3,8$ % und $3,6 \pm 3,7$ % aufwiesen. Ähnliche Ergebnisse lieferten die Untersuchungen von Rota et al. (2005), welche die Ejakulate fünf verschiedener bewiesen fertiler Rüden untersuchten und unterschiedliche Einfriermethoden verglichen. Die Ergebnisse der Akridinorangefärbung wiesen weder signifikante Unterschiede zwischen den Rüden, noch zwischen den unterschiedlichen Prozessen auf. Andere Beobachtungen machten Khalifa et al. (2008) bei bovinem Sperma. Während beim Kühlen keine signifikanten Effekte auf die DNA-Stabilität auftraten, kam es nach Kryokonservierung zu einem Anstieg an DNA-Schädigungen. Auch Carretero et al. (2012a) untersuchten die Chromatinkondensation equiner Spermatozoen anhand des Toluidinblautests und des Spermienchromatindispersionstests. Bei der Untersuchung von Nativsamen und aufgetautem Samen fiel eine signifikante Steigerung des Anteils toluidinblaupositiver und somit chromatinkondensierter Spermien und dem Anteil an fragmentierter DNA auf. Laut Fouz (2010) erhöhte sich der Anteil TUNEL-positiver Spermien bei fertilen Männern nach Kryokonservierung, während die Zunahme bei subfertilen Männern nicht signifikant war. Die gleichen Erkenntnisse lieferte die Untersuchung der Caspase-3-Aktivität nach Tiefgefrier- und Auftauprozessen. Beim Vergleich der Ergebnisse der eigenen Proben ist zu erwähnen, dass der Verdünner der kryokonservierten Proben durch Waschvorgänge mittels Pufferlösung und Zentrifugation weitestgehend entfernt wurde. Da Zentrifugation laut Thießen (2006) keine Auswirkungen auf die Untersuchungsergebnisse im mfSCSA hat, sind bei der Auswertung keine Probleme mit den tiefgefrorenen Proben zu erwarten. Obwohl bisher wenige veterinärmedizinische Untersuchungen zur Chromatinkondensation inklusive der Chromomycin A3-Färbung vorliegen ist zu erwähnen, dass Simões et al. (2009) diese bereits für aufgetaute TG-Proben verwendet haben und die erhobenen Befunde Hinweise darauf liefern, dass die Untersuchung von kryokonservierten Proben gut möglich ist.

Neben ejakulierten Spermien, bei denen insgesamt eine sehr geringe Chromatininstabilität gefunden wurde, sollte abschließend geklärt werden, welchen

Chromatinstatus aus dem Nebenhodenschwanz gewonnene canine Spermatozoen aufweisen. Hingst et al. (1995) untersuchten die Chromatinkondensation feliner Spermatozoen aus Nebenhodenschwanz, -körper und -kopf mittels Anilinblau und Akridinorangegefärbung, wobei der mittels Akridinorange erfasste Anteil chromatinstabiler Spermien von $51,1 \pm 16,0$ % im Nebenhodenkopf auf $86,5 \pm 8,7$ % im Nebenhodenschwanz zunahm. Auch der Anteil anilinblau positiver Spermien nahm im Verlauf der Nebenhodenpassage ab. Nebenhodenkopfspermien waren zu $68,2 \pm 11,9$ % nicht mit Anilinblau gefärbt, Spermien aus dem Nebenhodenkörper waren zu $84,7 \pm 7,7$ % anilinblau negativ, während die aus dem Nebenhodenschwanz gewonnenen Spermien zu $92,2 \pm 3,7$ % ungefärbt waren. In dieser Studie wurde kein Vergleich zu ejakulierten Spermien durchgeführt, wohingegen Garcia-Macias et al. (2006) mittels SCSA die Chromatinstabilität von Spermien aus der Nebenhodenpassage und Ejakulaten von Schafbock, Rothirsch und Hund untersuchten. Wie bei den eigenen Untersuchungen stammten die Nebenhoden- und Ejakulatproben von unterschiedlichen Tieren. Beim Hund fanden sich im Nebenhodenkopf mehr chromatininstabile Spermien als im Körper und Schwanz. Zwischen Spermien des Nebenhodenkörpers und des Nebenhodenschwanzes existierten keine Unterschiede, genau wie zwischen Spermien des Nebenhodenschwanzes und den ejakulierten Spermien.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Anilinblau

Im Vergleich zum fertilen Mann, bei dem die anilinblau positiven Spermien unter 20 % liegen (Hammadeh et al., 1998), wurden beim Rüden bei allen 48 Proben sehr wenige anilinblau positive Spermien gefunden (durchschnittlich $0,51 \pm 0,29$ %). Während für den Rüden keine Vergleichswerte vorliegen, weisen Spermien aus dem Nebenhodenschwanz des Katers $92,2 \pm 3,7$ % ungefärbte Köpfe auf. Warntjen (2012) fand bei der Färbung mit Anilinblau von murinen Spermien durchschnittlich weniger als 1,88 % anilinblau positive Spermien. Bei Vieytes et al. (2008) lag der Anteil anilinblau-positiver Spermatozoen bei sechs Bullen mit guter (Abkalbungsrate

> 65 %) oder mittlerer Fertilität (Abkalbungsrate > 35 % und < 65 %) zwischen 0 % und 6,5 %. Dagegen wiesen Khalifa et al. (2008) Werte zwischen 0 und 19 % anilinblaupositive Spermien bei der Untersuchung von sechs verschiedenen Bullen nach, wobei der Mittelwert der untersuchten Ejakulate bei $11,22 \pm 0,96$ % lag. Dennoch liegen Untersuchungsergebnisse zur Anilinblaufärbung von Spermien aus dem Bereich der Veterinärmedizin in deutlich niedrigeren Bereichen als in der Humanmedizin. Steger et al. (2005) untersuchten die Auswirkungen einer einseitigen Vasektomie auf die Spermienreifung, Protamination und Chromatinkondensation von Kaninchenspermien. Es wurden testikuläre und epididymale Spermien unter anderem mittels Anilinblaufärbung untersucht und es bestand keine Beeinflussung der Nebenhodenspermien bezüglich der Chromatinkondensation, bei denen der Anteil anilinblaupositiver Spermien im Bereich von 10 % lag. Obwohl der Anteil anilinblaupositiver Spermien bei anderen Tierarten ebenfalls die Normwerte beim Menschen unterschreitet, sind diese in einem Bereich deutlich unter 20 % aber breit gestreut. Unter Umständen sind die Unterschiede der Chromatinstabilität mit der abweichenden Nukleoproteinzusammensetzung der Tierarten zu erklären. Während die Maus, der Bulle und der Mann zwei Protamine besitzen (Balhorn et al., 1977; Coelingh et al., 1972), beschreiben Lee et al. (1999), dass die Algerische Maus, die Feldmaus, die Erdmaus, die Waldmaus, die Gelbhalsmaus, der Chinesische Hamster und der Goldhamster ebenfalls zwei Protaminarten besitzen, wobei beim Meerschwein, dem Hund, „blackmonkeys“ und Rhesusaffen nur Protamin 1 gefunden wurde, ebenso beim Schafbock (Loir und Lanneau, 1978.). Kretzer (2011) kam nach umfassender Literaturrecherche über die unterschiedlichen Theorien bezüglich dem Vorhandensein von Protamin 1 bei allen Tierarten und dem Fehlen von Protamin 2 bei wenigen Tierarten zu dem Entschluss, dass noch nicht eindeutig geklärt ist welche genau Rolle die Protamine auf die Spermatogenesefunktion spielen. Paradowska-Dogan et al. (2014) stellten einen Zusammenhang der Fertilität mit dem Verhältnis von Protamin 1 zu Protamin 2 fest, allerdings scheint das Vorhandensein von Protamin 1 und Protamin 2 nicht als Erklärung für die Beschaffenheit der Chromatinkondensation zu dienen, da z. B. Maus und Mensch trotz des Besitzes beider Protamine sehr unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Chromatinstabilität aufweisen.

Obwohl der Mittelwert der TG-Proben mit 0,8 % AB-positiver Spermien höher liegt als der der Nativsamenproben (0,3 %), besteht gemäß zweifaktorieller Varianzanalyse keine Wechselwirkung bezüglich Färbemethode und Probenmaterial. Dies ist mit der Wirkweise der Färbemethode zu erklären, dass der Farbstoff Anilinblau an Lysinreste der Histone bindet und somit unabhängig von Einfrier- und Auftauprozessen ist. Mit einem Mittelwert von 0,4 % anilinblaupositiver Spermien aus dem Nebenhodenschwanz decken sich die Ergebnisse mit früheren Untersuchungen (Garcia-Macias et al., 2006; Hingst, 1995).

Gemäß Korrelationsanalyse mit den klassischen Samenparametern ergab sich kein Zusammenhang der Ergebnisse der Anilinblaufärbung mit der Spermiovitalität, der Vorwärtsbeweglichkeit und der Pathomorphologie. Dies sind widersprüchliche Erkenntnisse zu Khalifa (2008), bei dessen Untersuchungen der Anteil anilinblau-positiver Spermien mit der Vitalität sowie Pathomorphologie korrelierte. Ob die Anilinblaufärbung auch für den Rüden, wie von Hingst et al. (1995) für den Kater geschehen, zu einem unabhängigen Fertilitätsparameter erklärt werden kann, erfordert weitere Untersuchungen, die auch infertile Rüden mit einschließen. Dies wurde bereits von Vieytes et al. (2008) gefordert, die beim Bullen geringe Korrelationen der Chromatinkondensation mit klassischen Samenparametern fanden.

5.3.2 Toluidinblau

Die insgesamt sehr niedrigen Anteile Toluidinblau-positiver Spermien sind in Anbetracht dessen, dass die Methode mit anderen Methoden zur Detektion der Chromatininstabilität korreliert, plausibel. Allerdings liegen für den Rüden keinerlei Vergleichswerte in der Literatur vor. Vergleicht man die Ergebnisse der unterschiedlichen Chromatinuntersuchungsmethoden untereinander, fällt auf, dass sich die Ergebnisse beim Mensch und Hund ähneln, obwohl das Niveau insgesamt sehr unterschiedlich ist. So gilt ein Wert von unter 20 % anilinblaupositiver Spermien beim Mensch als physiologisch (Hammadeh et al. 1998), während Chohan et al. (2006) ein Mittelwert von $24,9 \pm 4,8$ % toluidinblaupositiver Spermien beim Mann fanden. Mit durchschnittlich $1,31 \pm 1,62$ % toluidinblaupositiver Spermien liegt der Wert somit beim Hund über dem für Anilinblau ermittelten Wert von $0,51 \pm 0,85$ %.

Für andere Tierarten sind Untersuchungsergebnisse zur Toluidinblaufärbung bekannt. Diese liegen beim Kaninchen laut Beletti und Mello (2004) bei $2,3 \pm 2,5$ %, beim fertilen Bullen zwischen 0 % und 0,06 %, beim subfertilen Bullen zwischen 0 % und 0,2 % und beim infertilen Bullen zwischen 0 % und 6 % (Vieytes et al., 2008). Auch Mello (1982) untersuchte die Anfärbbarkeit boviner Spermien mit Toluidinblau und ermittelte Ergebnisse zwischen 0,06 % und 0,68 % toluidinblaupositiver Spermien, was den eigenen Ergebnissen beim Rüden sehr nahe kommt. Carretero et al. (2012) fanden $7,55 \pm 5,22$ % toluidinblaupositive Spermien bei der Untersuchung von den Ejakulaten von 15 Alpakahengsten. Vergleichbare Untersuchungsergebnisse existieren auch für das Guanako (Carretero et al., 2010) und den Hengst (Carretero, et al., 2012a).

Ähnlich der Resultate des Anilinblautests weisen die tiefgefrorenen Samenproben einen höheren Mittelwert von $1,3 \pm 1,41$ % gefärbter Spermien auf im Vergleich zu $0,92 \pm 0,84$ % beim Nativsamen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich die Gruppen der Samenspender unterscheiden. Statistisch gesehen besteht aber wie schon erwähnt keine Wechselwirkung der Probenart mit den Färbeergebnissen. Somit scheint bewiesen, dass sich der Einsatz von Toluidinblau auch für TG-Proben eignet. Um abschließend zu klären, ob sich der Tiefgefrier- und Auftauprozesse auf den Anteil toluidinblaugefärbter Spermien auswirken, müsste der Samen der gleichen Individuen vor und nach dem Frieren untersucht werden. So untersuchten Carretero et al. (2012a) die Chromatinkondensation equiner Spermatozoen anhand des Toluidinblautests und des Spermienchromatindispersionstests. Bei der Untersuchung von Nativsamen und aufgetautem Samen fiel eine signifikante Steigerung des Anteils toluidinblaupositiver Spermien und dem Anteil an fragmentierter DNA auf. Der auffallend höhere Mittelwert der toluidinblaupositiven Nebenhodenspermien ($2,33 \pm 2,77\%$) widerspricht den Beobachtungen bei der Anilinblaufärbung. Bereits Erenpreiss (2004) beschreibt als Besonderheit von Toluidinblau als externaler Farbstoff, dass er einerseits Wechselwirkungen zwischen DNA und Proteinen und somit die Kompaktheit des Chromatin anzeigt und andererseits als Indikator für die DNA-Integrität eingesetzt werden kann. Dabei beruft er sich auf frühere Untersuchungen (Erenpreisa et al., 1992; Erenpreisa et al., 1997) und schreibt der Toluidinblaufärbung ein breiteres Färbespektrum als anderen Methoden zu. Dieses Erkenntnis führt zu der Überlegung, ob die Spermienreifung im Nebenhodenschwanz

tatsächlich, wie von Garcia-Macias et al. (2006) und Hingst (1995) beschrieben, weitgehend abgeschlossen ist, oder ob hier gerade in Bezug auf die Chromatinkondensation noch Veränderungen stattfinden. Krzanowska (1982) fand bereits im Endteil des murinen Nebenhodenkopfes nahezu 100 % ungefärbte Spermienköpfe mittels Toluidinblau, während er allerdings auch beschreibt, dass im Nebenhodenschwanz alle Spermien ungefärbt waren. Ausnahmen bildeten missförmige Spermien, die sich toluidinblaupositiv darstellten und somit ein Zusammenhang mit der Pathomorphologie beschrieben wurde.

Wie auch für die Anilinblaufärbung bestehen bei der Toluidinblaufärbung unterschiedliche Erkenntnisse über eine Korrelation mit klassischen Samenparametern. Bei den eigenen Untersuchungen wurde keine Korrelation mit Vorwärtsbeweglichkeit, Vitalität oder Pathomorphologie gefunden. Mello (1982) fand bei fertilen Bullen toluidinblaupositive Färbungen bei pathomorphen Spermien. Beletti und Mello (2004) beschreiben eine hohe Korrelation boviner toluidinblaupositiver Spermien mit dem Anteil an morphologischen Veränderungen der Spermienkopfform und -größe, wohingegen ein weniger deutlicher Zusammenhang mit Veränderungen, die den Spermischwanz betrafen, bestand. Für die Autoren war dieser Zusammenhang der Chromatinkondensation mit der Kopfmorphologie zu erwarten, da der Spermienkopf fast komplett aus Chromatin zusammengesetzt ist. Dass in den eigenen Untersuchungen kein statistischer Zusammenhang zwischen Pathomorphologie und Toluidinblaufärbung besteht, könnte damit zusammenhängen, dass insgesamt nur zwanzig Proben untersucht wurden und die Chromatinveränderungen bei diesen sehr gering waren. Zudem wurde keine Differenzierung zwischen Veränderung des Spermienkopfes und anderen Pathomorphologien gemacht. Das bedeutet, dass alle morphologischen Veränderungen erfasst wurden und dies Auswirkungen auf den Zusammenhang mit dem Anteil toluidinblaupositiver Zellen gehabt haben könnte. Dennoch ist zu erwähnen, dass die Probe mit dem höchsten Anteil pathomorpher Spermien (NS-15) auch die meisten positiven Spermatozoen im Toluidinblautest aufwies. Außerdem wies dieser Rüde auch den geringsten Anteil motiler und vitaler Spermien auf, obwohl insgesamt keine Korrelation zwischen den klassischen Samenparametern und der Toluidinblaufärbung bestand.

5.3.3 Chromomycin A3

Während für humane Spermatozoen der Schwellenwert für einen Protaminmangel von Zandemami et al. (2012) auf 31 % festgelegt wurde, zeigen canine Ejakulate deutlich geringere Chromomycin A3-Werte. Dieser Unterschied zwischen Mensch und Tier wurde bereits von Bianchi et al. (1993) beschrieben, welche humane und murine Spermatozoen vor und nach künstlicher Protaminierung mit Chromomycin A3 färbten und damit den Zusammenhang der Anfärbbarkeit mit CMA3 mit einer mangelhaften Protamination darstellten. Dabei fanden sie bei den unbehandelten Proben fertiler Männer zwischen 15 und 20 % CMA3-positiver Spermatozoen, während der Wert bei der Maus mit weniger als 1 % deutlich darunter lag. Warntjen (2012) fand durchschnittlich 1,19 % CMA3-positive Spermien bei Mäusen. Zudem untersuchte Warntjen (2012) die Protamination weiterer Spezies. Es wurden Samenproben von Kaninchen, Schwein, Ziege, Schaf, Ratte und Rhesusaffe untersucht, wobei alle Tiere deutlich geringere Anteile CMA3 positiver Spermien aufwiesen als der Mensch. Humane Spermatozoen wiesen einen Mittelwert von 58,77 % auf, Rhesusaffen 1,35 %, Schweine 0,52 %, Schafe 0,24 %, Ziegen 0,13 %, Kaninchen 0,85 % und Ratten 0,19 %. Insgesamt lagen somit die CMA3 Werte bei Tieren auf einem deutlich niedrigeren Niveau als beim Menschen und lassen sich mit den eigenen Ergebnissen beim Hund vergleichen. Hecht et al. (2009) untersuchten, ob sich der Weißbüschelaffe als Tiermodell für die menschliche Spermatogenese eignet und verglichen die Protaminzusammensetzung. Sie fanden eine 91 %ige Übereinstimmung des Protamin 1 Gens bei der Untersuchung der Nukleotide. Dabei war Codon 35 beim Weißbüschelaffen, welches Arginin exprimiert, nicht vorhanden. Hecht et al. (2009) nennen das Fehlen von Codon 35 spezifisch für den Weißbüschelaffen, da sie dies bei anderen Tieren nicht beobachteten. Trotz der genannten Unterschiede kommen die Autoren zu dem Fazit, dass sich die Spermatogenese des Weißbüschelaffen als Tiermodell für den Menschen eignet. Da die Bindung von CMA3 maßgeblich von der Aminosäurezusammensetzung abhängt, ist es deutlich, welche großen speziesspezifische Unterschiede im Färbeverhalten bestehen und erklärt den geringeren Anteil der CMA3-positiver Spermien beim Hund im Vergleich zum Menschen.

Beim Bullen liegen die CMA3-Werte ebenfalls in einem ähnlichen Bereich wie beim Rüden, wie von Simões et al. (2009) anhand der Untersuchung von aufgetauten Tiefgefrierproben boviner Spermatozoen festgestellt wurde. Von vierzehn untersuchten Bullen wiesen nur zwei Tiere erhöhte Werte von $0,2 \pm 0,06$ % und $0,2 \pm 0,0$ % positive Spermien auf, wobei die restlichen Proben unter $0,1 \pm 0,05$ % lagen.

Der Vergleich zwischen Nativsamenproben und Tiefgefrierproben einerseits, sowie mit den Nebenhodenspermien andererseits ergab keine Wechselwirkung der Probenart mit den Färberesultaten. Bezüglich der CMA3-Färbung zeigt sich analog zu den Ergebnissen der übrigen Färbemethoden ein erhöhter Mittelwert von $1,36 \pm 1,77$ % gefärbter Spermien im Vergleich zum Nativsamen mit $0,90 \pm 0,79$ %. Dieser Unterschied ist wohl eher mit der Probandengruppe als mit dem Probenmaterial in Verbindung zu bringen, da zwischen den Nebenhodenspermien trotz Kryokonservierung ($\bar{x} = 0,88 \pm 0,52$ %) und den Nativsamenproben ($\bar{x} = 0,90 \pm 0,79$ %) kaum ein Unterschied besteht. Dass Simões et al. (2009) bei TG-Proben vom Bullen ebenfalls sehr wenig CMA3 gefärbte Spermien fanden, spricht für eine Eignung zur Untersuchung kryokonservierter Samenproben.

Da sich die Anilinblau- und Chromomycin A3-Färbung in ihrer Funktionsweise bzw. in ihrer Aussage am nächsten kommen, werden diese im Folgenden miteinander verglichen. Im Verlauf der Chromatinkondensation während der Spermienreifung werden Histone von Protaminen ersetzt (Alfert 1956). Lee und Cho (1999) beschreiben, dass Protamine hauptsächlich aus Arginin und Cystein zusammengesetzt sind. Chromomycin A3 bindet an Guanin-/Cytosinreiche Stellen der DNA und konkurriert mit Protaminen um die Bindungsstelle (Ward et al., 1965), während Anilinblau an Lysinreste der Histone bindet (Terquem und Dadoune, 1983). Von beiden wird somit aber ein Protaminmangel angezeigt.

Der Anteil an Chromomycin A3-gefärbten Spermien lag bei 15 der 20 Tiefgefrierproben höher, als der Anteil anilinblaugefärbter Spermien, lediglich bei vier Proben war es umgekehrt. Nur in einer Probe fanden sich identische Resultate. Auch bei den Nativsamenpräparaten zeigten sich ähnliche Ergebnisse, da 14 von 20 Proben mehr CMA3-positive Spermien enthielten, während drei Proben (NS-3, NS-9 und NS-16) die gleichen Resultate hervorbrachten. Lediglich drei der untersuchten Proben enthielten mehr anilinblaupositive Spermien als CMA3-positive Zellen (NS-7,

NS-8 und NS-13). Der Vergleich der Färbungen mittels Student-Newman-Keuls-Test ergab signifikante Unterschiede bei den Nativsamenproben und tiefgefrorenen Ejakulaten, während bei den Nebenhodenspermien keine signifikanten Unterschiede bestanden. Während bei Warntjen (2012) die Ergebnisse der Anilinblau- und CMA3-Färbung korrelierten, wurde in den eigenen Untersuchungen nur in der Gruppe der TG-Samenproben eine Korrelation nach Pearson zwischen den beiden Färbemethoden beobachtet ($r = 0,536$). Zu erklären wäre ein geringerer Anteil Anilinblau-gefärbter Spermien damit, dass in der späten Spermiogenese lysinreiche Histone erst von arginireichen Histonen ersetzt werden (Monesi, 1964). Diese werden nicht von Anilinblau angefärbt, da der Farbstoff an die Lysinreste der Histone bindet (Terquem und Dadoune 1983). Wenn an diesen Stellen noch keine Protamination stattgefunden hat, bindet Chromomycin A3 an der DNA und zeigt somit eine unvollständige Kondensation an (Bianchi et al., 1993). Monesi (1964) untersuchte autoradiographisch die Nukleoproteinzusammensetzung während der Spermiogenese der Maus. Er fand einen Übergang der typischen lysinreichen Histone zu argininreichen Histonen in der späten Spermiogenese während der Chromatinkondensation. Dieses ist noch in reifen Spermien vorhanden und wird nicht durch Protamin ersetzt. Das bedeutet Chromomycin bindet aufgrund des fehlenden Protamins, während Anilinblau wegen fehlendem Lysin nicht binden kann.

Manochantr et al. (2012) und Zandemami et al. (2012) fanden beim Mann eine negative Korrelation des Anteils CMA3-positiver Spermien mit der Spermienkonzentration, der Motilität und der normalen Morphologie. Dies konnte für den Rüden nicht bestätigt werden. Für andere Tierarten, bei denen der CMA3-Test bereits eingesetzt wurde, existieren in der Literatur wenige Angaben zur Korrelationsanalyse mit klassischen Samenparametern. Shivahre et al. (2015) beurteilten die Samenqualität zwölf verschiedener Büffelbullen mittels konventionellen und fluoreszenzmikroskopischen Färbemethoden und fand einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,878$ zwischen der individuellen Motilität und dem Anteil an CMA3-positiven Spermien. Aufgrund ihrer Erkenntnisse kamen die Autoren zu dem Entschluss, dass die Fertilität zwar mit Fluoreszenztechniken *in vitro* genauer abgeschätzt werden kann, aber dass konventionelle Samenparameter auch eine angemessene Aussagekraft haben, wenn keine weiteren Methoden verfügbar sind.

Um für den Rüden eine eindeutige Aussage zu treffen, ob die CMA3-Färbung ein von der klassischen Spermatologie unabhängiges Kriterium darstellt, sind weitere Untersuchungen notwendig, in die auch infertile Rüden aufgenommen werden sollten.

5.3.4 Akridinorangetest

Im Vergleich mit anderen Studien, in denen die Akridinorangefärbung fluoreszenzmikroskopisch eingesetzt wurde, zeigen sich vergleichbare Resultate. Der Mittelwert akridinorange-positiv gefärbter Spermien der Proben aus dem Nebenhodenschwanz lag bei $2,53 \pm 2,27$ %, während Hingst et al. (1995) beim Kater $86,5 \pm 8,7$ % grünfluoreszierender Spermien fanden. Dagegen fanden Kosower et al. (1992) in Spermien aus dem Nebenhodenschwanz von Maus, Hamster und Kaninchen ausschließlich grün fluoreszierende Spermien. Acevedo (2001) entdeckte bei fünf Bullen weniger als 12 % rote Spermien, bevor die Hoden bestimmten thermischen Bedingungen ausgesetzt wurden und die Auswirkungen untersucht wurden. Warntjen (2012) untersuchte die Chromatinintegrität von Mäusen mittels fluoreszenzmikroskopischem Akridinorangetest. Die Anzahl der Spermien mit DNA-Strangbrüchen lag bei jungen Mäusen bei $0,08 \pm 0,14$ % und bei alten Mäusen bei $0,20 \pm 0,29$ %. Der Mittelwert aller Proben lag beim Rüden bei $1,67 \pm 1,83$ % chromatininstabiler Spermien, wobei die Nativsamenproben im Mittel $1,28 \pm 0,95$ % und die TG-Proben $1,71 \pm 2,15$ % akridinorange-positiv Spermien aufwiesen. Kosower et al. (1992) fanden beim bewiesenen fertilen Mann zwischen 10 und 40 % chromatininstabile Spermien und erklären den erhöhten Anteil rot fluoreszierender Spermien mit der schnellen Nebenhodenpassage des Menschen und einem geringeren Anteil an Disulfidbrücken der Protamine. Rota et al. (2005) setzte zur Beurteilung unterschiedlicher Gefriertechniken für Rüdensperma ebenfalls die Akridinorangefärbung nach Tejada et al. (1984) ein und ermittelte je nach Methode zwischen $2,5 \pm 0,9$ % und $6,0 \pm 3,5$ % akridinorange-positiv Spermien. Die aufgetauten tiefgefrorenen Samenzellen wurden in den eigenen Untersuchungen zusätzlich mittels für den Rüden etablierten mfSCSA untersucht und wiesen einen Mittelwert von $1,56 \pm 1,86$ % auf und unterscheiden sich somit unwesentlich vom einfachen Akridinorangetest. Da wiederum in verschiedenen Studien der mfSCSA mit

dem flowzytometrischen SCSA verglichen wurde und die Ergebnisse dort korrelieren (Ardon, 2005; Löhmer, 2003), scheint die Färbung mit der ursprünglichen Methode nach Tejada et al. (1984) aussagekräftig, wobei man jedoch auf bereits erwähnte Auswertungsschwierigkeiten eingehen muss, die aber für den mfSCSA auch aufzuweisen sind. Auch Martins et al. (2007) fanden 0,5 % akridinorangegefärbte Spermien bei einem Bullen und verglichen diesen Kontrollwert mit TG-Proben mit unterschiedlichen Gefrierzusätzen des gleichen Bullen, wobei der Anteil roter Spermien immer unter 4 % lag. Sie erwähnen die genannten Grenzen der Färbemethode, weshalb sie dem TUNEL-Test den Vorzug geben, obwohl nur ein Proband untersucht wurde.

Da die Analyse der eigenen Untersuchungsergebnisse des AOT und mfSCSA von 20 TG-Spermaproben eine signifikante Korrelation ergaben, scheint der Einsatz des AOT zur Beurteilung der Chromatinstabilität für den Rüden sinnvoll und der Einsatz des zeit- und kostenintensiveren mfSCSA nicht zwingend erforderlich. Beim Vergleich der unterschiedlichen Probenarten fällt eine erhöhter Mittelwert von $1,71 \pm 2,15$ % akridinorange-positiver, das heißt chromatininstabiler Spermien bei den kryokonservierten Samenproben auf im Vergleich zu $1,28 \pm 0,95$ % beim Nativsamen. Einerseits ist diese Beobachtung dadurch zu erklären, dass die Probanden der unterschiedlichen Gruppen nicht identisch sind und die Resultate der TG-Proben auch in den übrigen Färbemethoden höher liegen. Andererseits wird durch die Akridinorangefärbung gezielt die DNA-Integrität angezeigt. Während bei Anilinblau und Chromomycin A3 der Chromatinaufbau bewertet wird, wird im AOT die DNA-Schädigung angezeigt und vom Grad der Schädigung auf die Chromatinstabilität geschlossen. Dass die Ergebnisse zwar im direkten Vergleich höher liegen, aber statistisch keine Wechselwirkung zwischen Probenart und Färberesultat vorliegt, deckt sich mit den unterschiedlichen Ergebnissen in der Vergangenheit. Für den Bullen (Khalifa et al., 2008) und den Hengst (Carretero et al., 2012a) ist ein Anstieg an DNA-Schädigungen nach Kryokonservierung beschrieben, während Biege (2004) beim Rüden signifikant mehr chromatininstabile Spermien in TG-Proben im Vergleich zu Nativsamenproben fand. Die Autorin fand für diesen Sachverhalt keine Erklärung und kam zu dem Entschluss, dass unterschiedliche Probenarten nicht verglichen werden können und kritisch zu beurteilen sind. Eine mögliche Erklärung für den höheren Anteil chromatininstabiler nativer Spermien bei Biege (2004) im Vergleich zu

übrigen Studien, in denen die DNA-Stabilität nach Kryokonservierung vermindert (Hund: Kim et al., 2010; Bulle: Khalifa et al., 2008; Hengst: Carretero et al., 2012a; Mensch: Fouz, 2010) oder unverändert ist (Hund: Prinosilova et al., 2012, Varesi et al., 2014, Rota et al., 2005), könnte der vorausgegangene Waschvorgang sein, bei dem der Verdünner und evtl. DNA-geschädigte Spermien verloren gehen könnten. So beschreiben Penfold et al. (2003) sowohl für normosperme, als auch teratosperme feline Samenproben einen Rückgang der chromatininstabilen Spermien nach Aufbereitung (Swim-Up) um ca. 50 %. Es stellt sich des Weiteren die Frage inwiefern der Verdünner der schockgefrorenen bzw. tiefgefrorenen Proben in den genannten Untersuchungen berücksichtigt wurde, da sich dieser ebenfalls auf die Stabilität des Spermienchromatins auswirkt. So konnten Sánchez et al. (2011) den Anteil fragmentierter DNA in Rüdensperma durch den Zusatz von Sucrose signifikant senken.

Im AOT zeigten die aus dem Nebenhoden gewonnenen Proben den höchsten Anteil DNA-fragmentierter Spermien mit einem Mittelwert von $2,53 \pm 2,27$ %. Statistisch gesehen lag beim Vergleich aller Färbemethoden keine Wechselwirkung zwischen Probenmaterial und Färberesultat vor, weshalb die Färbungen für alle Probenarten geeignet erscheinen. Trotzdem ist der Anteil an chromatininstabilen Spermien aus dem Nebenhoden im Vergleich zu den Ejakulaten erhöht, was statistisch beim Vergleich des AOT und des mfSCSA, mittels T-Test bestätigt wird. Hier unterschieden sich die Ergebnisse der beiden Färbungen bei den TG-Proben nicht signifikant, während bei den Nebenhodenspermien signifikant mehr chromatininstabile Spermien im Akridinorangetest nach Tejada et al. (1984) nachgewiesen werden als im von Biege (2004) etablierten modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstrukturassay. Obwohl der Probenumfang der Nebenhodenspermienproben mit acht Proben sehr klein ist, könnten die unterschiedlichen Resultate durch die abweichenden Färbeprotokolle bedingt sein.

Gemäß Acevedo (2001) wird DTT im mfSCSA zur Stabilisierung von Thiolgruppen verwendet um eine Reoxidation zu Disulfidbrücken zu verhindern und damit einen Farbumschlag nach grün zu vermeiden. Mit diesem theoretischen Hintergrund wäre beim mfSCSA ein erhöhter Anteil roter und damit chromatingeschädigter Spermien

zu erwarten. Zu erwähnen ist des Weiteren, dass eine Hundepopulation mit unterschiedlichen Rassen untersucht wurde und Khalifa et al. (2008) beim Bullen rasseabhängige Unterschiede bei der Empfindlichkeit des Spermienchromatins auf DTT beobachtet haben. Ein weiterer Unterschied im Versuchsprotokoll stellt die Inkubationsdauer der Essigsäure-Methanol-Lösung dar, welche beim AOT zehnfach erhöht ist im Gegensatz zum mfSCSA. Dies könnte den Hinweis dazu liefern, dass Spermien des Nebenhodenschwanzes empfindlicher auf Säuredenaturierung reagieren als ejakulierte Samenzellen, da beim Vergleich der beiden unterschiedlichen Protokolle für die TG-Proben keine signifikanten Differenzen auffallen. Um dies abschließend zu klären, müsste zukünftig eine größere Zahl an Nebenhodenspermienproben untersucht werden und optimaler Weise auch mit den Ejakulaten derselben Probanden verglichen werden.

Der AOT ergab als einziges der getesteten Verfahren eine geringe negative Korrelation mit der Vorwärtsbeweglichkeit ($r = 0,450$), wobei der mfSCSA nicht in die Korrelationsanalyse mit eingeflossen ist, da die Methode in diesem Versuch nicht für sprühfixierte Nativsamenproben angewendet werden konnte. Andere Untersuchungen mittels Akridinorange ergaben beim Eber eine Korrelation des Anteils chromatininstabiler Spermien mit Spermatozoen mit Zytoplasmotropfen (Ardon, 2005). Weitere Korrelationen mit der Motilität oder dem Gesamtanteil an Pathomorphologien wurden von Ardon (2005) nicht ermittelt, wobei der mfSCSA eingesetzt wurde. Ballachey et al. (1988) fanden keine signifikante Korrelation mit der Spermienmorphologie, allerdings bestand eine Korrelation mit der Motilität. Beim Rüden ermittelten Prinosilova et al. (2012) geringe negative Korrelationen des Anteils chromatininstabiler Spermien im flowzytometrischen SCSA mit der Spermiengesamtzahl, Motilität und Morphologie. Biege (2004) beobachtete ebenfalls eine Korrelation zwischen chromatingeschädigten Spermien und Pathomorphologie, sowie Membranschädigung, nicht aber mit der Motilität. Dagegen korrelierte der Prozentsatz chromatininstabiler Spermien bei den Untersuchungen von Strotmann (2009) ebenfalls negativ mit der Motilität. Ob der Akridinorangetest als unabhängiger Fertilitätsparameter angesehen werden kann, ist aufgrund unterschiedlicher Korrelationen nicht gesichert, weshalb der Chromatinstatus infertiler Rüden ebenfalls in größerem Umfang untersucht werden sollte.

5.3.5 mfSCSA

Bei der Etablierung des modifizierten fluoreszenzmikroskopischen Spermienchromatinstrukturassay für den Hund fand Biege (2004) bei 16 Rüden mit Normospermie $4,2 \pm 3,5$ % rote, also chromatininstabile Spermatozoen und bei 26 Rüden mit Dysspermie $15,7 \pm 24,3$ % Spermien mit säureinstabiler DNA. Weitere Untersuchungen zu dieser Methode liegen bis zum jetzigen Zeitpunkt für den Hund nicht vor. Allerdings fand der modifizierte fluoreszenzmikroskopische Spermienchromatinstrukturassay bereits Einsatz bei der Beurteilung der Chromatininstabilität von Eberspermien (Ardon, 2005). Es wurden die Ejakulate von 173 Ebern untersucht, wobei 85,5 % der Tiere eine hohe Chromatininstabilität mit weniger als 5 % chromatininstabilen Spermien aufwiesen. Der Mittelwert aller Tiere lag bei $3,2 \pm 3,3$ %. Löhmer (2003) verglich den flowzytometrischen Spermienchromatinstrukturassay mit dem modifizierten fluoreszenzmikroskopischen SCSA anhand von 39 bovinen Ejakulaten und fand hoch signifikant korrelierende Ergebnisse. Der Mittelwert beim SCSA lag bei 4,6 % chromatininstabilen Spermien und beim mfSCSA bei 5 %, während der Minimalwert des SCSA mit 1,7 % lediglich um 0,3 % von dem des mfSCSA abwich und der Maximalwert bei 12,6 % (SCSA) und 12,7 % (mfSCSA) lag. Für den Hengst wurde in einer Population mit 55 Hengsten unterschiedlicher Fertilität ein Fragmentierungsindex von $5,06 \pm 3,64$ % mittels SCSA bestimmt (Paradowska-Dogan et al., 2014).

Flowzytometrisch ermittelte Strotmann (2009) durch den SCSA bei 37 normospermen Rüden einen mittleren Anteil chromatininstabiler Spermien von $2,7 \pm 2,4$ %, wobei die Ergebnisse zwischen 0,5 % und 10 % lagen und somit den eigenen fluoreszenzmikroskopisch ermittelten Resultaten nahe kommen. Die Autorin nennt eine fehlende Selektion der Vatertiere auf Fertilität als möglichen Grund für eine große Varianzbreite in Bezug auf den Anteil chromatininstabiler Spermatozoen beim Hund. Masal (2010) untersuchte die Auswirkungen skrotaler Hyperthermie auf die qualitativen Samenparameter bei sieben Beaglerüden und fand keinen Anstieg des Defragmentationsindex, welcher mittels SCSA erfasst wurde. Die Werte lagen zwischen $1,9 \pm 0,2$ % und $2,5 \pm 0,3$ %. Garcia-Macias et al. (2006) verglichen flowzytometrisch den Fragmentierungsindex caniner Spermatozoen aus der

Nebenhodenpassage von 19 Rüden und weiteren acht Rüden aus dem Ejakulat. Sie fanden im Nebenhodenkopf $7,1 \pm 1,8$ %, im Nebenhodenkörper $6,1 \pm 4$ %, im Nebenhodenschwanz $5,4 \pm 1,7$ % und im Ejakulat $6,5 \pm 3$ % chromatininstabile Spermienzellen. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Chromatininstabilität zwischen Spermien des Nebenhodenschwanzes und ejakulierten Samenzellen, was die eigenen Ergebnisse bekräftigt. Der Autor sieht als kritischen Punkt für die epididymale Spermienreifung den Übergang von Nebenhodenkopf zum Nebenhodenkörper. Die von Penfold et al. (2003) über den SCSA ermittelte DNA-Integrität normospermer feliner Proben lag mit $13,8 \pm 2,4$ % deutlich höher als beim Rüden, wobei schon Hingst et al. (1995) eine verminderte Resistenz feliner Spermatozoen gegenüber In-Situ-Säuredenaturierung im Vergleich zu anderen Spezies feststellten. Auch Prinosilova et al. (2012) ermittelten bei 60 Rüden einen Maximalwert von 9 % DNA-fragmentierter Spermien mittels flowzytometrischem SCSA, was die Plausibilität der eigenen Untersuchungsergebnisse untermauert. Ebenso fanden Peres et al. (2014), die die Ejakulatbeschaffenheit von vier an Muskeldystrophie erkrankten Golden Retrievern mit fünf gesunden Hunden verglichen und anhand flowzytometrischer Akridinorangefärbung die DNA-Integrität erfassten, vergleichbare Werte von $6,5 \pm 1$ % in der gesunden Population. In Probennummer TG-1 wurde ein Maximalwert von 7,8 % DNA-geschädigter Spermien gefunden, welche auch in der Anilinblaufärbung, Toluidinblaufärbung, dem Akridinorangetest, CMA3 und TUNEL annähernd Höchstwerte aufwies, was die Tendenz eines Zusammenhangs verdeutlicht, welcher statistisch aber nur in Form einer Korrelation mit dem AOT besteht. Möglicherweise ist der mfSCSA aufgrund von Farbzwischenstufen zwischen grün, gelb, orange und rot anfälliger für Fehlinterpretation und verliert daher den Zusammenhang zu den anderen Färbemethoden, bei denen die Ergebnisse gefärbt entspricht positiv und ungefärbt entspricht negativ eindeutiger scheinen. Beim Vergleich der Mittelwerte des AOT und mfSCSA fällt für die Nebenhodenspermien eine deutliche Differenz (mfSCSA: $0,53 \pm 0,44$ %; AOT: $2,53 \pm 2,27$ %) auf. Da bereits Biege (2004) einen Zusammenhang zwischen Raumtemperatur und Färbeergebnis beobachtete, stellt sich die Frage, ob die gemäß Protokoll unterschiedliche Temperatur der angewendeten Lösungen die abweichenden Färberesultate bedingt. Da zwischen den beiden Akridinfärbungen beim Vergleich der TG-Samenproben keine solche Differenz auftritt (mfSCSA: $1,56 \pm$

1,86 %; AOT: $1,71 \pm 2,15\%$) besteht der Verdacht, das Spermienchromatin aus dem Nebenhodenschwanz empfindlicher auf äußere Faktoren reagiert. Da bei der Untersuchung der Wechselwirkung der Probenart und dem Ergebnis der Färbemethode nur in den Gruppen, in denen der mfSCSA eingeschlossen war (TG-Proben und Nebenhodenspermien) eine Abhängigkeit des Färberesultats vom Probenmaterial bestand, scheint die Anwendung der Methode für Nebenhodenspermien fraglich. Andererseits muss hinterfragt werden, ob die Chromatinkondensation im caninen Nebenhodenschwanz abgeschlossen ist, oder ob hier noch Prozesse stattfinden, die die Empfindlichkeit auf äußere Reize beeinflussen.

5.3.6 TUNEL

Wie bereits oben erwähnt, existieren bisher wenige Studien, in denen der TUNEL-Test zur Beurteilung der Chromatinkondensation von Rüdenspermatozoen Verwendung fand. Hier liegen die Anteile von Spermien mit fragmentierter DNA deutlich unter den für den fertilen Mann ermittelten Werten. So verglichen Hammadeh et al. (2010) die Protamination, sowie die DNA-Fragmentierung mittels TUNEL und die Chromatinkondensation mittels CMA3 von Rauchern und Nichtrauchern. Der Anteil an TUNEL-positiven Spermien lag bei 63 Nichtrauchern bei $11,3 \pm 4,2$ %. Ähnliche Werte fanden Chohan et al. (2006) bei einer Gruppe von sieben fertilen Männern mit $11,1 \pm 0,9$ %.

Lange-Consiligo et al. (2010) untersuchten das Ejakulat von elf Rüden auf DNA-Fragmentierungen und morphometrische Anomalitäten. Pro Rüden wurden 10000 Spermien flowzytometrisch beurteilt und es wurden zwischen 0,36 % und 12,58 % Spermien mit DNA-Fragmentierung nachgewiesen, wobei der Mittelwert bei 4,78 % und der Median bei 3,16 % TUNEL-positiven Spermien lag. Diese Werte liegen höher als die eigenen ermittelten Werte, welche Abweichung sich einerseits durch die flowzytometrische Auswertung, andererseits durch die relativ geringe Zahl an Probanden ergeben könnte.

Sánchez et al. (2011) untersuchten den Einfluss der Vitrifikation auf die DNA-Stabilität mittels fluoreszenzmikroskopischer TUNEL-Färbung. In einer Gruppe von 4

gesunden Rüden wurden im Mittel $5,6 \pm 0,6$ % Spermien mit fragmentierter DNA gefunden, wobei dieser Anteil mit dem Zusatz von Sucrose auf $2,8 \pm 0,5$ % abgesenkt werden konnte. Auch in dieser Studie scheint die Zahl der Probanden sehr gering und es ist zu erwähnen, dass bisher keine Arbeit zu existieren scheint, in dem der TUNEL-Test in einer größeren Rüdenpopulation getestet wurde.

Bei der Maus liegt der Anteil an Spermien mit fragmentierter DNA mit durchschnittlich unter 0,83 % (Warntjen, 2012) ähnlich niedrig wie beim Rüden, weshalb die eigenen Ergebnisse plausibel erscheinen.

Auch Villani et al. (2010) wiesen in humanen Ejakulaten höhere Anteile von Spermatozoen mit fragmentierter DNA nach als in murinen und bovinen Ejakulaten. Es erfolgte eine Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen DNase sowie Wasserstoffperoxid als Vertreter der reactive oxygen species (ROS). Anschließend wurden die Proben auf die Zahl an DNA-Strangbrüchen untersucht, was mit Hilfe des Alkaline Comet Assays, des Neutral Comet Assays, des SCSA und des TUNELs erfolgte. Flowzytometrisch wurde dabei bei unbehandelten Proben der Männer bis zu 20 % TUNEL-positiver Zellen gefunden, während die bovinen Proben unter ca. fünf Prozent und die murinen Nebenhodenspermien unter ca. zwei Prozent lagen.

Martins et al. (2007) fanden bei einem Bullen mit bewiesener Fertilität im Rahmen der Untersuchungen der Auswirkung des Gefriertrocknens auf die DNA-Integrität in tiefgefrorenem Samen nur 1 % TUNEL-positiver Zellen, während der Anteil in den gefriergetrockneten Proben je nach Behandlungsmethode zwischen zwei und vierzehn Prozent lag (Martins et al., 2007).

Mota und Ramalho-Santos (2006) untersuchten epididymale Spermatozoen von 36 Katzen mittels TUNEL-Methode. Hierfür wurde ein abweichendes TUNEL-Kit verwendet, das aber auf dem gleichen System beruht (APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit, Firma Molecular Probes). Es wurden zwischen 0 und 68 % TUNEL-positive Zellen nachgewiesen und der Mittelwert lag bei 13 ± 12 %, wobei der Anteil TUNEL-positiver Zellen nicht mit dem Anteil apoptotischer Zellen, die mittels AnnexinV-Nachweis ermittelt wurden, korrelierten, weshalb der Autor von einer apoptoseunabhängigen Ursache für die DNA-Fragmentierung ausgeht.

Diese geringen Prozentsätze bestätigen die These, dass bei Untersuchungen zur Chromatinkondensation, in diesem Fall dem TUNEL-Test in der veterinärmedizinischen Andrologie insgesamt geringere Ergebnisse zu erwarten sind. Eine Ausnahme bilden hier Metatheria-Arten. Bennetts et al. (2005) untersuchten die Empfindlichkeit humaner und muriner Spermien gegenüber oxidativem Stress in Form von Wasserstoffperoxid im Vergleich zu Wallaby-Spermien. Nach Exposition mit unterschiedlichen Konzentrationen an H_2O_2 wurde die Fragmentation der mitochondrialen DNA und des nukleären Spermienchromatins mithilfe der Alkaline-Agarose-Elektrophorese, der Pulsed-Field-Gelelektrophorese und der quantitativen PCR untersucht. Es ergab sich insgesamt eine höhere Empfindlichkeit der mitochondrialen DNA im Vergleich zur nukleären DNA, wobei die quantitative PCR keine DNA-Schäden der nukleären DNA detektierte. Mittels Gelelektrophorese wurden bei humanen Spermatozoen durch oxidativen Stress verursachte nukleäre DNA-Schäden gefunden, die bei den murinen Proben nicht nachgewiesen werden konnten. Im Vergleich zu den eutherischen Spermatozoen zeigten die des Wallabys eine höhere Resistenz der mitochondrialen DNA gegenüber Wasserstoffperoxid, wohingegen die nukleäre DNA anfälliger gegenüber oxidativer Schäden war. Diese Empfindlichkeit erklären die Autoren mit dem Fehlen von Disulfidbrücken im Spermienchromatin der Marsupilia und erschließen daraus die wichtige Bedeutung der Chromatinkondensation gegen die Genotoxizität von oxidativem Stress. Zee et al. (2009), welche die DNA-Integrität von Koala-Spermien mittels SCD und Cometassay zur Differenzierung von Doppelstrang und Einzelstrangbrüchen testeten, erwiesen, dass Einzelstrangbrüche einen normalen Prozess in der Spermio-genese des Koalas darstellen. Diese Untersuchungen verdeutlichen speziesspezifische Unterschiede der Chromatinstabilität und zeigen auf, dass ein Vergleich zwischen Mensch und Tier aufgrund eines abweichenden biochemischen Aufbaus des Spermienchromatin nicht immer möglich ist.

Wie bereits bei vorherigen Färbemethoden besteht keine Wechselwirkung zwischen Probenart und dem Färberesultat. Das bedeutet, dass die entsprechenden Protokolle sowohl für Nativsamen, als auch TG-Sperma und Nebenhodensperma eingesetzt werden können. Dies wird auch beim Vergleich der jeweiligen Mittelwerte deutlich, welche für den Nativsamen bei $0,95 \pm 2,07$ % fragmentierter DNA, bei den TG-Proben bei $1,42 \pm 1,55$ % und für die Nebenhodenproben bei $0,70 \pm 0,36$ % liegen.

Auch bei dieser Färbemethode zeigt sich eine hohe Chromatininstabilität, die canine Spermatozoen bereits während der Nebenhodenpassage erlangen.

Ein Zusammenhang mit klassischen Samenparametern konnte in den eigenen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden, was die Bedeutung als separaten Samenqualitätsparameter hervorhebt. Die Nativsamenprobe (NS-16) mit dem höchsten Anteil fragmentierter DNA im TUNEL-Test (9,8 %) wies keine Auffälligkeiten bei der konventionellen Samenuntersuchung auf. Da in der humanmedizinischen Andrologie Zusammenhänge der DNA-Fragmentierung und Fertilitätsrate untersucht wurden (Lopes et al., 1998), wäre ein nächster Schritt, die DNA-Fragmentierung infertiler Rüden zu erforschen, vor allem dann, wenn konventionelle Samenparameter die Infertilität nicht erklären.

5.3.7 Caspase-3-Aktivität

Der geringe Anteil Caspase-3-positiver Zellen scheint insofern plausibel, da auch bei Untersuchungen humaner Samenproben eine geringere Caspaseaktivität gefunden wurde als TUNEL-positive Zellen. Fouz (2010) untersuchte die Auswirkungen der Aufbereitung und Kryokonservierung humaner Spermatozoen und fand in nativen Samenproben fertiler Männer mehr als zweimal höhere Werte in der TUNEL-Färbung ($14,85 \pm 17,64$ %) im Vergleich zur Caspase-3 Färbung ($5,8 \pm 11,59$ %). Da bei den eigenen Untersuchungen schon das Mittel des TUNEL-Tests alle Proben bei lediglich $1,10 \pm 1,70$ % lag, erscheint der Mittelwert der Caspase-aktiven Spermien aller Proben mit $0,32 \pm 0,4$ % plausibel. Zudem fand Herr (2010) bei histologischen Untersuchungen caniner Sertolizellen durchschnittlich 0,5 % Caspase-3-aktive Zellen, wobei dieser Wert durch Wärmeapplikation auf 2,9 % gesteigert wurde. Auch in dieser Studie lagen die Caspasewerte deutlich unter denen der TUNEL-Untersuchung (TUNEL: 2,9 %, Caspase: 0,5 %). Ähnliche Erkenntnisse lieferten die Untersuchungen von Henning et al. (2014), die die Auswirkungen skrotaler Hyperthermie auf canine testikuläre Zellen untersuchten.

Der scheinbare Widerspruch, dass die Ergebnisse aus TUNEL-Test und Caspase-Nachweis unterschiedliche Ergebnisse erzielten, lässt sich damit erklären, dass der TUNEL-Test auch apoptoseunabhängige DNA-Fragmentierungen detektiert. Dies

wurde von Mota und Ramalho-Santos (2006) festgestellt, die bei der Untersuchung feliner Nebenhodenspermien mehr TUNEL-positive als Annexin-V-positive Zellen fanden. Sokolowska et al. (2009) fanden bei ihren Untersuchungen der Caspaseaktivität tiefgefrorener Samenproben mittels Pancaspaseinhibitor bei acht Rüden zwischen 7,3 und 70,7 % Spermien mit aktiver Caspase. Die erhöhten Werte sprechen einerseits für ein breiteres Erfassen von apoptotischen Zellen, da alle Caspasen detektiert werden, andererseits muss die kleine Probandenzahl berücksichtigt werden. Die Autoren fanden einen Zusammenhang zu klassischen Samenparametern, welcher auch in der eigenen Studie vorlag. Beim Vergleich der Ergebnisse aus der klassischen Samenanalyse von 20 Nativsamenproben fand sich eine Korrelation mit $p < 0,05$ der Caspase-3-Aktivität mit der Vitalität ($r = 0,463$) und Pathomorphologie ($r = 0,445$). Diese Parameter zeigten mit keiner der übrigen Untersuchungen zur Chromatinkondensation eine Korrelation, sodass der Einsatz aufgrund des hohen Kosten- und Zeitaufwandes nicht empfehlenswert erscheint, da bereits die klassische Samenanalyse Aufschluss über die Samenqualität inklusive der Caspaseaktivität gibt. Mit einem Mittelwert von $0,29 \pm 0,34$ % Caspase-3-Aktivität bei den tiefgefrorenen Samenproben war diese Methode die einzige, bei der die Nativsamenproben keine niedrigeren Werte hervorbrachten ($0,30 \pm 0,44$ %), was nur durch einen erhöhten Anteil nekrotischer Zellen nach dem Auftauen erklärt werden kann. Auch die Caspaseaktivität der kryokonservierten Nebenhodenspermien liegt mit einem Mittel von $0,45 \pm 0,37$ % auf einem sehr niedrigen Niveau, weshalb weitere Untersuchungen zum immunhistochemischen Nachweis der Caspase-3-Aktivität in caninen Samenzellen notwendig sind. Des Weiteren sollte der bereits für den Hengst (Muñoz, 2015) beschriebene Zusammenhang mit intrazellulären Thiolen auch für den Rüden untersucht werden.

5.4 Fazit für die veterinärmedizinische Praxis

Fasst man die erlangten Erkenntnisse bezüglich der Methodik, Auswertung und Färberesultate zusammen, kann für die veterinärmedizinische Praxis, in der kein Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung steht, die Toluidinblaufärbung empfohlen werden. Der etwas erhöhte Kosten- und Zeitaufwand des Färbevorgangs im Vergleich zur Anilinblaufärbung kann durch eine schnellere und einfachere

Auswertung ausgeglichen werden, da ein besserer Kontrast positiver und negativer Spermien besteht und sich toluidinblaunegative Spermienköpfe besser vom Hintergrund abheben als in der Anilinblaufärbung. Die Ergebnisse beider lichtmikroskopischer Färbemethoden korrelierten in dieser Arbeit miteinander, sodass man der Färbung mit der höheren Praktikabilität bei der Auswertung den Vorzug gewähren kann.

Steht ein Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung kann die Chromomycin A3-Färbung empfohlen werden, wenn mit dem Farbstoff mit der nötigen Sorgfalt aufgrund des hohen Gesundheitsrisikos umgegangen wird. Dieses ist in Kauf zu nehmen, da sprühfixierte Ausstriche für einen Färbvorgang gesammelt werden können und somit die Frequenz der Färbungen auf ein Minimum reduziert werden kann. Im Vergleich zu Färbungen mit Akridinorange können CMA3-positive Spermien mit hoher Sicherheit angesprochen werden, da diese eine starke Fluoreszenz zeigen und keine Farbzwischenstufen auftreten. Die Färbung ist schnell und im Vergleich zur TUNEL-Färbung und des Caspase-3-Nachweises kostengünstiger. Obwohl die Akridinorange-Färbungen am kostengünstigsten sind, kommt es hier zu einem erhöhten Zeitaufwand bei der Auswertung, da es auf dem Objektträger häufig zu Arealbildungen und somit Unsicherheiten beim Ansprechen chromatininstabiler Spermien kommt. Aufgrund von nachgewiesenen Korrelationen zwischen dem CMA3 und dem AOT sowohl beim Nativsamen ($r = 0,645$) wie auch beim kryokonservierten Samen ($r = 0,752$) und Korrelationen des CMA3 mit dem mfSCSA ($r = 0,544$) kann der Chromomycin A3-Färbung der Vorzug gegeben werden.

Da Anilinblau als einzige Methode mit der TUNEL-Färbung korrelierte ($r = 0,557$) stellt diese eine sehr kostengünstige und schnelle lichtmikroskopische Möglichkeit zur Beurteilung der Chromatinkondensation dar, wenn auch die beschriebenen Schwierigkeiten bei der Auswertung vorlagen. Da der TUNEL-Test und die Caspase-Färbung keine weiteren Korrelationen aufweisen, scheinen sie einen gesonderten Stellenwert einzunehmen. Hier sind Untersuchungen an infertilen Probanden notwendig um eine bessere Aussage darüber treffen zu können, ob die Methoden für die veterinärmedizinische, canine Andrologie in der Praxis wertvoll sind. Da die Caspase-3-Aktivität in dieser Untersuchung mit dem Anteil avitaler Spermien ($r = 0,463$) und pathomorphen Spermien ($r = 0,445$) korrelierte scheint der Kosten- und

Zeitaufwand zu intensiv. Aufgrund eines sehr niedrigen Anteils positiver Spermien im TUNEL und im Caspase-3-Nachweis scheint hier die flowzytometrische Auswertung eine höhere Genauigkeit zu erzielen.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es unterschiedliche Färbungen zur Darstellung der Chromatinkondensation in caninen Spermatozoen zu testen und miteinander zu vergleichen. Wichtig war es für bereits etablierte Methoden umfassendere Ergebnisse zu erhalten und diese mit Verfahren zu vergleichen, die noch nicht für den Rüden etabliert sind. Weiterhin sollte die Praktikabilität der Färbemethoden getestet werden, wobei auch finanzielle und gesundheitliche Aspekte zu beachten sind. Es wurden Samenzellen von insgesamt 48 fertilen Rüden untersucht, wovon zwanzig Proben Nativsamenpräparate darstellten, zwanzig Proben kryokonservierte Spermien waren und weitere acht Proben aus dem Nebenhodenschwanz kastrierter Rüden entnommen und kryokonserviert wurden. Pro Samenprobe wurden zur Untersuchung der Chromatinkondensation sieben Färbungen und Auswertungen vorgenommen. Folgende Methoden wurden verwendet: Anilinblau, Toluidinblau, Chromomycin A3, Akridinorange (zwei verschiedene Protokolle), TUNEL und Caspase-3-Aktivität.

Zusätzlich wurden bei den zwanzig Nativsamenpräparaten eine makroskopische Samenuntersuchung, eine Eosinfärbung zur Vitalitäts- und Morphologiebeurteilung, sowie eine Motilitätsbestimmung vorgenommen. Dreizehn der nativen Präparate wurden zusätzlich mittels computerassistierter Samenanalyse beurteilt.

Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Alle Rüden zeigten weniger als 9 % Spermien mit Chromatininstabilitäten, wobei die Mittelwerte aller Untersuchungen unter 2,53 % lag.
- Es bestand keine Wechselwirkung zwischen Probenart und dem Färberesultat, weshalb alle untersuchten Methoden zur Darstellung der Chromatinkondensation auch für kryokonservierte canine Samenproben geeignet sind.
- Mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich der Färbung fanden sich deutlich unterschiedliche Untersuchungsergebnisse.
- Der gezielte Vergleich der Akridinorange-Färbeprotokolle mittels T-Test ergab für die TG-Spermproben keine signifikanten Unterschiede, weshalb der erhöhte

Kosten- und Zeitaufwand des mfSCSA bei ähnlichen Auswertungsschwierigkeiten und Gesundheitsrisiken wie beim AOT, nicht gerechtfertigt scheint.

- Die Anilinblaufärbung ist die schnellste der untersuchten Methoden und erfordert als lichtmikroskopische Methode kein teures Equipment, wobei die Kontraste zwischen schlecht und gut kondensierten Spermien schwächer sind als im aufwendigeren Toluidinblau-Test.

- Signifikante Korrelationen ergaben sich für die Nativsamenproben zwischen dem AOT mit der Anilinblaufärbung ($r = 0,567$) und dem CMA3-Test ($r = 0,645$). Ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,455$ besteht zwischen Anilinblau mit Toluidinblau und von $r = 0,557$ zwischen Anilinblau und TUNEL, sowie mit $r = 0,538$ für CMA3 und Toluidinblau.

- Bei den TG-Proben korrelierten die Ergebnisse des AOT mit $p < 0,01$ mit Anilinblau ($r = 0,582$), mfSCSA ($r = 0,682$) und CMA3 ($r = 0,752$) und zusätzlich korrelierte die Toluidinblaufärbung mit der Anilinblaufärbung ($r = 0,698$). Eine Korrelation mit $p < 0,05$ ergab sich für den CMA3-Test mit Anilinblau ($r = 0,536$), Toluidinblau ($r = 0,453$) und den mfSCSA ($r = 0,544$).

- Die Ergebnisse der Färbungen der kryokonservierten Nebenhodenspermien korrelierten mit $p < 0,05$ zwischen dem CMA3 und Toluidinblau ($r = 0,719$) sowie zwischen dem AOT und TUNEL-Test ($r = 0,760$). Die geringe Probandenzahl von acht Rüden ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten.

- Es besteht nur ein geringer Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der klassischen Samenuntersuchung und denen der Chromatinkondensation. Die Motilität korreliert negativ mit $p < 0,05$ mit dem Anteil chromatininstabiler Spermien im AOT ($r = 0,450$), während die Caspase-3-Aktivität negativ mit der Vitalität ($r = 0,463$) und positiv mit der Pathomorphologie ($r = 0,445$) korreliert.

Für die veterinärmedizinische Andrologie beim Rüden ist der Toluidinblautest als lichtmikroskopische Färbemethode und die Chromomycin A3-Färbung als einfaches, schnelles und kostengünstiges fluoreszenzmikroskopisches Verfahren zu empfehlen.

7 Summary

The aim of this study was to establish and compare different staining methods for chromatin condensation in canine spermatozoa. One aspect was to gain more data using established methods and then compare those to methods, which have not been validated for dogs yet. Furthermore the practicability of the different staining methods was evaluated, also looking at financial and health aspects.

A total of 48 semen samples of fertile male dogs were examined: 20 samples native semen, 20 samples cryopreserved ejaculated spermatozoa and eight samples cryopreserved spermatozoa from epididymis of castrated male dogs.

Each sample was evaluated regarding chromatin condensation using seven different staining techniques. Following methods were used: aniline blue staining, toluidine blue staining, acridine orange staining (two different protocols), Chromomycin A3 staining, TUNEL staining and Caspase-3 activity. In addition, the 20 native semen samples were examined macroscopically and an eosin stain was used to assess viability, morphology and motility. Thirteen of the samples were also analysed by computer-assisted semen analysis.

The following results were obtained:

- All dogs had less than 9% spermatozoa with chromatin instabilities, with mean values of all examinations below 2.53%.
- There were no interactions between sample type and staining result. Therefore all evaluated methods for chromatin condensation can be also used for cryopreserved canine semen samples.
- By using the two factor variance analysis with repeated measures in terms of the staining technique the examination results differed distinctively.
- The specific comparison of the two acridine orange staining protocols by t-test analysis showed no significant differences in the cryopreserved samples. With similar assessment problems and health risks, the higher financial costs and effort of mfSCSA do not seem justified.

- The aniline blue staining is the fastest of the examined methods. As microscopic method no expensive equipment is required. But it has less contrast between high and low condensed chromatin structures compared to the more expensive toluidine blue staining.

- Within the native semen samples a significant correlation was found between AOT with aniline blue ($r = 0.567$) and CMA3 ($r = 0.645$). A correlation coefficient of $r = 0.455$ and $r = 0.557$ was identified between aniline blue and toluidine blue and between aniline blue and TUNEL, respectively. Between CMA3 and toluidine blue r was 0.538.

-The frozen semen showed a correlation of $p < 0.01$ between AOT and aniline blue ($r = 0.582$), between AOT and mfSCSA ($r = 0.682$), between AOT and CMA3 ($r = 0.752$) and between toluidine blue and aniline blue ($r = 0.698$). A correlation of $p < 0.05$ exists between CMA3 and aniline blue ($r = 0.536$), toluidine blue ($r = 0.453$) and mfSCSA ($r = 0.544$).

- The epididymal cryoconserved samples had a correlation coefficient of $r = 0.719$ between CMA3 and toluidine blue and $r = 0.760$ between AOT and TUNEL. When interpreting the results, the low number of samples should be noted.

- There is only a small correlation given between the results of the classical semen analysis and the chromatin examination. A negative correlation of $r = 0.450$ can be found between motility and AOT, while sperms with caspase-3-activity are correlated negatively with the vitality ($r = 0.463$) and are correlated positively with the pathomorphology ($r = 0.445$).

For canine andrology two staining methods can be recommended: toluidine blue as a light microscopic technique and Chromomycin A3 as a simple, fast and inexpensive fluorescence microscopic technique.

8 Literaturverzeichnis

Acevedo, N. (2001)

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

Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, Master Thesis 2001, Blacksburg, Virginia, USA

Alfert, M. (1956):

Chemical differentiation of nuclear proteins during spermatogenesis in the salmon.

The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology 2 (2), 109–114

Althouse, G. C.; Hopkins, S. M. (1995):

Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores.

Theriogenology 43 (3), 595–603

Andree, H. A.; Reutelingsperger, C. P.; Hauptmann, R.; Hemker, H. C.; Hermens, W. T.; Willems, G. M. (1990):

Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers.

The Journal of Biological Chemistry 265 (9), 4923–4928

Aoki, V. W.; Liu, L.; Carrell, D. T. (2005):

Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males.

Human Reproduction 20 (5), 1298–1306

Ardon, F. (2005):

Studies on the interaction of chromatin-unstable boar sperm with the female reproductive tract.

Tierärztliche Hochschule, Dissertation 2005, Hannover

Baeyer, A. (1880):

Ueber die Verbindungen der Phtalsäure mit den Phenolen.

Justus Liebig's Annalen der Chemie 202 (1), 36–49

Balhorn, R.; Gledhill, B. L.; Wyrobek, A. J. (1977):

Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization.

Biochemistry 16 (18), 4074–4080

Ballachey, B. E.; Hohenboken, W. D.; Evenson, D. P. (1987):

Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility.

Biology of Reproduction 36 (4), 915–925

Ballachey, B. E.; Evenson, D. P.; Saacke, R. G. (1988):

The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls.

Journal of Andrology 9 (2), 109–115

Beletti, M. E.; Mello, M. L. S. (2004):

Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology.

Theriogenology 62 (3-4), 398–402

Bennetts, L. E.; Aitken, R. J. (2005):

A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa.

Molecular Reproduction and Development 71 (1), 77–87

Bianchi, P. G.; Manicardi, G.; Bizzaro, D.; Campana, A.; Bianchi, U.; Sakkas, D. (1996):

Use of the guanine-cytosine (GC) specific fluorochrome, chromomycin A3, as an indicator of poor sperm morphology.

Journal of Assisted Reproduction and Genetics 13 (3), 246–250

Bianchi, P. G.; Manicardi, G. C.; Bizzaro, D.; Bianchi, U.; Sakkas, D. (1993):

Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa.

Biology of Reproduction 49 (5), 1083–1088

Biege, J.-J. 2004:

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

Tierärztliche Hochschule, Dissertation, 2004, Hannover

Bizzaro D. (1998):

In-situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA.

Molecular Human Reproduction 4 (2), 127–132

Bochenek, M.; Smorag, Z.; Pilch, J. (2001):

Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination.

Theriogenology 56 (4), 557–567

Boyer, S.P.; Davis, R.O.; Katz, D.F. (1989)

Automated semen analysis

Current Problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility 12, 167-200

Bratton, D. L.; Fadok, V. A.; Richter, D. A.; Kailey, J. M.; Guthrie, L. A.; Henson, P. M. (1997):

Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase.

The Journal of Biological Chemistry 272 (42), 26159–26165

Brunk, C. F.; Jones, K. C.; James, T. W. (1979):

Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates.

Analytical Biochemistry 92 (2), 497–500

Carretero, M. I.; Arraztoa, C. C.; Casaretto, C. I.; Huanca, W.; Neild, D. M.; Giuliano, M. S. (2012a):

Alpaca sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue

L. Boersma (Hrsg.), Fibre production in South American camelids and other fibre animals Wageningen Academic Publishers 141–144

Carretero, M. I.; Arraztoa, C. C.; Ferrante, A.; Caldevilla, M.; Santa Cruz, R.; Neild, D. (2012b):

Evaluation of stallion sperm DNA during cryopreservation using the Toluidine Blue stain and the Sperm Chromatin Dispersion test.

Journal of Equine Veterinary Science 32 (8), S. 480

Carretero, M. I.; Giuliano, S.; Agüero, A.; Pinto, M.; Miragaya, M.; Trasorras, V. et al. (2010):

308 Guanaco sperm chromatin evaluation using toluidine blue

Reproduction, Fertility and Development 22 (1), 310

Cheuquemán, C.; Bravo, P.; Treulén, F.; Giojalas, Lc; Villegas, J.; Sánchez, R.; Risopatrón, J. (2012):

Sperm membrane functionality in the dog assessed by flow cytometry.

Reproduction in Domestic Animals 47 (1), 39–43

Chohan, K. R.; Griffin, J. T.; Lafromboise, M.; De Jonge, C.J.; Carrell, D. T. (2006):

Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm.

Journal of Andrology 27 (1), 53–59

Choi, B.S.; Kim, T.-K.; Hyun, C. (2011):

Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Canine Sperm.

Journal of Animal and Veterinary Advances 10 (12), 1501–1503.

Coelingh, J. P.; Monfoort, C. H.; Rozijn, T. H.; Leuven, J. A.; Schiphof, R.; Steyn-Parvé, E. P.; Braunitzer G.; Schrank B.; Ruhfus A. (1972):

The complete amino acid sequence of the basic nuclear protein of bull spermatozoa.

Biochimica et Biophysica Acta 285 (1), 1–14

Cossarizza, A.; Baccarani-Contri, M.; Kalashnikova, G.; Franceschi, C. (1993):

A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1).

Biochemical and Biophysical Research Communications 197 (1), 40–45.

Cross, N. L.; Morales, P.; Overstreet, J.W.; Hanson, F. W. (1986):

Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm.

Gamete Research 15 (3), 213–226

Dadoune, J. P.; Mayaux, M. J.; Guihard-Moscato, M. L. (1988):

Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics.

Andrologia 20 (3), 211–217

Darżynkiewicz, Z.; Traganos, F.; Sharpless, T.; Melamed, M. R. (1977):

Interphase and metaphase chromatin. Different stainability of DNA with acridine orange after treatment at low pH.

Experimental Cell Research 110 (1), 201–214

Darżynkiewicz, Z.; Traganos, F.; Sharpless, T.; Melamed, M. R. (1975):

Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry.

Experimental Cell Research 90 (2), 411–428

Didion, B. A.; Dobrinsky, J. R.; Giles, J. R.; Graves, C. N. (1989):

Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species.

Gamete Research 22 (1), 51–57

Dott, H. M.; Foster, G. C. (1972):

A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain.

Journal of Reproduction and Fertility (29), 443–445

Duran, E. H.; Gurgan, T.; Gunalp, S.; Enginsu, M. E.; Yarali, H.; Ayhan, A. (1998):

A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro.

Human Reproduction 13 (5), 1235–1239

Ehrlich P. (1877):

Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik.

Archiv für mikroskopische Anatomie 13: 263-278

Erenpreiss, J.; Bars, J.; Lipatnikova, V.; Erenpreisa, J.; Zalkalns, J. (2001):

Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity.

Journal of Andrology 22 (1), 45–53

Erenpreisa, J.; Freivalds, T.; Selivanova, G. (1992):

Influence of chromatin condensation on the absorption spectra of nuclei stained with toluidine blue.

Acta Morphologica Hungarica 40 (1-4), 3–10

Erenpreisa, J.; Freivalds, T.; Roach, H.; Alston, R. (1997):

Apoptotic cell nuclei favour aggregation and fluorescence quenching of DNA dyes.

Histochemistry and Cell Biology 108 (1), 67–75

Erenpreiss, J.; Jepson, K.; Giwercman, A.; Tsarev, I.; Erenpreisa, Je; Spano, M. (2004):

Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays.

Human Reproduction 19 (10), 2277–2282

Evenson, D. P.; Dażrynkiewicz, Z.; Melamed, M. R. (1980):

Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.

Science 210 (4474), 1131–1133

Evenson, D. P.; Darżynkiewicz, Z.; Melamed, M. R. (1982):

Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility.

The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 30 (3), 279–280

Evenson, D. P.; Jost, L. K.; Marshall, D.; Zinaman, M. J.; Clegg, E.; Purvis, K. Angelis, P. de; Claussen, O. P. (1999):

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

Human Reproduction (Oxford, England) 14 (4), 1039–1049

Evenson, D.; Wixon, R. (2005):

Comparison of the Halosperm® test kit with the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis.

Fertility and Sterility 84 (4), 846–849

Fernández, J. L.; Muriel, L.; Rivero, M.T.; Goyanes, V.; Vazquez, R.; Alvarez, J.G. (2003):

The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation.

Journal of Andrology 24 (1), 59–66

Fouz, H. (2010):

Die Wirkung der Kryokonservierung auf die Apoptoserate menschlicher Spermatozoen fertiler und subfertiler Männer mittels Fluoreszenzimmunhistochemie.

Universität des Saarlandes, Dissertation 2010, Homburg/Saar

Fraser, L.; Lecewicz, M.; Strzezek, J. (2002):

Fluorometric assessments of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage.

Polish Journal of Veterinary Sciences 5 (2), 85–92

Fraser, L. R.; Abeydeera, L. R.; Niwa, K. (1995):

Ca (2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis.

Molecular Reproduction and Development 40 (2), 233–241

Garcia-Macias, V.; Martínez-Pastor, F.; Alvarez, M.; Garde, J. J.; Anel, Enrique; Anel, L.; Paz, P. (2006):

Assessment of chromatin status (SCSA) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog.

Theriogenology 66 (8), 1921–1930

Garner, D. L.; Pinkel, D.; Johnson, L. A.; Pace, M. M. (1986):

Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses.

Biology of Reproduction 34 (1), 127–138

Garner, D. L.; Johnson, L. A. (1995):

Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide.

Biology of Reproduction 53 (2), 276–284

Garner, D. L.; Johnson, L. A.; Yue, S. T.; Roth, B. L.; Haugland, R. P. (1994):

Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide.

Journal of Andrology 15 (6), 620–629

Gause, G. F. (1965):

Olivomycin, mithramycin, chromomycin: three related cancerostatic antibiotics.

Advances in Chemotherapy 2, 179–195

Goetz, A.; Goetz, S. S. (1938):

Vitrification and Crystallization of Organic Cells at Low Temperatures.

Journal of Applied Physics 9 (11), 718

Gorczyca, W.; Traganos, F.; Jesionowska, H.; Darzynkiewicz, Z. (1993):

Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental Cell Research* 207 (1), 202–205

Günzel-Apel, A.-R. (1994):

Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund. *Der Zuchtrüde*.

Jena, Stuttgart: Fischer (VET special), 11-47

Guérin, P.; Ferrer, M.; Fontbonne, A.; Bénigni, L.; Jacquet, M.; Ménézo, Y. (1999):

In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining.

Theriogenology 52 (4), 617–628

Hammadeh, M. E.; Stieber, M.; Haidl, G.; Schmidt, W. (1998):

Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program

Andrologia 30 (1), 29–35

Hammadeh, M. E.; Hamad, M. F.; Montenarh, M.; Fischer-Hammadeh, C. (2010):

Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers.

Human Reproduction 25 (11), 2708–2720

Hecht, N.; Behr, R.; Hild, A.; Bergmann, M.; Weidner, W.; Steger, K. (2009):

The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model for histone and protamine expression during human spermatogenesis.

Human Reproduction (Oxford, England) 24 (3), 536–545

Henning, H.; Masal, C.; Herr, A.; Wolf, K.; Urhausen, C.; Beineke, A.; Beyerbach, M.; Kramer, S.; Günzel-Apel, A.-R. (2014):

Effect of short-term scrotal hyperthermia on spermatological parameters, testicular blood flow and gonadal tissue in dogs.

Reproduction in Domestic Animals 49 (1), 145–157

Herr, A. (2010):

Effekte skrotaler Hyperthermie auf die Perfusion sowie auf histologische und immunhistochemische Merkmale des caninen Hodens und Nebenhodens.

Tierärztliche Hochschule, Dissertation, 2010, Hannover

Hewitt, D. A.; England, G. C. (1998):

An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique.

Animal Reproduction Science 51 (4), 321–332

Hingst, O.; Blottner, S.; Franz, C. (1995):

Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining.

Andrologia 27 (5), 275–279

Hoffmann, B. (2003):

Samengewinnung und Samenbeurteilung

In: Hoffmann B. (Hrsg.): Andrologie. Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung ; Lehmanns Media, 17, 27

Idziorek, T.; Estaquier, J.; Bels, F. de; Ameisen, J. C. (1995):

YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability.

Journal of Immunological Methods 185 (2), 249–258

Iguer-Ouada, M.; Verstegen, J. P. (2001):

Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis.

Theriogenology 55 (3), 733–749

Iranpour, F. G.; Nasr-Esfahani, M. H.; Valojerdi, M. R.; al-Taraihi, T. M. (2000):

Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility.

Journal of Assisted Reproduction and Genetics 17 (1), 60–66

Kawakami, E.; Vandervoort, C. A.; Mahi-Brown, C. A.; Tollner, T. L.; Overstreet, J. W. (1993):

Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reactions of dog sperm.

The Journal of Experimental Zoology 265 (5), 599–603

Kazerooni, T.; Asadi, N.; Jadid, L.; Kazerooni, M.; Ghanadi, A.; Ghaffarpasand, F. ; Zolghadr , J. (2009):

Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion.

Journal of Assisted Reproduction and Genetics 26 (11-12), 591–596

Khalifa, T.A.A.; Rekkas, C. A.; Lymberopoulos, A. G.; Sioga, A.; Dimitriadis, I.; Papanikolaou, T. (2008):

Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa.

Animal Reproduction Science 104 (2-4), 143–163

Kim, S.-H.; Yu, D.-H.; Kim, Y.-J. (2010):

Effects of cryopreservation on phosphatidylserine translocation, intracellular hydrogen peroxide, and DNA integrity in canine sperm.

Theriogenology 73 (3), 282–292

Kim, H.-S.; Kang, Moon J.; Kim, S. A.; Oh, S. K.; Kim, H.; Ku, S.-Y. et al. (2013):

The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis.

Clinical and Experimental Reproductive Medicine 40 (1), 23–28

Klaus, D. (2012):

Evaluierung verschiedener Verdüner zur Flüssigkeitskonservierung von caninem Sperma

Justus-Liebig Universität., Dissertation, 2012, Gießen

Kosower, N. S.; Katayose, H.; Yanagimachi, R. (1992):

Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei.

Journal of Andrology 13 (4), 342–348

Kretzer, Katja (2011):

Stadienspezifische mRNA-Expression der Kernproteine Protamin und Transitionsprotein im Verlauf der Spermatogenese beim Hengst.

Justus-Liebig Universität, Dissertation, 2011, Gießen

Kruger, T. F.; Ackerman, S. B.; Simmons, K. F.; Swanson, R. J.; Brugo, S. S.; Acosta, A. A. (1987):

A quick, reliable staining technique for human sperm morphology.

Archives of Andrology 18 (3), 275–277

Krzanowska, H. (1982):

Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova.

Journal of Reproduction and Fertility 64 (1), 97–101

Lange-Consiglio, A.; Antonucci, N.; Manes, S.; Corradetti, B.; Cremonesi, F.; Bizzaro, D. (2010):

Morphometric characteristics and chromatin integrity of spermatozoa in three Italian dog breeds.

Journal of Small Animal Practice 51 (12), 624–627

Lasley, J. F.; Easley, G. T.; McKenzie, F. F. (1942):

A staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. I. Applicability to the staining of ram spermatozoa.

The Anatomical Record 82 (2), 167–174

Lee, C. H.; Cho, Y. H. (1999):

Aspects of mammalian spermatogenesis: electrophoretical analysis of protamines in mammalian species.

Molecules and Cells 9 (5), 556–559

Löhmer, I. (2003):

Stabilität der Chromatinstruktur von Bullenspermien in Beziehung zu der konventionellen Spermatologie, der Bindungsfähigkeit im Ovidukt-Explant-Assay und der Fruchtbarkeit in vitro

Tierärztliche Hochschule, Dissertation 2003, Hannover

Loir, M.; Lanneau, M. (1978):

Partial characterization of ram spermatidal basic nuclear proteins.

Biochemical and Biophysical Research Communications 80 (4), 975–982

Lopes, S.; Sun, J. G.; Jurisicova, A.; Meriano, J.; Casper, R. F. (1998):

Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection.

Fertility and Sterility 69 (3), 528–532

Manochantr, S.; Chiamchanya, C.; Sobhon, P. (2012):

Relationship between chromatin condensation, DNA integrity and quality of ejaculated spermatozoa from infertile men.

Andrologia 44 (3), 187–199

Martínez, A I Peña (2004):

Canine fresh and cryopreserved semen evaluation.

Animal Reproduction Science 82-83, 209–224

Martins, C. F.; Dode, M. N.; Bão, S. N.; Rumpf, R. (2007):

The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA.

Genetics and molecular research 6 (1), 94–104

Masal, C. (2010):

Auswirkungen skrotaler Hyperthermie auf quantitative und qualitative Spermaparameter des Rüden unter besonderer Berücksichtigung der Integrität der Plasmamembran und des Akrosoms sowie des Spermienchromatins.

Tierärztliche Hochschule, Dissertation, 2010, Hannover

Mello, M. L. (1982):

Induced metachromasia in bull spermatozoa.

Histochemistry 74 (3), 387–392

Meurer, D. G.; Wolf, S. (Hrsg.) (2007):

Allgemeine Pathologie. Kompendium für die Veterinärmedizin

Stuttgart , Schattauer. 2.Auflage, 4, 46-48

Mickelsen, W. D.; Memon, M. A.; Anderson, P. B.; Freeman, D. A. (1993):

The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch.

Theriogenology 39 (2), 553–560

Miss, N. (2012):

Untersuchungen zur Optimierung der Kryokonservierung caniner Spermien unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Verdüner

Justus-Liebig Universität, Dissertation, 2012, Gießen

Monesi, V. (1964):

Autoradiographic evidence of a nuclear histone synthesis during mouse spermiogenesis in the absence of detectable quantities of nuclear ribonucleic acid.

Experimental Cell Research 36 (3), 683–688

Mota, P. C.; Ramalho-Santos, J. (2006):

Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quik as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. *Theriogenology* 65 (7), 1360–1375

Muñoz, P.; Ferrusola, C.O.; Vizuete, G.; Dávila, M. P.; Martínez, H. R.; Peña, F. J. (2015):

Depletion of Intracellular Thiols and Increased Production of 4-Hydroxynonenal that Occur During Cryopreservation of Stallion Spermatozoa Lead to Caspase Activation, Loss of Motility, and Cell Death.

Biology of Reproduction 93 (6), 143

Nieschlag, E. (Hrsg.) (2012):

WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung und Aufarbeitung des menschlichen Ejakulates.

World Health Organization. Berlin: Springer 5. Auflage 2012, 2-4, 57-137

Niżański, W.; Partyka, A.; Rijsselaere, T. (2012):

Use of Fluorescent Stainings and Flow Cytometry for Canine Semen Assessment.

Reproduction in Domestic Animals 47, 215–221

Núñez-Martínez, I.; Moran, J. M.; Peña, F. J. (2007):

Sperm indexes obtained using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm.

International Journal of Andrology 30 (3), 182–189

Oettlé, E. E. (1993):

Sperm morphology and fertility in the dog.

Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 47, 257–260

Papanicolaou, G. N. (1942):

A new procedure for staining vaginal smears

Science 95 (2469), 438–439

Paradowska-Dogan, A.; Fernandez, A.; Bergmann, M.; Kretzer, K.; Mallidis, C.; Vieweg, M.; Waliszewski, P.; Zitzmann, M.; Weidner, W.; Steger, K.; Kliesch, S. (2014):

Protamine mRNA ratio in stallion spermatozoa correlates with mare fecundity. Andrology 2 (4), 521–530

Peña, A.; Johannisson, A.; Linde-Forsberg, C. (1999):

Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry.

Theriogenology 52 (6), 965–980

Peña, F. J.; Saravia, F.; Johannisson, A.; Walgren, M.; Rodríguez-Martínez, H. (2005):

A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa.

International Journal of Andrology 28 (2), 107–114

Penfold, L. M.; Jost, L.; Evenson, D. P.; Wildt, D. E. (2003):

Normospermic versus teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection.

Biology of Reproduction 69 (5), 1730–1735

Peres, M. A.; da Rocha, A M; Vannucchi, C. I.; Mendes, C. M.; Cavalcanti, P. V.; Nichi, M.; Ambrosio C.E.; Miglino M. A.; Visintin J.A.; D'Ávila Assumpção, M. E. O. (2014):

Semen analysis of Golden Retriever healthy dogs and those affected by muscular dystrophy.

Andrologia 46 (3), 277–282

Prinosilova P.; Rybar R.; Zajicova A.; Hlavicova J. (2012):

DNA integrity in fresh, chilled and frozen-thawed canine spermatozoa.

Veterinární Medicína (3), 133–142

.

Rathi, R.; Colenbrander, B.; Bevers, M. M.; Gadella, B. M. (2001):

Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa.

Biology of Reproduction 65 (2), 462–470

Riesenbeck, A.; Völger, D.; Hoffmann, B. (2001)

Praxisnahe Bestimmung von Vitalitätsparametern zur Beurteilung von

Rüdensperma.

Tierärztliche Praxis 29, 116-120

Rigler, R.; Killander, D.; Bolund, L.; Ringertz, N. R. (1969):

Cytochemical characterization of deoxyribonucleoprotein in individual cell nuclei. Techniques for obtaining heat denaturation curves with the aid of acridine orange microfluorimetry and ultraviolet microspectrophotometry.

Experimental Cell Research 55 (2), 215–224

Rijsselaere, T.; van Soom, A.; Tanghe, S.; Coryn, M.; Maes, D.; Kruif, A. de (2005):
New techniques for the assessment of canine semen quality: A review.

Theriogenology 64 (3), 706–719

Rijsselaere, T.; Maes, D.; Hoflack, G.; Kruif, A. de; van Soom, A. (2007):

Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne analyser.

Reproduction in Domestic Animals 42 (2), 143–148

Rota, A.; Rota, A.; Martini, M.; Milani, C.; Romagnoli, S. (2005):

Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing.

Reproduction, Nutrition, Development 45 (1), 29–37

Rodriguez, H.; Ohanian, C.; Bustos-Obregon, E. (1985):

Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen.

International Journal of Andrology 8 (2), 147–158

Sabnis, R. W. (Hrsg.) (2010):

Handbook of biological dyes and stains. Synthesis and industrial applications. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell 24, 252, 259

Said, T. M.; Paasch, U.; Glander, H.-J.; Agarwal, A. (2004):

Role of caspases in male infertility.

Human Reproduction Update 10 (1), 39–51

Sánchez, R.; Risopatrón, J.; Schulz, M.; Villegas, J.; Isachenko, V.; Kreinberg, R.; Isachenko, E. (2011):

Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function.

Andrologia 43 (4), 233–241

Shaffer, H. E.; Almquist J. O. (1948):

Vital Staining of Bovine Spermatozoa with an Eosin-aniline Blue Staining Mixture.

Abstracts of Papers Presented at the Forty–Third Annual Meeting.

Journal of Dairy Science 31 (8), 657–729

Shivahre, P. R.; Gupta, A. K.; Panmei, A.; Yadav, B. R.; Bhakat, M.; Mohanty, T. K.; Kumaresan, A.; Kumar, V.; Dash, S. K.; Singh, K. (2015):

Relationship of conventional and fluorescent microscopic technique to assess in vitro semen quality status of Murrah buffalo males.

Iranian Journal of Veterinary Research 16 (4), 363–367

Simões, R.; Feitosa, W. B.; Mendes, C. M.; Marques, M. G.; Nicacio, A. C.; Barros, F. R.O. de; Visintin, J. A.; Assumpção, M. (2009):

Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency.

Biotechnic & Histochemistry 84 (3), 79–83

Sirivaidyapong, S.; Cheng, F. P.; Marks, A.; Voorhout, W. F.; Bevers, M. M.; Colenbrander, B. (2000):

Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm.

Theriogenology 53 (3), 789–802

Slavik, M.; Carter, S. K. (1975):

Chromomycin A3, mithramycin, and olivomycin: antitumor antibiotics of related structure.

Advances in Pharmacology and Chemotherapy 12 (0), 1–30

Sokolowska, A.; García, B. Macías; Fernández, L. González; Ortega-Ferrusola, C.; Tapia, J. A.; Peña, F. J. (2009):

Activated caspases are present in frozen-thawed canine sperm and may be related to post thaw sperm quality.

Zygote 17 (4), 297–305.

Steckler, D.; Stout, T.A.E.; Durandt, C.; Nöthling, J. O. (2015):

Validation of merocyanine 540 staining as a technique for assessing capacitation-related membrane destabilization of fresh dog sperm.

Theriogenology 83 (9), 1451–1460

Steger, K.; Slavov, M.; Failing, K.; Weidner, W.; Bergmann, M. (2005):

Effect of vasectomy on sperm nuclear chromatin condensation in the rabbit.

Journal of Andrology 26 (2), 289–295

Strotmann, A. (2009):

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

Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation 2009, Hannover.

Strzezek, R.; Fraser, L. (2009):

Characteristics of spermatozoa of whole ejaculate and sperm-rich fraction of dog semen following exposure to media varying in osmolality.

Reproductive Biology 9 (2), 113–126

Talbot, P.; Chacon, R. S. (1981):

A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. The Journal of Experimental Zoology 215 (2), 201–208

Tejada, R. I.; Mitchell, J. C.; Norman, A.; Marik, J. J.; Friedman, S. (1984):

A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence.

Fertility and Sterility 42 (1), 87–91

Terquem, A.; Dadoune, J. P. (1983):

Aniline Blue Staining of Human Spermatozoon Chromatin. Evaluation of Nuclear Maturation.

The Sperm Cell, Springer Verlag 249-252

Thießen, H. (2006):

Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Spermienchromatinstruktur beim Hengst

Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation 2006, Hannover

Thomas, L. E.; Mayer, D. T. (1949):

The Proteins of Mammalian Spermatozoa and Cellular Nuclei.

Science 110 (2859), 393–394

Varesi, S.; Vernocchi, V.; Morselli, M. G.; Luvoni, G. C. (2014):

DNA integrity of fresh and frozen canine epididymal spermatozoa.

Reproductive Biology 14 (4), 257–261

Villani, P.; Eleuteri, P.; Grollino, M. G.; Rescia, M.; Altavista, P.; Spano, M. et al. (2010):

Sperm DNA fragmentation induced by DNase I and hydrogen peroxide: an in vitro comparative study among different mammalian species.

Reproduction 140 (3), 445–452

Vieytes, A. L.; Cisale, H. O.; Ferrari, M. R. (2008):

Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility.

The Veterinary Record 163 (21), 625–629

Volpe, S.; Leoci, R.; Aiudi, G.; Lacalandra, G. M. (2009):

Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa.

Reproduction in Domestic Animals 44 Suppl. 2, 275–278

Wales, R. G. (1959):

The differential staining of human and dog spermatozoa.

Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science 37 (5), 433–439

Ward, D. C.; Reich, E.; Goldberg, I. H. (1965):

Base specificity in the interaction of polynucleotides with antibiotic drugs.

Science 149 (3689), 1259–1263

Warntjen, N. (2012):

DNA-Strangbrüche in männlichen Keimzellen der Maus.

146

Universität Göttingen, Dissertation, 2012, Göttingen

Watanabe, S.; Tanaka, A.; Fujii, S.; Mizunuma, H.; Fukui, A.; Fukuhara, R.; Nakamura, R.; Yamada, K.; Tanaka, I.; Awata, S.; Nagayoshi, M. (2011):

An investigation of the potential effect of vacuoles in human sperm on DNA damage using a chromosome assay and the TUNEL assay.

Human Reproduction 26 (5), 978–986

Wehrend, A.; Bostedt, H. (2013)

Genitaltrakt – Untersuchungsmethoden bei männlichen Kleintieren

Moritz, A. (Hrsg.) Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, Schattauer 7. Auflage, 498-511

Williamson, P.; Mattocks, K.; Schlegel, R. A. (1983):

Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing.

Biochimica et biophysica acta 732 (2), 387–393

Zandemami, M.; Qujeq, D.; Akhondi, M. M.; Kamali, K.; Raygani, M.; Lakpour, N.; Shiraz, E. S.; Sadeghi, M. R. N. (2012):

Correlation of CMA3 Staining with Sperm Quality and Protamine Deficiency.

Laboratory Medicine 43 (6), 262–267

Zee, Y. P. López-Fernández, C.; Arroyo, F.; Johnston, S. D.; Holt, W. V.; Gosalvez, J. (2009):

Evidence that single-stranded DNA breaks are a normal feature of koala sperm chromatin, while double-stranded DNA breaks are indicative of DNA damage.

Reproduction 138 (2), 267–278

9 Anhang

Tabelle 17: Vergleich des Arbeits- und Zeitaufwandes der unterschiedlichen Untersuchungen zur Chromatinkondensation. Sek.: Sekunden; Min.: Minuten; OT: Objektträger; Lsg.: Lösung; ca.: circa; AK: Antikörper; AB: Anilinblau; TB: Tolidinblau; AOT: Akridinorangetest nach Tejada et al (1984); mfSCSA: modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatinstrukturassay nach Biege (2004)

Färbemethode	Vorbereitungszeit	Bearbeitungszeit / OT	Reine Inkubations- /Wartezeit	Reine Arbeitszeit	Zeit vom Start bis zur Auswertung (20 OT)
AB	Fixierung herstellen 5 Min.	OT in Fixierung setzen 3 Sek. OT aus Fixierung nehmen 3 Sek. OT in Färbung setzen 3 Sek. OT aus Färbung nehmen + waschen 12 Sek.	Fixierung 25 Min. Trocknen 10 Min. Färbung 7 Min. Trocknen 10 Min.	21 Sek./OT + 5 Min. Vor- bereitung + Wartezeit	12 Min. Arbeits- zeit + 52 Min. Warte- zeit = Ca. 67 Min.
TB	Fixierung herstellen 3 Min. Puffer herstellen	OT in Fixierung setzen 3 Sek. OT aus	Fixierung 30 Min. Trocknen 10 Min. Hydrolyse	49 Sek./OT +	34 Min. Arbeits- zeit

	5 Min. Hydrolyse-lsg. herstellen 5 Min. Färbelsg. herstellen 3 Min.	Fixierung nehmen 3 Sek. OT in Hydrolyse-lsg. setzen 3 Sek. OT aus Hydrolyse-lsg. nehmen 3 Sek. OT in Färbung setzen 3 Sek. OT aus Färbung + waschen 10 Sek. Dehydrieren 2x2x3 Sek. Klären: 2x2x3 Sek. Eindecken 5 Sek.	5 Min. Trocknen: 10 Min. Färben 5 Min. Dehydrieren 2x3 Min. Klären 2x3 Min.	16 Min. Vorbereitung + Wartezeit	+ 72 Min. Wartezeit = ca. 106 Min.
CMA3	Fixierlsg. herstellen 3 Min. CMA3 Gebrauchs-lösung herstellen	OT in Fixierung setzen 3 Sek. OT aus Fixierung nehmen 3 Sek.	Fixieren 120 Min. Trocknen 10 Min. Färben 20 Min. Trocknen	21 Sek./OT + 8 Min. Vorbereitung	15 Min. Arbeitszeit + 160 Min. Wartezeit

	5 Min.	CMA3 auftragen 5 Sek. Waschen 5 Sek. Eindecken 5 Sek.	10 Min.	+ Wartezeit	zeit = 172 Min.
AO	Stamm- lösungen herstellen 10 Min. Fixierung herstellen 3 Min.	OT in Fixierung setzen 3 Sek. OT aus Fixierung nehmen 3 Sek. OT in Färbung setzen 3 Sek. OT aus Färbung + Waschen 5 Sek. Eindecken 5 Sek.	Fixieren 120 Min. Trocknen 10 Min. Färben 7 Min. Trocknen 10 Min.	19 Sek./OT + 13 Min. Vor- bereitung + Wartezeit	19 Min. Arbeits- zeit + 147 Min. Warte- zeit = 166 Min.
mf SCSA	Stamm- lösungen herstellen 10 min Fixierung herstellen 3 min Puffer herstellen 5 min	Dekonden- sationslg. auftragen 15 Sek. Dekonden- sationslg. entfernen 5 Sek. OT in Puffer setzen	Dekon- densieren 40 Min. Wasch- puffer 10 Min. Trocknen 10 Min. Fixieren	46 Sek./OT + 23 Min. Vor- bereitung +	38 Min. Arbeits- zeit + 216 Min. Warte- zeit

	Dekondensationslösger herstellen 5 min	3 Sek. OT aus Puffer nehmen 3 Sek. OT in Fixierung setzen 3 Sek. OT aus Fixierung nehmen 3 Sek. OT in Färbung setzen 3 Sek. OT aus Färbung + waschen 5 Sek. OT in Puffer setzen 3 Sek. OT aus Puffer nehmen 3 Sek.	120 Min. Abtropfen 2 Min. Färben 14 Min. Waschpuffer 10 Min. Trocknen 10 Min.	Wartezeit	= 254 Min.
TUN- EL	Permeabilisationslösger herstellen 5 Min. TUNEL-Mix herstellen	OT in Fixierung setzen Sek. OT aus Fixierung nehmen 3 Sek.		30 Sek./OT + 13 Min. Vorbereitung +Warte-	23 Min. Arbeitszeit + 130 Min.

	<p>3 Min.</p> <p>DAPI-Lsg. herstellen</p> <p>5 Min.</p>	<p>OT in Permeabilisationslsg. setzen 3 Sek.</p> <p>OT aus Permeabilisationslösung +Dippen</p> <p>6 Sek.</p> <p>TUNEL-Mix auftragen</p> <p>5 Sek.</p> <p>TUNEL-Mix abwaschen</p> <p>5 Sek.</p> <p>DAPI auftragen + Eindecken</p> <p>5 Sek.</p>	<p>Fixieren 120 Min.</p> <p>Permeabilisieren 10 Min.</p> <p>Inkubation über Nacht</p>	<p>zeit</p>	<p>Wartezeit 1.Tag</p> <p>+</p> <p>Nachtinkubation</p> <p>=</p> <p>153 Min.</p> <p>+</p> <p>Nachtinkubation</p>
Caspase	<p>(1 malig: AK verdünnen 2x 10 Min.)</p> <p>Tritonlsg. herstellen</p> <p>5 Min.</p>	<p>Fixierung auf OT auftragen</p> <p>5 Sek.</p> <p>OT in Waschpuffer</p>	<p>Fixierung über Nacht</p> <p>Waschen $3 \times 5 =$ 15 Min.</p> <p>1. Inkubation 90 Min.</p>	<p>56 Sek./OT</p> <p>+</p> <p>15 Min. Vorbereitung</p>	<p>34 Min. Arbeitszeit</p> <p>+</p> <p>225 Min.</p>

	Ver- dünnung herstellen 10 Min.	3 Sek. OT aus Wasch- puffer 3 Sek. OT in Wasch- puffer 3 Sek. OT aus Wasch- puffer 3 Sek. OT in Wasch- puffer setzen 3 Sek. OT aus Wasch- puffer nehmen 3 Sek. AK1 auftragen 5 Sek. OT in Wasch- puffer setzten 3 Sek. OT aus Wasch- puffer nehmen 3 Sek.	Waschen 3*10= 30 Min. 2. Inkubation 90 Min.	+ Wartezeit	Warte- zeit + Nacht- inkuba- tion = 295 Min. + Nacht- inkubati on
--	-----------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------	----------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

		<p>OT in Wasch- puffer setzen 3 Sek.</p> <p>OT aus Wasch- puffer nehmen 3 Sek.</p> <p>OT in Wasch- puffer setzen 3 Sek.</p> <p>OT aus Wasch- puffer nehmen 3 Sek.</p> <p>AK2 auftragen 5 Sek.</p> <p>AK2 entfernen 5 Sek.</p>			
--	--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--	--	--

Tabelle 18: Materialkosten der unterschiedlichen Untersuchungen zur Chromatinkondensation. AB: Anilinblau; TB: Toluidinblau; AOT: Akridinorangetest nach Tejada et al (1984); mfSCSA: modifizierter fluoreszenzmikroskopischer Spermienchromatinstrukturassay nach Biege (2004); €: Euro; Lsg.: Lösung; ml: Milliliter; g: Gramm; PBS: Phosphate buffered saline; BSA: Bovines Serumalbumin; DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; DNase: Desoxyribonuklease; FITC: Fluorescein isothiocyanate

Färbemethode	Verbrauchsmaterial pro Färbedurchgang mit 20 Objektträgern	Materialkosten pro Objektträger in €	Gesamtkosten pro Objektträger in €
AB	200 ml Fixierlösung	0,06	0,73
	200 ml 5 % Anilinblaulsg.	0,64	
	Eindeckmedium	0,03	
TB	200 ml Fixierlösung	0,48	1,71
	200 ml Lösung zur Hydrolyse	0,07	
	10 mg Toluidinblau	0,01	
	1,72 g Dinatriumhydrogenphosphat	0,01	
	2,92 g Zitronensäuremonohydrat	0,01	
	400 ml Butanol	0,6	
	400ml Xylol	0,5	
	Eindeckmedium	0,03	

CMA3	180 ml Fixierlösung	0,09	0,58
	0,5 mg Chromomycin A3	0,48	
	2 ml PBS	0,01	
AOT	200 ml Fixierlösung	0,09	0,12
	40 mg Akridinorange	0,01	
	3,36 g Zitronensäuremonohydrat	0,01	
	1,32 g Natriumhydrogenphosphat	0,01	
	Eindeckmedium	0,01	
mfSCSA	200 ml Fixierlösung	0,09	0,21
	40 mg Akridinorange	0,01	
	3,36 g Zitronensäuremonohydrat	0,01	
	1,32 g Natriumhydrogenphosphat	0,01	
	600 ml Natriumcitratpuffer	0,07	
	Dekondensationslösung	0,02	
Caspase	Antibody-Specific Active Caspase 3 Detection kit– Apo Active 3TM FITC	1,54	2,21
	7 ml Triton X-100	0,14	
	1500 ml PBS	0,50	
	80 mg BSA	0,02	
	20 µl Ziegenserum	0,01	

TUNEL	In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	5,64	5,82
	0,2 ml Triton X-100	0,01	
	0,025 mg DAPI	0,01	
	1000 U/ml DNase	0,16	

10 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. vet. Axel Wehrend, der offen für Ideen zum Anfertigen dieser Dissertation war und zu jeder Zeit mit großer Sorgfalt und enormem Engagement die Betreuung dieser Arbeit ernst genommen hat.

Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. vet. Dr. rer. nat. M.E. Hammadeh bedanken, der mir das Anfertigen der Dissertation in dieser Form möglich gemacht hat, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mir immer Mut für ein Gelingen gemacht hat.

Hierbei ist das Team des IVF-Labors der Frauenklinik des Universitätsklinikums des Saarlandes, insbesondere Frau Seyfried und alle derzeitigen Doktoranden zu nennen, die mir eine große Hilfe bei der Umsetzung der Methoden waren.

Dem Team der Klinik für Gynäkologie, Geburtshilfe und Andrologie der Klein- und Großtiere in Gießen gilt ebenfalls mein Dank, weil mir verlässlich und hilfsbereit die Probensammlung ermöglicht wurde.

Vielen Dank an Herrn Dr. Failing und Frau Sparenberg von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung für ihre Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse und die gute Zusammenarbeit.

Meinen Arbeitskollegen bin ich dankbar, dass sie geduldig auf meinen Einsatz verzichtet haben, damit diese Dissertation angefertigt werden konnte.

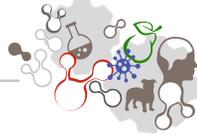
Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie, die immer für mich da ist. Insbesondere meinen Eltern, die mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht haben und ohne die ich heute keine Tierärztin wäre und meiner Schwester, die mir immer Selbstvertrauen gibt.

Ein unfassbar großes Dankeschön gilt meinem Mann Peter, der in jeder Lebenslage mein Anker ist, mich immer motiviert hat diesen Weg zu gehen und ohne dessen Zuspruch diese Arbeit niemals entstanden wäre.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Elisa-Marie Laux



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6587-4



9 783835 965874