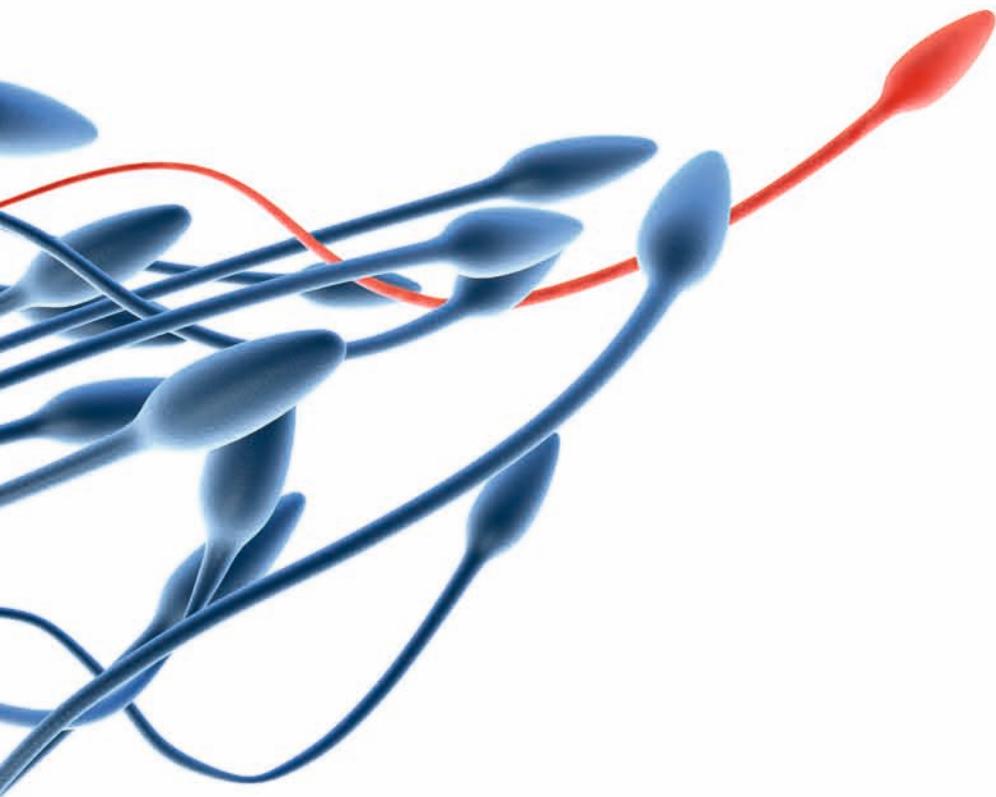


# ETABLIERUNG EINES SPERMIEN-PENETRATIONSTESTES FÜR EQUINES SPERMA

---

**Cerstin Blaß**



Inauguraldissertation 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 2014

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.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://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

# **ETABLIERUNG EINES SPERMIEN-PENETRATIONSTESTES FÜR EQUINES SPERMA**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Cerstin Blaß**

Tierärztin aus Wuppertal

Gießen 2014

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

---

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

Gutachter: Prof. Dr. Axel Wehrend  
Prof. Dr. Kerstin Fey

Tag der Disputation: 08.12.2014

**für Ma & Dad**

1	Einleitung .....	1
2	Literaturübersicht .....	2
2.1	Makroskopische Parameter des equinen Ejakulates .....	2
2.1.1	Volumen .....	2
2.1.2	Farbe .....	3
2.1.3	Geruch .....	3
2.1.4	Beimengungen.....	3
2.1.5	pH-Wert Bestimmung .....	4
2.2	Klassische mikroskopische Parameter des equinen Ejakulates .....	4
2.2.1	Spermiendichte.....	4
2.2.2	Spermienmotilität.....	4
2.2.3	Pathomorphologie.....	6
2.2.4	Lebend-Tod-Färbung.....	6
2.3	Funktionelle Parameter des equinen Ejakulates.....	8
2.3.1	Penetration des zervikalen Mukus .....	8
2.3.2	Hamster-Oozyten-Penetrationstest.....	14
2.3.3	Akrosomale Reaktion (AR) .....	15
2.3.4	Mitochondrien-Funktionstest.....	16
2.3.5	Swim-up.....	18
2.3.6	Sperma-Chromatin-Struktur-Test.....	18
2.3.7	Glass wool/ sephadex Filtration .....	19
2.3.8	Computer-unterstützte Spermiumkopf-Morphometrie.....	20
2.3.9	Überlebenstests (Persistenz der Motilität) .....	21
2.3.10	Biochemische Parameter.....	22
3	Material und Methoden .....	24
3.1	Polyacrylamid-Gele.....	24
3.1.1	Herstellung der Pufferlösungen .....	24
3.1.1.1	TRIS-Puffer-Lösung.....	24
3.1.1.1.1	T18 .....	24
3.1.1.1.2	T23 .....	24
3.1.1.2	PBS-Puffer.....	25
3.1.2	Herstellung der Polyacrylamid-Gele .....	25
3.1.2.1	2%iges Polyacrylamid-Gel.....	25
3.1.2.2	1,9%iges Polyacrylamid-Gel.....	26
3.1.2.3	1,8%iges Polyacrylamid-Gel ohne Fruktose .....	26
3.1.2.4	1,8%iges Polyacrylamid-Gel mit Fruktose .....	27
3.1.2.5	1,5%iges Polyacrylamid-Gel mit Fruktose .....	27
3.1.3	Herstellung der phosphatgepufferten Salzlösung zur Dialyse.....	28

3.2	Penetrationsversuche .....	29
3.2.1	Hengste .....	29
3.2.2	Vorbereitung des Spermas .....	29
3.2.3	Auswahlverfahren der Kapillaren .....	30
3.2.4	Durchführung .....	30
3.2.5	Auswertung .....	32
3.2.6	Bestimmung der Parameter der klassischen Samenanalyse .....	33
3.2.6.1	Ermittlung des Prozentanteils lebender Spermien .....	33
3.2.6.2	Computergestützte Spermaanlyse .....	33
3.3	Statistische Auswertung .....	36
4	Ergebnisse .....	38
4.1	Vorversuche .....	38
4.1.1	Auswahlverfahren des Gels .....	38
4.1.1.1	Reproduzierbarkeit der Gele .....	38
4.1.1.2	Eignung der Gele .....	39
4.1.1.3	Zusammenfassung der Komplikationen bei der Herstellung der Gele .....	40
4.1.1.4	Einfluss der Fruktose im Medium auf die Penetrationsstrecke .....	40
4.1.2	Auswahl der Pipetten / Kapillaren .....	42
4.1.3	Festlegung der Gefrierzeit/ Abbruch des Penetrationsversuchs .....	43
4.2	Hauptversuche .....	44
4.2.1	Bestimmung der Streuungsursachen der Penetrationsstrecke .....	44
4.2.2	Penetrationsstrecken .....	45
4.2.3	Regressionsanalyse .....	46
4.2.3.1	Penetrationsstrecke versus Dichte .....	46
4.2.3.2	Penetrationsstrecke versus Motilität .....	49
4.2.3.3	Penetrationsstrecke versus Vorwärtsbeweglichkeit .....	51
4.2.3.4	Penetrationsstrecke versus Anteil lebende Spermien .....	53
4.2.4	Gesamteinfluss der Parameter der klassischen Samenanalyse auf die Penetrationsstrecke .....	55
4.2.5	Korrelationsanalyse .....	55
4.2.5.1	Dichte versus Motilität .....	56
4.2.5.2	Dichte versus Vorwärtsbeweglichkeit .....	57
4.2.5.3	Dichte versus Anteil lebende Spermien .....	58
4.2.5.4	Motilität versus Vorwärtsbeweglichkeit .....	59
4.2.5.5	Motilität versus Anteil lebende Spermien .....	60
4.2.5.6	Vorwärtsbeweglichkeit versus Anteil lebende Spermien .....	61
5	Diskussion .....	62
5.1	Diskussion der Fragestellung .....	62

5.1.1	Einsatz der klassischen Untersuchungsmethoden für equines Ejakulat..	63
5.1.2	Auswahl des geeigneten Mediums .....	64
5.1.3	Auswahl der geeigneten Kapillaren .....	66
5.1.4	Auswahl der geeigneten Versuchsbedingungen/ Versuchsaufbau .....	67
5.2	Diskussion der Ergebnisse .....	70
5.3	Abschließende Bemerkungen/ Empfehlungen zur Durchführung eines Mucus-Penetrationstests .....	74
6	Zusammenfassung .....	76
7	Summary .....	78
8	Anhang .....	80
9	Literaturverzeichnis.....	82

## **1 Einleitung**

Die Besamung hat in der Pferdezucht große Bedeutung. Aus diesem Grund ist die Gewinnung und die Beurteilung von equinem Ejakulat fester Bestandteil der veterinärmedizinischen Tätigkeit. Zur Beurteilung von equinem Ejakulat existieren verschiedene, standardisierte Testverfahren. Dazu gehören die Bestimmung der Anzahl der Spermien, ihrer Motilität und Morphologie.

Obwohl in der Literatur bereits einige Verfahren beschrieben sind, funktionelle Spermienparameter mittels labordiagnostischer Tests zu erfassen, hat bislang keine Methode Einzug in den Routineablauf der spermatologischen Untersuchung erhalten. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen funktionellen Spermientest zu entwickeln, der technisch nicht aufwendig und preiswert durchzuführen ist. Hierbei wurde das Augenmerk ausschließlich auf den Parameter der Penetrationsfähigkeit gerichtet.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Makroskopische Parameter des equinen Ejakulates**

Am Anfang der Samenbeurteilung steht die makroskopische Untersuchung. In dieser grobsinnlichen Prüfung wird die Beschaffenheit des Ejakulats hinsichtlich Volumen, Aussehen, Farbe, Konsistenz und Geruch sowie etwaiger Beimengungen erfasst (WEITZE, 2001).

Um eine optimale Untersuchung gewährleisten zu können, ist es erforderlich, die schleimige Phase des Ejakulates unverzüglich vom übrigen Samen zu trennen. Der Schleimanteil kann im Laufe der Decksaison zunehmen. Es ist möglich, ihn direkt während der Samengewinnung abzufiltern oder durch eine fraktionierte Samengewinnung separiert vom eigentlichen Ejakulat aufzufangen. Diese Vorgehensweisen haben sich jedoch als unzuverlässig erwiesen, sodass sich die Methode des Abkippens durchgesetzt hat. Die verbleibende, weitgehend schleimfreie Samenflüssigkeit kann so beurteilt werden (KLUG, 1993).

#### **2.1.1 Volumen**

Das Ejakulatvolumen wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Zunächst ist zu berücksichtigen, dass der Hengst als Uterusbesamer über ein bedeutend größeres Volumen verfügt als die Scheidenbesamer. Des Weiteren spielt das Alter des Tieres eine Rolle. Auch Faktoren wie Rasse, Fütterung und Krankheiten wirken sich auf das Ejakulatvolumen aus. Darüber hinaus ist die sexuelle Beanspruchung des Hengstes in die Beurteilung mit einzubeziehen, denn sowohl die Häufigkeit des Absamens sowie die Absametechniken als auch die Dauer des Koitus selbst kann zu erheblichen Unterschieden führen (HOFFMANN, 2003).

Die wesentlichen physiologischen Parameter von equinem Ejakulat sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Physiologische Werte ausgewählter Parameter des equinen Ejakulates

Literatur	Volumen (ml)	Dichte ( $10^6/ml$ )	Motilität	pH
VAN DER HOLST (1975)	150	keine Angabe	60	keine Angabe
JASKO et al. (1990)	59 +/-14,5	173 +/-114	8,9 +/-4,6	keine Angabe
PARLEVLIE et al. (1994)	65 +/-26	206 +/-168	68 +/-9	7,5
WABERSKI und SIEME (2009)	40	100	50	6,8 – 7,2

### 2.1.2 Farbe

Die Ejakulatfarbe ist beim Hengst typischer Weise grau-weiß bis weiß. Weicht die Farbe ab, ist dies ein Hinweis auf Beimengungen, die ihren Ursprung in der Fütterung, zum Beispiel durch einen hohen Anteil an Riboflavin, aber auch in pathologischen Prozessen haben können (WEITZE, 2001).

### 2.1.3 Geruch

Das unter hygienisch einwandfreien Bedingungen gewonnene Sperma ist geruchsneutral. Allenfalls ist ein „geschlechtsspezifischer“ Geruch wahrnehmbar (HOFFMANN, 2003).

### 2.1.4 Beimengungen

Makroskopisch sichtbare Beimengungen sind in der Regel ein Hinweis auf eine mangelnde Hygiene bei der Samengewinnung (WEITZE, 2001). Diese sekundär in das Ejakulat gelangten Schmutzpartikel sind meist eindeutig als solche zu identifizieren. In der Regel handelt es sich dabei um Kotpartikel oder Haare.

### **2.1.5 pH-Wert Bestimmung**

Zur Routineuntersuchung von Samenflüssigkeit zählt die Messung des pH-Wertes. Dieser wird im Schnelltestverfahren mit Hilfe eines Indikatorpapierstreifens oder für ein sehr genaues Ergebnis mit einem elektrischen pH-Meter bestimmt. Der Wert liegt im equinen Sperma im Normalfall bei 7 (KLUG, 1993). Abweichungen geben Hinweise auf Veränderungen des Seminalplasmas, der Sekrete des Nebenhodens oder der akzessorischen Geschlechtsdrüsen (MANN UND LUTWAK-MANN, 1981).

## **2.2 Klassische mikroskopische Parameter des equinen Ejakulates**

Die mikroskopische Untersuchung schließt sich der makroskopischen an. Sie wird für die Charakterisierung der Gesamtheit der Samenzellen und der einzelnen Spermien herangezogen. Untersucht werden dabei die Spermiendichte mittels Zählkammer, die qualitative und quantitative Beweglichkeit der Spermien, pathomorphologische Veränderungen sowie die Anzahl lebender Samenzellen. Des Weiteren gelten die Lebensdauer bei Belastung, die Agglutination und die Erfassung mikroskopischer Beimengungen als wichtige Parameter (KLUG, 1993; KLUG und SIEME, 2003a; WEITZE, 2001).

### **2.2.1 Spermiendichte**

Zur Bestimmung der Spermiendichte hat sich das Zählverfahren in einer mikroskopischen Zählkammer (Neubauer Zählkammer) bewährt und findet in der Praxis häufig Verwendung. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, dass eine definierte Menge des Samens in eine Fixationslösung verbracht wird, sodass ein Verhältnis von 1:100 entsteht. In der Regel wird 0,1 ml Samen untersucht (KLUG und SIEME, 2003b).

### **2.2.2 Spermienmotilität**

Die Bestimmung der Motilität ist ein fester Bestandteil der mikroskopischen Ejakulatuntersuchung.

Da die Motilität, von den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen initiiert, durch Stoffwechselforgänge, zu denen die Glykolyse und die Respiration gehören,

aufrecht erhalten wird, ist es empfehlenswert, die Beurteilung an den Anfang der Untersuchung zu stellen. Voraussetzungen sind hierbei isothermische Bedingungen, die mittels einer konstanten Wärmequelle geschaffen und aufrecht erhalten werden. Unter einem Phasenkontrastmikroskop mit Heiztisch (37 °C) wird die Einzelbewegung bei einer 100 bis 200fachen Vergrößerung beurteilt. Ein vorgewärmter Objektträger wird nun mit einem etwa senfkorngroßen Tropfen Samen versehen und anschließend mit einem Deckglas abgedeckt (WABERSKI und SIEME, 2009).

Unter einer 200fachen Vergrößerung erfolgt die Bewertung der Motilität. Ist der Anteil der Spermien, die eine Vorwärtsbewegung zeigen, größer als der Anteil unbeweglicher Spermien, wird beurteilt, wie sich die zwei Drittel Mehrheit bewegt. Ist diese Mehrheit vorwärtsbeweglich, ist anzunehmen, dass 70% eine Vorwärtsbewegung zeigen. Damit wären die Mindestanforderungen erfüllt. Anschließend sind die ortsbeweglichen Spermien zu beurteilen und ihr Prozentsatz zu bestimmen. Aus diesen Werten lässt sich der Anteil unbeweglicher Samenzellen errechnen (WEITZE, 2001).

Als Alternative zur subjektiven Untersuchung kann die objektive Messung der Spermienmotilität mittels computergesteuerter Videomikrografie (CASA, computer-assisted semen motility analysis) (QUINTERO-MORENO et al., 2003) vorgenommen werden. Dieses Instrument ermöglicht es, neben der Anzahl beweglicher Samenzellen auch den Anteil der ortsbeweglichen Spermien zu erfassen. Darüber hinaus können auch sich nicht-linear bewegende und linearmotile Zellen unterschieden und erfasst werden. Die Klassifizierung erfolgt unter Einbeziehung der vorwärts-, kurvilinearen und der mittleren Bahngeschwindigkeit, aus deren Werten sich die Einzelbahnanalysen zusammensetzen.

Um Hengste auszuwählen, deren Samen zum Versand geeignet ist, wird die Beurteilung der Motilität von flüssigkonservierten Sperma nach einer Lagerung von 24 Stunden und 48 Stunden bei 4 °C vorgenommen (VIDAMENT et al., 1998). Der Einsatz des Systems ist in zahlreichen Studien zu finden. Beispielsweise untersuchten PAGL und Mitarbeiter (2006) mit Hilfe dieses Programms verschiedene Verdüner für Hengstsperma. SCHÄFER-SOMI und AURICH (2007) verwendeten das CASA-System in ihrer Studie an Rüdensperma.

PRICE et al. (2008) setzten das System in ihrer Studie zur Erforschung der Effekte von Gentamycin und Sauerstoff auf Samenzellen vom Hengst ein.

### **2.2.3 Pathomorphologie**

In der mikroskopischen Ejakulatuntersuchung nimmt die Erfassung des Anteils an pathologisch veränderten Spermien eine zentrale Rolle ein. Ein System der Klassifizierung prägen LEIDL et al. (1971). Demnach werden die Anomalien beschreibend unterteilt. Die Kopfveränderungen werden zusammenfassend aufgeführt. Die Anomalien des Akrosoms bilden eine weitere Gruppe. Des Weiteren werden pathomorphologische Schwänze, wie Doppelschwanz, Lockenschwanz, leichte Biegung oder Mittelstückbrüche zusammen gefasst. Darüber hinaus werden noch zusätzlich zwei Formen der Agglutination beschrieben. Allgemein werden 20% an morphologisch veränderten Spermien im Hengstsperma akzeptiert, wobei davon lediglich 5% Kopfanomalien und maximal 10% Kopfkappenveränderungen auftreten dürfen (WEITZE, 2001).

Eine sich für Hengstejakulat bewährte Methode, um pathologisch veränderte Samenzellen darzustellen, ist die Spermac®-Färbung (SCHROP, 1992; HENRIC-PETRI, 1993; RUNCAN et al., 2013). Ursprünglich für den Einsatz in der Humanmedizin entwickelt, ermöglicht sie die Erfassung von equinen Samenzellen, die mit der Flüssigfixation (modifiziert nach Hancock) nicht ausreichend beurteilt werden können. Die Spermac®-Färbung beinhaltet eine Fixierlösung und drei bereits gemischte Farblösungen. Diese stellen die einzelnen funktionellen Bestandteile der Samenzelle durch verschiedene Anfärbungen dar. Der Kern färbt sich rot. Das Akrosom und die Geißel zeigen sich grün. Das Äquatoralsegment ist durch einen blassen Grünton zu erkennen (HOFFMANN, 2003).

### **2.2.4 Lebend-Tod-Färbung**

Um einen Überblick über die Anzahl lebender Spermien zu erhalten, wird routinemäßig die Lebend/Tod-Färbung eingesetzt. Diese Untersuchung beruht auf der Bestimmung der Plasmamembranintegrität. Eine Anfärbbarkeit ist nur gewährleistet, wenn der zugesetzte Farbstoff in die Zelle eindringen kann. Dies setzt eine poröse, geschädigte Membran voraus (DOTT und FOSTER, 1972). Kontrovers wird jedoch auch die Möglichkeit diskutiert, dass der Farbstoff in alle Zellen

eindringen kann, aber die lebenden Zellen ihn durch aktiven Transport wieder heraus transportieren (PESCH, 2005).

Routinemäßig kommt bei der Bestimmung des Verhältnisses von lebenden und toten Spermien der Farbstoff Eosin zum Einsatz. Um eine solche Färbung durchzuführen ist es zunächst erforderlich, aus einer wässrigen, 3%igen Trinatriumzitraddihydratlösung eine 2%ige Farbstofflösung herzustellen (WEITZE, 2001).

Eine Alternative zur Eosin-Färbung stellen Fluoreszenzfarbstoffe im Einsatz der Lebend/Tod-Färbung dar (VEERAMACHANENI et al., 2006).

Sie ermöglicht neben der subjektiven mikroskopischen Auswertung auch eine objektive Analyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Hierfür stehen entweder eine kombinierte DNA-Färbung aus 6-Carbofluoreszeindiazetat/ Propidiumiodid (CFDA/PI) oder SYBR-14®/PI zur Verfügung.

Beim Einsatz von CFDA gelangt der Stoff in das Zellinnere. Hier wird er durch Esterasen zu 6-Carbofluoreszin umgewandelt. Während 6-Carbofluoreszeindiazetat nicht fluoresziert, stellt sich 6-Carbofluoreszin fluoreszierend-grün dar. Die Zugabe des Propidiumiodids bezweckt die Kontrafärbung. Nachdem es ins Innere der Zelle durch defekte Plasmamembranen gelangt ist, färbt es die DNS rot (HARRISON und VICKERS, 1990). Mit Hilfe dieser Methode ist nicht nur eine Aussage über den Anteil der lebenden Spermien zu treffen sondern darüber hinaus auch bezüglich des Zustandes einzelner Zellkompartimente wie dem Akrosom oder dem Spermienkopf möglich. Nach ALTHOUSE und HOPKINS (1995) ist die Methode der CFDA/PI-Färbung zur Ermittlung funktionsfähiger Spermien der Methode der Motilitätsbeurteilung vorzuziehen.

Die SYBR-14®/PI –Färbung wurde von GARNER et al. (1994) entwickelt und stellt eine schnelle und einfache Methode der Erfassung von lebenden Spermien in einer Probe dar. SYBR-14® ist membranpermeabel und färbt den Anteil der lebenden Spermien hellgrün. Es emittiert Licht nach optischer Anregung von 488 nm bei einem Emissionsmaximum von 516 nm. Auch bei dieser Methode obliegt die Kontrafärbung dem Propidiumiodid. Es sorgt für eine Rotfärbung der toten Population. Darüber hinaus wird noch eine moribunde Population beschrieben. Sie umfasst den Anteil der absterbenden Spermien, die sich zunächst grün färben, dieser grüne Farbstoff jedoch durch den roten ersetzt wird. Der PI-Farbstoff breitet sich von posterior bis anterior aus. Dieser Anteil wird ebenfalls zu der toten Population gezählt, da bereits

Defekte in der Membran der Zellen vorhanden sind (GARNER und JOHNSON, 1995).

In der Studie von LOVE et. al. (2003) kamen beide Fluoreszenzfarbstoffe als Färbemethoden zur Untersuchung der Spermienmotilität und der Lebensfähigkeit von equinem Ejakulat zum Einsatz. Sowohl mit CFDA/PI als auch mit SYBR-14®/PI konnten die untersuchten Parameter ausreichend dargestellt werden.

## **2.3 Funktionelle Parameter des equinen Ejakulates**

Die traditionelle spermatologische Diagnostik ist eine beschreibende Untersuchung, die sich auf die Auswertung und Berechnung unterschiedlicher Parameter des Ejakulats bezieht. Klassischer Weise wird die Spermienanzahl, ihre Motilität und ihre Morphologie bestimmt. Doch in vielen unabhängigen Studien zeigt sich deutlich, dass dieses Konzept fehlerhaft ist. Nicht die Anzahl der Spermien bestimmt ihre Fertilität sondern ihre funktionelle Kompetenz. Davon ausgehend ist es erstrebenswert jedes Element der Funktion eines Spermiums zu untersuchen. Im einzelnen ergibt sich das funktionelle Potential einer Samenzelle aus seiner Fähigkeit der Fortbewegung, der Penetration des zervikalen Mukus, der Kapazitation, der Bindung an die Zona pellucida, der Akrosomenreaktion und der Sperma-Oozyten-Fusion (AITKEN, 2006).

In dem Bestreben einen Test zu entwickeln, der alle Aspekte der zu erfüllenden Funktion eines Spermiums prüfen kann, wurden zahlreiche Ansätze entwickelt.

### **2.3.1 Penetration des zervikalen Mukus**

Die Fähigkeit eines Spermiums den zervikalen Mukus zu durchdringen steht im Zusammenhang mit seiner Motilität. Sie ergibt sich aus der Geradlinigkeit und Geschwindigkeit. Ein intakter Schwanz gilt als Voraussetzung und zählt für VIDAMENT et al. (2000) neben der Intaktheit des Akrosoms, der Plasmamembran, der Mitochondrien und des Chromatins zu den wichtigsten Kriterien einer fertilen Samenzelle. Die Korrelation zwischen der Motilität und der Fertilität bezeichnet MALMGREN (1997) als am höchsten und gibt somit der Untersuchung der Penetrationsfähigkeit noch mehr Bedeutung. Diese Korrelation bestätigen die humanmedizinischen Untersuchungen von AITKEN et al. (1986; 1985) und MORTIMER et al. (1986).

SHARARA et al. (1994) konnten eine Korrelation zwischen der Penetration von humanem und bovinem Mukus und der Fertilität in vitro feststellen.

Mit dem Wissen um seine Bedeutsamkeit ist es nicht verwunderlich, dass der erste in-vivo-Postkoitaltest (PCT) bereits 1866 von SIMS beschrieben wurde. Es galt die Interaktion zwischen Spermien und Zervikalmukus des Menschen zu beobachten und zu beurteilen. Dies erfolgte durch die Untersuchung eines Tropfens Zervikalmukus, der 12 Stunden nach Kohabitation entnommen wurde, auf das Vorhandensein von Spermien. Jedoch blieben Rückschlüsse der gewonnenen Ergebnisse aufgrund der fehlenden Standardisierung aus.

KURZROK und MILLER (1928) entwickelten einen Objektträgertest. Bei diesem Test wurde der auf dem Objektträger ausgestrichene Mukus einer Frau mit einem Tropfen Samen versehen. Anhand dieser Methode konnten Aussagen über die Interaktion getroffen werden. Dennoch erreichte dieser Test keine Standardisierung.

WILSON (1954) und RUMKE et al. (1974) entdeckten unabhängig voneinander Agglutinationen von Spermien in humanem Ejakulat. Sie kamen zu dem Schluss, dass die Ursache in der Anwesenheit von spermienagglutinierenden Antikörpern zu finden sei. RUMKE et al. (1974) sahen in ihren Ergebnissen einen Zusammenhang zwischen auftretender Agglutination und Infertilität beim Mann.

In seiner Untersuchung von Blutserum auf Spermienagglutinin stellte FJÄLLBRANT (1965; 1971) eine negative Korrelation zwischen der Penetrationstiefe und dem Agglutintiter sowie der Lebensdauer der Spermien im Mukus fest.

Dem widerspricht die Untersuchung von AHLGREN (1975). Er konnte beim Postkoitaltest deutliche Vorwärtsbeweglichkeiten im Zervikalmukus erkennen, obwohl der Spermienagglutintiter im Blut hoch war.

KREMER und JAGER (1976) entwickelten den Sperma-Zervikalmukus-Kontakt-Test (SCMC- sperm- cervical mucus contact test). Er dient der genaueren Untersuchung der Agglutinationen von Spermien im Zusammenhang mit Kontakt zum Zervikalmukus.

Hierbei wird ein mit einer kleineren Menge Sperma versetzter Tropfen Mukus auf einen Objektträger gegeben. Nach zehn Minuten wird die Probe bei 200facher Vergrößerung unter dem Mikroskop untersucht, wobei die Spermien gezählt bzw. geschätzt werden, die nicht am Zervikalmukus hängen. Diese Spermien weisen das

sogenannte „Schüttelphänomen“ auf. Diese Erscheinung lässt darauf schließen, dass sich im Mukus Antikörper gegen Spermatozoen befinden (KREMER et al., 1977).

Darüber hinaus weisen die Spermien selbst ebenfalls Antikörper auf, die an der Schwanzregion lokalisiert sind. Diese erlauben zwar eine Penetration in den Mukus hinein, sorgen aber bereits nach kurzer Zeit dafür, dass sich die Spermien nur noch am Ort bewegen können. Diese Interaktion zwischen Spermatozoen und Glycoprotein-Mycel des Mukus ist eine antikörperbedingte Agglutination. Zu einer solchen Agglutination führen lediglich die Antikörper der Klasse IgA (KREMER et al.; 1977).

Der „sperm-penetration-meter-test“ oder „KREMER-Test“ wurde von KREMER (1965) entwickelt und stellt einen Kapillartest, der der Bestimmung der Wanderungstrecke der Spermien innerhalb einer bestimmten Zeiteinheit dient, dar. Hierzu werden Kapillaren mit humanem Zervikalmukus oder auch Blutserum gefüllt, an einem Ende durch Paraffin luftdicht versiegelt und mit dem andern, offenem Ende in die Spermprobe gehalten. Nach Ablauf einer bestimmten Zeit ermöglicht dieser Test mit Hilfe einer Messskala das Ablesen der Penetrationsstrecke sowie -dichte, der Motilitätsqualität und eventueller Agglutinationen. Darüber hinaus ergibt sich die Möglichkeit Kreuztests durchzuführen, indem Spendermukus, -serum oder -samen zum Einsatz kommen. Rückschlüsse auf eine Immunreaktion können somit gezogen werden.

Der Test beschränkt sich jedoch selbst durch die optische Begrenzung, die durch die runde Form der Kapillarwand gegeben ist. Diese Rundung stört das Bild der Spermien auf allen Ebenen bis auf einen schmalen Bereich in der Mitte der Kapillare. Das macht es unmöglich die genaue Form und die Bewegungen der Samenzellen sowie deren Lokalisation innerhalb der Kapillare eindeutig zu bestimmen (KREMER und KROEKS, 1975).

Die Lösung dieses Problems lieferten MILLS und KATZ (1978), indem sie den KREMER-Test modifizierten. Anstatt der ursprünglichen runden Kapillare verwendeten sie eine flache Glaskapillare mit definierter Schichtdicke und Volumen. Dadurch erreichten sie, dass eine begrenzte Ebene entstand, die für die Betrachtung der Spermien genutzt werden konnte. Dies ermöglichte die Erfassung und die

Beurteilung jedes einzelnen Spermiums während der Penetrationsphase. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die Länge der Kapillare keinen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Spermien hat.

FENEUX et al. (1985) verwendeten den KREMER-Test in ihren Untersuchungen über die Infertilität beim Mann. Es stellte sich heraus, dass einige Ejakulatproben infertiler Männer, deren Spermogramm durch einen hohen Prozentsatz morphologisch intakter und hohem Anteil an motilen Spermien mit guter Vorwärtsbeweglichkeit als unauffällig zu bezeichnen ist, den Zervikalmucus nicht durchdringen konnten. Diese Spermien wiesen eine verringerte Schlageffizienz des Schwanzes auf, während die Schlagfrequenz erhöht war.

Dem entsprechend stellen sich die Ergebnisse der Studien von ALEXANDER (1981), INSLER et al. (1979) und EGGERT-KRUSE et al. (1989a; 1989b) dar. Sie alle konnten eine deutliche Korrelation zwischen Penetration und Fertilität ausmachen. Unter Einsatz des gekreuzten KREMER-Tests konnten sie deutliche Unterschiede im Penetrationsverhalten der Spermien von gesunden im Gegensatz zu infertilen Männern feststellen. Die Auswertung der Spermien infertiler Männer fiel schlechter aus. Die von GALLI et al. (1991) durchgeführte Untersuchung von bovinem Tiefgefriersperma unter Einsatz eines kommerziell erhältlichen Penetrationstest-Kit (PENETRAC®), der auf Rindermucus basiert, ergab, dass die größte Aussagekraft dem am weitesten gewanderten Spermium zukommt. Darüber hinaus konnte eine sehr hohe Korrelation zwischen der Penetration der Spermien durch den Mucus und der Spermienintegrität bzw. der Akrosomenintegrität festgestellt werden.

MURASE und BRAUN (1990) kommen zu dem Schluss, dass sich eine Aussage über die Fertilität von Bullen durch den Einsatz von Mucuspenetrationstests und deren Auswertung treffen lässt. Sie fanden in ihrer Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Spermienmotilität, der Penetration des Mucus und der Konzeptionsrate.

Während der Test durch zahlreiche Studien zunehmend Anwendung und Bedeutung fand, stieg auch das Interesse, ihn zu modifizieren. Insbesondere wurde ein adäquater Ersatz für den humanen Zervikalschleim gesucht. In der Studie von LEE et al. (1977) kam deshalb bovines Zervikalsekret zum Einsatz. Dieses wurde Rindern entnommen, die sich im Östrus befanden. Auch in den Untersuchungen von GADDUM-ROSSE et al. (1980) und ALEXANDER (1981) wurde Rindermucus

verwendet. Es konnte eine starke Ähnlichkeit dem humanen Zervikalschleim gegenüber festgestellt werden, die besonders in der viskoelastischen Eigenschaft ausgeprägt war. Darüber hinaus stellten LEE et al. (1981) fest, dass es sich auch ohne Einfluss auf seine Charakteristika tiefgefroren lagern lässt.

Eine andere Alternative zum humanen Zervikalmucus erforschten EGGERT-KRUSE et al. (1990). In ihren Versuchen verglichen sie diesen im Penetrationstest mit frischem Hühnereiweiß. Es ergaben sich deutliche Übereinstimmungen hinsichtlich der Penetrationsstrecke und dem Motilitätsgrad der Spermien sowohl bei fertilen wie auch infertilen Paaren. Die mittlere Überlebensrate der Samenzellen war im Hühnereiweiß stark allerdings herabgesetzt.

MORTIMER et al. (1986) sahen in der Verwendung des humanen Sekretes die Problematik der mangelnden Objektivierbarkeit des Tests aufgrund der individuell schwankenden Zusammensetzung, die in Kombination mit weiteren Faktoren Einfluss auf die Interaktion zwischen Spermien und Mucus nehmen kann. Um eben solche auszuschließen, entwickelten MORTIMER et al. (1990) einen synthetisch hergestellten Mucus. Er basiert auf einem Phosphatpuffer und dem Zusatz von Hyaluronsäure. In ihrer Untersuchung stellten sie diesen Mucus dem humanen im Penetrationstest gegenüber und fanden hinsichtlich der Spermiovorwärtsbeweglichkeit, der Vitalität und morphologischen Abnormalitäten hochsignifikante Korrelationen.

Dem entgegen stehen die Ergebnisse der Studie von VON STERN (2001). Unter Verwendung des analog zur Studie von MORTIMER et al. (1990) hergestellten synthetischen Mucus konnten keine Korrelationen zu anderen Parametern festgestellt werden. Die Autorin betrachtet das Ergebnis des Mucuspenetrationstests somit als eigenständigen Parameter, der zusätzliche Informationen zur klassischen Samenanalyse bereitstellt.

Diese Ergebnisse widersprechen denen von AITKEN et al. (1992), die mit ihrer Studie die Ergebnisse von MORTIMER et al. (1990) bestätigen und darüber hinaus eine ebenfalls signifikante Korrelation zwischen der Fähigkeit von Spermien synthetischen Mucus zu penetrieren und ihrer Kapazität für die Fusion mit der Eizelle belegen. Des Weiteren verglichen sie zwei verschiedene, kommerziell erwerbliche, synthetische Mucusarten, SPERM SELECT® und PENETRAK® und kamen auch hierbei zu großen Übereinstimmungen.

CORREA et al. (1997) setzten bei ihren Untersuchungen an bovinem Tiefgefriersperma ebenfalls das SERONO PENETRAK® KIT ein und bestätigten anhand ihrer Ergebnisse den engen Zusammenhang zwischen der Penetrationsfähigkeit und der Fertilität.

Eine weitere Alternative zum synthetischen Mukus stellt der Einsatz von Polyacrylamid dar. Diese häufig in der Elektrophorese genutzte Chemikalie verwendeten LORTON et al. (1981) in seiner Studie als Medium im Mukuspenetrationstest.

URRY et al. (1986) verglichen in ihrer Studie die Anwendbarkeit von entsprechend hergestellten Polyacrylamid-Gelen mit der Verwendung von bovinem Zervikalmukus in Penetrationstests und kamen zu dem Ergebnis, dass Polyacrylamid-Gele geeignet sind.

Dies bestätigen die Ergebnisse von ANILKUMAR et al. (2001). Auch hier wurden vergleichende Studien zwischen dem Einsatz des Mediums auf Polyacrylamid-Basis und bovinem Zervikalmukus durchgeführt. Das synthetische Medium erwies sich zwar als Einflussfaktor auf die Penetrationsdistanz, da die Spermien in diesem Medium eine deutlich geringere Wanderstrecke durchdrangen im Vergleich zum nativen Mukus. Dennoch stand die Eignung des synthetischen Mediums außer Frage. Darüber hinaus konnten Korrelationen zwischen Penetrationsstrecke und Vorwärtsbeweglichkeit festgestellt werden.

Auch in der Studie von BECHER (2014) kamen Medien auf Polyacrylamid-Basis bei der Entwicklung eines Mukuspenetrationstests zum Einsatz. Auf Grundlage der genannten Studien wurden hierbei verschiedene Konzentrationen an Polyacrylamid bei der Herstellung der Gele verwendet. Es konnten auch hier signifikante Korrelationen zwischen der Penetrationsdistanz und der Vorwärtsbeweglichkeit sowie der Motilität festgestellt werden.

Der Einsatz eines Mukuspenetrationstests für equines Ejakulat ist in der Literatur ausschließlich in der Studie von VON STERN (2001) beschrieben. Dort wurde der Test zur Untersuchung des Samens auf Tiefgefriereignung verwendet und für geeignet befunden. Dabei kam ein synthetisches Medium auf der Basis von Hyaluronsäure und Phosphate-buffered Baker's Medium (PBB) zum Einsatz. Gemessen und ausgewertet wurden die Penetrationsstrecken der Ejakulatproben jeweils vor und nach dem Einfrieren. Nativsamen wies eine Penetrationsstrecke von

48,5 mm mit einer Standardabweichung von 20,9 mm auf. Hingegen konnten beim Tiefgefriersperma Penetrationsstrecken von 35,5 mm mit einer Standardabweichung von 31,9 mm gemessen werden. Somit konnte eine statistisch signifikante Reduzierung der Penetrationsstrecke durch das Tiefgefrieren nachgewiesen werden. Jedoch zeigten die Werte dabei eine hohe Streuung. Diese Ergebnisse wurden in Kombination mit Ergebnissen aus der Messung der Akrosinaktivität mittels Gelatinolyse zur Prüfung der Gefriertauglichkeit herangezogen.

### **2.3.2 Hamster-Oozyten-Penetrationstest**

Die Fähigkeit der Spermien an der Zona pellucida zu binden und diese zu penetrieren ist ein Hauptbestandteil ihrer Funktionalität. Daraus erschließt sich ein direkter Zusammenhang zwischen eben dieser Fähigkeit und der Fertilität (FAZELI et al., 1993; MEYERS et al., 1996; ZHANG et al., 1998).

Aus diesem Wissen heraus sind zahlreiche Wissenschaftler bemüht, einen Test zu entwickeln, der eben diese Fähigkeit erfordert und so die Korrelation zur Fertilität für den Einsatz in der andrologischen Diagnostik nutzbar macht.

YANAGIMACHI (1972) zeigte, dass Meerschweinchensperma Zona pellucida-freie Oozyten von Hamstern penetrieren kann. In einer weiterführenden Studie fanden YANAGIMACHI et al. (1976) heraus, dass sich auch humanes Sperma für diese Art Test eignet. Diese Entdeckung ermöglichte die Entwicklung eines in-vitro-Oozyten-Penetrationstests, der zur Erfassung der Fertilität dient. Hierbei wird das Ovar eines Goldhamsters verwendet, welches 15 bis 17 Stunden zuvor durch die intraperitoneale Injektion von humanem Chorion-Gonadotropin (hCG) zur Superovulation gebracht wird. Die Cumuluszellen werden durch die Behandlung mit boviner testikulärer Hyaluronidase entfernt. LANDIM-ALVARENGA et al. (2001) fanden in ihrer Studie heraus, dass Hengstsperma darüber hinaus auch bovine Oozyten, die von ihrer Zona pellucida befreit wurden, penetrieren können.

Aus dieser Erkenntnis heraus ergaben sich diverse Kombinationsmöglichkeiten für den Einsatz dieses in-vitro-Tests bei vielen Tierarten (MOCE und GRAHAM, 2008).

Der Hamster-Oozyten-Penetrationstest (HOPT) findet auch Einsatz in der Andrologie des Hengstes, jedoch wird seine Aussagekraft kontrovers diskutiert. Die Studie von OKOLSKI und Mitarbeitern (1987) lieferte keinen beweiskräftigen Zusammenhang zwischen der Motilität und der Penetration von Zona-freien Hamster Oozyten.

PADILLA et al. (1991) verwendeten in ihren Untersuchungen tiefgefrorene Oozyten von Hamstern, deren Zona pellucida zuvor entfernt wurde. Getestet wurden frische und 24 Stunden sowie 72 Stunden lang gekühlte equine Spermaproben nach Induktion der Akrosomenreaktion. Die Ergebnisse zeigen, dass die Penetrationsfähigkeit mit Zunahme der Lagerungszeit abnimmt.

WILHELM und Mitarbeiter (1996) kamen zu dem Schluss, dass weder der prozentuale Anteil an penetrierten Zona-freien Hamster-Oozyten noch der Durchschnitt der sich innerhalb befindender Spermatozoen mit der Fertilität korreliert, wenn es sich um kryokonserviertes Hengstsperma handelt.

In der Humanmedizin gilt dieser Test hingegen als sensitivster seiner Art und ihm wird die Lieferung wertvoller Informationen über viele verschiedene Aspekte der Funktionalität von Spermien zugestanden (AITKEN, 2006).

### **2.3.3 Akrosomale Reaktion (AR)**

Der Prozess der akrosomalen Reaktion verläuft exozytotisch. Hierbei werden im Zuge der Fusion der Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran Enzyme aus der vorderen Kopfkappe des Spermiums freigesetzt. Die Samenzellen sind nur nach erfolgreich vollzogener AR in der Lage die Zona pellucida der Eizelle zu penetrieren. Aus dieser Tatsache erschließt sich die Bedeutung für die Funktion und wie auch beim HOPT der Zusammenhang mit der Fertilität des Spermiums (LIU und BAKER, 1992; SCHILL 1988).

Deswegen wurden Möglichkeiten entwickelt, akrosomal reagierte Spermatozoen darzustellen. Dies geschieht mit Hilfe der sogenannten „triple staining“. Dabei binden fluoreszierende Antikörper bzw. Lektine an Bestandteilen der akrosomalen Membranen oder an der akrosomalen Matrix (KOHN und HAIDL, 2007) .

Dem entsprechend verwendeten AITKEN et al. (1984) in ihrer Studie zur Untersuchung der akrosomalen Reaktion und deren Darstellung das zweiwertige Kation Ionophor A23187.

Zwei Jahre später fanden AITKEN et al. (1986) heraus, dass die Nutzbarkeit dieses Reagenz darauf beruht, dass es ein intrazelluläres Kalziumsignal erzeugt. Dieses bewirkt eine Folge von membranassoziierten Veränderungen, die in der Akrosomenreaktion gipfeln.

Eine Alternative stellt der Einsatz von Progesteron dar. Eine hohe Konzentration des Hormons induziert die AR. Dieser Reaktion liegen Progesteronrezeptoren in der Plasmamembran zu Grunde (CHENG et al., 1996).

Dennoch wird die Nutzung kontrovers diskutiert. AITKEN (2006) gibt zu bedenken, dass durch Progesteron akrosomal reagierte Spermien ihre Kapazität zur Erkennung der Zona pellucida einbüßen. Die Konsequenz daraus ist eine verminderte Fertilität. Deswegen erhält das divalente Kation Ionophor A23187 gegenüber dem physiologischen Progesteron den Vorzug.

A23187 ist nicht die einzige Untersuchungsmöglichkeit der AR. Den Einsatz von Hoechst 33258 beschreibt AITKEN (1988). Diese Supravitalfärbung bewirkt bei Zellen mit intakter Plasmamembran eine eingeschränkte Membranpermeabilität. Dadurch können die akrosomal reagierten Zellen identifiziert und beurteilt werden.

AITKEN (2006) befasst sich auch mit der Verwendung von fluoreszierenden Lektinen. Diese binden entweder an die äußere Akrosomenmembran (*Arachis hypogaea*) oder an den akrosomalen Inhalt (*Pisum sativum*) Agglutinin. Auf diese Weise markieren die Lektine durch einen fluoreszierenden Bereich um das Äquatoralsegment des Spermienkopfes akrosomal reagierte Zellen.

GRAHAM et al. (1986) berichten, dass mit aus Dilauroylphosphatidylcholin (PC12) bestehenden Liposomen behandeltes Bullensperma zur AR angeregt wird und Oozyten in vitro befruchten kann. PC12 fügt sich in die Plasmamembran ein und sorgt dort für einen Anstieg des Kalziumniveaus. Es induziert die Vesikulation der äußeren Akrosomenmembran mit der Plasmamembran, was die AR nach sich zieht (NOLAN et al., 1992).

Trotz dieser verschiedenen Möglichkeiten gilt in der Humanmedizin bis heute die native humane Zona pellucida als adäquatester Auslöser der AR (LIU und BAKER, 2000, 2003).

#### **2.3.4 Mitochondrien-Funktionstest**

Um die Funktion der Mitochondrien zu prüfen, gibt es verschiedene Ansätze und Möglichkeiten.

GARNER und Mitarbeiter (1997) verwendeten in ihrer Studie zur Erfassung der Mitochondrienfunktion bei kryokonserviertem Bullensperma eine fluorometrische

Technik. Hierbei wurden die aktiven Mitochondrien der Samenzellen mit drei verschiedenen Fluoreszenzen gekennzeichnet. Verwendung fanden Rhodamin 123 (Rh123), 5,5', 6,6'-Tetrachloro- 1,1', 3,3'-Tetraethylbenzimidazolyl-Carbocyanin-Iodid (JC-1) und MitoTracker Green FM (MITO). Die Ergebnisse der fluoreszierten Mitochondrien wurden mit Hilfe einer Durchflusszytometrie erfasst und anschließend denen der lichtmikroskopisch ermittelten Werte bezüglich Motilität gegenübergestellt. Es konnte eine hohe Korrelation zwischen ihnen festgestellt werden.

JOHNSON und NEAVES (1981) konnten in ihren Untersuchungen beobachten, dass Mitochondrien ein besonderes Membranpotential aufweisen, welches hauptsächlich an funktionellen Mitochondrien gefunden wird. Die Studie befasste sich mit der Darstellbarkeit und der Beobachtung von eben diesem Membranpotential mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bei individuellen, lebenden Zellen. Sie lieferten somit die Grundlage zur Kontrolle des Metabolismus und den energetischen Aufgaben auf zellulärer Ebene. Mit den Ergebnissen dieser Studie konnten nun Tests entwickelt werden, die das Mitochondrien-Membranpotential (MMP) messen und auswerten können.

EVENSON et al. (1982) untersuchten das MMP mittels Rh 123 und Ethidium Bromid (EB). Hierbei sorgte Rh 123 für die grüne Färbung während EB die rote Färbung übernahm. Eine deutliche Korrelation vom MMP zur Motilität der Spermien konnte festgestellt werden.

Die Studien von AUGER et al. (1989), in denen das MMP humaner Spermien mit Hilfe von Rh 123 getestet wurde, bestätigen die positive Korrelation durch ähnliche Ergebnisse.

Bei der Untersuchung des MMPs im Bullensperma unter Verwendung von Rh 123 kamen GRAHAM und Mitarbeiter (1990) ebenfalls zu Ergebnissen, die bestätigen, dass das MMP zur Beurteilung der Fertilität heran gezogen werden kann. Darüber hinaus wurde auch eine Korrelation zwischen dem MMP und der Überlebensfähigkeit der Samenzellen festgestellt.

WINDSOR und WHITE (1993) fanden in ihrer Studie heraus, dass sich mit Hilfe von Rh 123 Dysfunktionen der Mitochondrien durch abweichende MMPs im Widdersperma entdecken lassen.

GRAVANCE und Mitarbeiter (2000) konnten erstmalig zeigen, dass sich die Änderungen im MMP des equinem Spermas darstellen lassen. Um diese Methode zu optimieren, erprobten KIRK und Mitarbeiter (2005) in ihrer Studie diverse Ansätze,

um das MMP an kryokonservierten Hengstspermatozoen zu untersuchen. Dabei kamen sowohl Propidium Iodid (PI) und SYBR-14 als auch JC-1 zum Einsatz. Der Verwendung von JC-1 wurde größere Bedeutung zugesprochen, dennoch konnte auch mit Hilfe der anderen Stoffe das MMP dargestellt, ausgewertet und als Indikator der Motilität angesehen werden.

### **2.3.5 Swim-up**

Swim-up (SU) ist eine Technik, die es erlaubt, die Motilität von Spermien zu erfassen (PICHARDO et al., 2009).

Hierzu wird der Samen sorgfältig in ein Röhrchen pipettiert und mit Dextran, Human Tubal Fluid Medium (HTF), Natriumchlorid, Saccharose, Natrium-Laktat, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), Glukose, Kaliumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumpyruvat, Dikaliumhydrogenphosphat, Penicillin, Streptomycin und Serum-Albumin versetzt. Anschließend erfolgt eine Inkubation von 60 Minuten bei 37°C. Die Motilität wird subjektiv mit Hilfe eines Mikroskops bewertet. Hierfür werden 200 Samenzellen ausgezählt, die ein progressives Verhalten aufweisen. Die Besonderheit an diesem Test ist die Möglichkeit bewegliche von unbeweglichen Spermien zu trennen.

Diese Methode kam bereits in mehreren Studien zur Untersuchung von Hengstsperma zum Einsatz. Sie erwies sich als geeignet, um die Fertilität von Frischsamen mit kryokonserviertem Sperma zu vergleichen (CHOI et al., 2002; SIEME et al., 2003). ROASA et al. (2007) setzten in ihrer Studie die Swim-up Technik ein, um Effekte verschiedener Verdüner auf die Fertilitätsraten in vitro zu testen. MORELL und GERAGHTY (2006) verwendeten diese Methode zur Untersuchung des equinen arteritis Virus (EAV). Hierbei erfolgte eine Auftrennung der Spermien mittels Swim-up, um dadurch die virusfreien Spermien von den infizierten Samenzellen zu trennen.

### **2.3.6 Sperma-Chromatin-Struktur-Test**

Der Sperma-Chromatin-Struktur-Test (SCSA) wurde entwickelt, um die Intaktheit des Chromatins in der Spermien-DNA zu untersuchen. Dem zu Grunde liegen die Erkenntnisse, dass das Chromatin in einem Spermatozoon auf ein Sechstel des Volumens einer somatischen Zelle kondensiert wird (KATILA, 2001). Diese

Kondensierung ist ein Mechanismus, der dem Schutz der DNA vor Umwelteinflüssen und Mutagenese dient (WARD und COFFEY, 1991). Eine Veränderung der Chromatinstruktur kann sich auf den Grad der Kondensierung bzw. der Dekondensierung auswirken. Diese jedoch stellt die Bedingung für die Ausbildung des männlichen Pronucleus während der Fertilisation dar und ist demzufolge maßgeblich an der Entwicklung des Embryos beteiligt (PERREAULT et al., 1987). Eine Herabsetzung der Spermien-Chromatin-Stabilität führt demnach zu verminderter Fertilität und Aborten (IBRAHIM und PEDERSEN, 1988).

EVENSON et al. (1980) entwickelten den SCSA. Dieser Test zeigt Abnormalitäten des Chromatins mit Hilfe einer Durchflusszytometrie auf. Als Farbstoff wird Acridin Orange verwendet, der Einzelstränge rot und Doppelstränge grün färbt.

An Hand dessen wurde herausgefunden, dass Spermia von Individuen mit einer hohen Fertilität deutlich weniger Denaturierungen im Chromatin aufweisen als Spermia von Individuen mit geringerer Fertilität (EVENSON et al., 1980). Untersucht wurden hierbei Ejakulate von Mäusen, Bullen und Männern. Auf diese Studie folgten weitere Untersuchungen, wobei BALLACHEY und Mitarbeiter (1988; 1987) ihren Fokus auf Bullenspermia richteten, während LOVE und KENNEY (1998) Hengstpermia untersuchten. Sie kamen zu vergleichbaren Ergebnissen.

### **2.3.7 Glass wool/ sephadex Filtration**

Die Filtration bietet eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung des Samenzellenanteils, der sich durch bereits durchgeführte Kapazitation, Membrandefekte oder akrosomale Schäden kennzeichnet.

Bei der Filtration durch Glaswolle wird die Samenprobe mit EDTA gewaschen, anschließend wird die Glaswolle in eine Minitube-Kapillare gefüllt und komprimiert bis die 1,5 ml Marke erreicht ist. Der Samen wird hinzugegeben (1 ml) und zwei Mal mit EDTA gewaschen. Das Filtrat enthält ausgewaschene Spermien, die dann weiteren Untersuchungen zur Verfügung stehen (SAMPER et al., 1991).

Bei der weiter entwickelten Methode enthält die Glaswolle 20% Sephadex-G-15® Gel. Zum Auswaschen wird auch hier EDTA verwendet (SAMPER et al., 1991).

Bei der Filtration von Hengstejakulat zeigt sich deutlich, dass sich Spermatozoen mit akrosomalen Schäden oder solche, die die AR bereits vollzogen haben, in den S-Filtern festsetzen und somit identifizieren lassen.

Die Untersuchungen mit dieser Testmethode ergab eine signifikante Korrelation zwischen dem Prozentsatz an Spermien, die den Filter passieren und der Trächtigkeitsrate (SAMPER et al., 1991). Ähnliche Ergebnisse liefert Tiefgefriersamen.

Kritisiert wurde die Glaswolle/Sephadex Filtration von VIDAMENT et al. (1998). Hier wird diese Technik als unseriös bezeichnet, weil 75% der Abweichungen an anderen Fehlerquellen, wie den Ejakulaten oder Tubes, lagen.

### **2.3.8 Computer-unterstützte Spermiumkopf-Morphometrie**

Morphologisch intakte Spermien sind Grundvoraussetzung für eine gute Fertilität (DOTT, 1975; JASKO et al., 1990). Insbesondere ist der Spermiumkopf für die Fertilität von entscheidender Bedeutung. Neben der gängigen lichtmikroskopischen Untersuchung und den Färbetechniken stellt die Computer assistierte Morphometrie eine Alternative dar.

Diese Methode reduziert die Subjektivität der Auswertung und liefert somit objektive, wiederholbare Ergebnisse. Um sie zu optimieren, wurden viele dieser ASMA Systeme (*automated sperm morphometry analysis*) entwickelt.

JAGOE und Mitarbeiter (1986) untersuchten die Morphologie der Spermienköpfe im humanen Ejakulat anhand einer semiautomatischen Methode.

KATZ et al. (1986) bedienten sich in ihrer Studie der Videomikrographie. Hierbei wurden die Konturen der Spermatozoen manuell auf einen Videomonitor übertragen, um sie zu digitalisieren.

MORUZZI und Mitarbeiter (1988) führten ihre Studien mittels einer semiautomatischen Methode durch.

DAVIS und Mitarbeiter (1992) entwickelten für die Humanmedizin ein ASMA-System mit dem Anspruch auf Exaktheit und Präzision, welches kommerziell erhältlich ist.

Für den Einsatz in der veterinärmedizinischen Andrologie, speziell in der Untersuchung von Hengstejakulaten, wurde das ASMA-System von DAVIS und Mitarbeiter (1993) modifiziert.

Überprüft wurde diese Methode von GRAVANCE et al. (1996) durch eine Untersuchung über die Quantifizierung physiologischer Köpfe in Hengstejakulat.

In dieser Forschungsreihe wurden fertile und subfertile Hengste auf ihren Anteil normaler Köpfe im Ejakulat mit Hilfe eines Computers unterstützten Programms untersucht. Hierbei kam die Lichtmikroskopie mit dem Farbstoff Hämatoxylin zum Einsatz. Die Auswertung erfolgte anhand der üblichen Kriterien wie Länge, Breite und Fläche. Zugrunde lagen dabei die Ergebnisse der Studie von KATZ und Mitarbeitern (1986), welche einen Zusammenhang mit diesen Parametern und der Fertilität belegt.

Die Ergebnisse zeigten einen signifikant höheren Prozentsatz an physiologischen Köpfen in den Ejakulaten der fertilen Hengste.

Somit stellt dieser Parameter ein weiteres Kriterium für fertiles Sperma dar. Dieses Ergebnis bestätigen BOERSMA und BRAUN (1999) in ihrer Veröffentlichung, in der sie einen allgemeinen Überblick über dieses Testverfahren in der Veterinärmedizin geben.

### **2.3.9 Überlebenstests (Persistenz der Motilität)**

Diese Methode zur Klassifizierung equiner Samenzellen basiert auf der Untersuchung der Motilität. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Tests wird hier das Augenmerk auf die Persistenz dieser Fähigkeit insbesondere unter speziellen Bedingungen gerichtet.

Die Durchführung dieses Tests setzt voraus, dass der Samen in warme, sterile Tubes abgefüllt ist und diese trocken und dunkel gelagert werden. In bestimmten Zeitintervallen werden die Samenzellen nun durchmischt bis weniger als 10% von ihnen eine gerichtete Motilität aufweisen (KENNEY et al. 1983).

Inkubationszeit und Temperatur können dabei variieren. Generell ist festzustellen, dass die Persistenz der Motilität mit Abnahme der Temperatur sinkt.

MÜLLER (1982; 1987) führte bei seinen Studien diesen Test über einen Zeitraum von über 120 Stunden bei Temperaturen zwischen 2 bis 4 °C beziehungsweise 1 bis 4 °C durch, um ein Kriterium für die Akzeptanz von Tiefgefriersperma zu erhalten.

Im Durchschnitt beträgt die Überlebenszeit für akzeptables Sperma 202 Stunden, wobei Zeitspannen von 120 bis 312 Stunden zu beobachten sind. Der Überlebenstest wird in einigen Besamungsstationen routinemäßig verwendet.

### 2.3.10 Biochemische Parameter

In dem Bestreben einen schnellen, kostengünstigen und standardisierbaren Test zur Klassifizierung der Funktionsfähigkeit von Samenzellen zu entwickeln, richtete sich das Augenmerk auch auf biochemische Parameter. Einen wesentlichen Fortschritt in diesem Bereich erbrachte die Erkenntnis, dass eine mangelhafte Funktionalität häufig mit oxidativem Stress korreliert. Verursacht wird dieser Stress durch eine stark erhöhte Anzahl an reaktiven Sauerstoffteilchen (*reactive oxygen species: ROS*) und oder einer Verminderung des antioxidativen Schutzes innerhalb des männlichen Reproduktionstraktes (AGARWAL et al., 2003; AITKEN, 2004; AITKEN und CLARKSON, 1987).

Auf einem niedrigen, physiologischen Niveau sind ROS wichtig für die Samenzellen. Sie sind an der Kontrolle der Tyrosin-Phosphorylierung im Zuge der Kapazitation beteiligt (AITKEN, 1999; AITKEN et al., 1998). Werden vermehrt ROS produziert, sorgen sie für einen peroxidativen Schaden an der Plasmamembran des Spermiums, was eine negative Beeinflussung der Funktionalität zur Folge hat. Das Wissen um die Korrelation zwischen oxidativem Stress und der Funktionsfähigkeit von Spermien galt es mit Hilfe eines Tests für die Spermauntersuchung nutzbar zu machen.

Hierzu kommen chemilumineszierende Substanzen, wie Luminol und Lucigenin, zum Einsatz. Diese Stoffe sind redox-sensitiv. Je nach Intensität des Signals, welches sie hervorrufen, ist die Probe auf ROS-Gehalt zu klassifizieren.

In vielen unabhängigen Studien konnte belegt werden, dass der Chemilumineszenztest die Redoxaktivität darstellt und somit das Fertilitätspotential von humanen Spermatozoen in vivo und in vitro reflektiert (AITKEN et al., 1991; SAID et al., 2004; SUKCHAROEN et al., 1995; ZORN et al., 2003). Dennoch wird der Chemilumineszenztest kontrovers diskutiert, denn eine der größten Fragestellungen in diesem Zusammenhang konnte bislang nicht sicher geklärt werden: In wie weit wird der sensitive Chemilumineszenztest durch die Anwesenheit von Leukozyten beeinflusst?

Leukozyten kontaminieren Sperma sehr leicht und regen die Produktion von ROS sehr stark an. Deswegen ist es essentiell, dass der Samen vor Anwendung des Tests von Leukozyten befreit wird. Diese Maßnahme ist sehr effektiv und kann leicht durch die Verwendung von paramagnetischen Kugeln durchgeführt werden. Diese Kugeln sind mit Anti-CD 45, dem gebräuchlichsten Leukozyten-Antigen, umhüllt (AITKEN et al., 1996).

Alternativ kann der oxidative Stress der Spermien durch den Status der Lipid-Peroxidation ermittelt werden (JONES et al., 1979; TWIGG et al., 1998).

Neben den ROS spiegeln auch andere biochemische Substanzen die Funktionstüchtigkeit von Samenzellen wieder.

BROWN und Mitarbeiter (1971) untersuchten eine Reihe von Enzymen vor dem Hintergrund, dass eine Samenzelle mit Membrandefekt verschiedene Metaboliten und Enzyme verliert. Zu diesen Substanzen gehören die Aspartat-Aminotransferase, Fumarase, Isocitratdehydrogenase, Aconitase, Arylsulfatase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Glutaminooxalacetat-Transaminase, Laktatdehydrogenase, Cholinesterase sowie saure und alkalische Phosphatasen. Je nach dem welches Enzym vorgefunden wird, lassen sich Rückschlüsse auf die Lokalisation des Membrandefektes ziehen. So befinden sich beispielsweise die aminosäurespaltenden Enzyme bei intakten Samenzellen im Akrosom und im Seminalplasma.

Einen Hinweis auf die Membranintegrität liefert ebenfalls ATP. Intakte Spermatozoen weisen einen relativ hohen Anteil an ATP auf. Durch Membrandefekte kann ATP wie auch die dephosphorylierten Moleküle ADT und AMP ins Seminalplasma gelangen und es hydrolysieren (COLENBRANDER et al., 1992). Darüber hinaus liefert ATP auch Aufschluss über die Aktivität der Mitochondrien und kann mit Hilfe der Biolumineszenz ermittelt werden (VIDAMENT et al., 1998).

BALL und Mitarbeiter (1997) richteten ihr Augenmerk auf die Akrosin-Amidase. Dieses Enzym ist im Akrosom enthalten und wirkt proteolytisch.

Sie verwendeten in ihren Untersuchungen Tiefgefrier-Sperma von Hengsten. Dabei konnten sie beobachten, dass die Samenzellkonzentration die Akrosin-Amidase-Aktivität anhebt.

Die verschiedenen Enzymkonzentrationen im Sperma liefern somit Informationen über die Funktionsfähigkeit und Intaktheit der Samenzellen. Ihre Messung wird seit Langem praktiziert und die Tests dafür sind schnell, einfach und kostengünstig.

Dennoch ergibt sich aus der Tatsache heraus, dass die Enzyme nicht ausschließlich in den Spermatozoen vorkommen, das Problem der Fehlerhaftigkeit (KATILA, 2001).

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Polyacrylamid-Gele**

Im Rahmen der Vorversuche wurden neun verschiedene Gele auf Polyacrylamid-Basis getestet. Die Herstellung basiert auf den Vorgaben von LORTON et al. (1981) mit der Modifikation nach BECHER et al (2013). Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche kam in den Hauptversuchen das 1,8%ige Polyacrylamid-Gel mit Fruktosezusatz zum Einsatz.

##### **3.1.1 Herstellung der Pufferlösungen**

###### **3.1.1.1 TRIS-Puffer-Lösung**

###### **3.1.1.1.1 T18**

Es wurden zwei sich in der Konzentration unterscheidende TRIS-Puffer-Lösungen hergestellt. Dazu wurde für den Puffer T18 folgende Menge mit einer Präzisionswaage (Mettler PJ300, Mettler-Toledo, Gießen) abgewogen:

TRIS (Merck, Darmstadt)	18,17 g
-------------------------	---------

Diese Menge wurde mit 40 ml zweifach destilliertem Wasser versetzt.

Anschließend wurde diese Lösung mittels 1N Salzsäure titriert bis ein pH-Wert von 8,8 erreicht wurde.

Aqua bidest, Salzsäure (MAGV, Rabenau-Londorf)	ad 100 ml
------------------------------------------------	-----------

Durch dieses Verfahren wurde eine 1,5 M TRIS-Puffer-Lösung hergestellt. Bis zur Anwendung wurde sie in einer verschlossenen Glasflasche bei 4 °C aufbewahrt. Im Zuge der Anwendung erfolgte eine Erwärmung auf Raumtemperatur.

###### **3.1.1.1.2 T23**

Analog zur Herstellung des T18-Puffers erfolgte die Herstellung des T23-Puffers mit Variation in der TRIS -Menge.

TRIS (Merck, Darmstadt)	23,64 g
-------------------------	---------

### 3.1.1.2 PBS-Puffer

Zur Herstellung des PBS-Puffers wurde eine PBS-Tablette in 250 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Dies geschah unter Verwendung eines Magnetrührers (IKA CombiMag Reo, IKA® Werke GmbH und Co. KG, Staufen).

PBS-Tabletten (Sigma-Aldrich, Steinheim)	1 Stück
Aqua dest.	250 ml

### 3.1.2 Herstellung der Polyacrylamid-Gele

#### 3.1.2.1 2%iges Polyacrylamid-Gel

Zur Herstellung des 2%igen Polyacrylamid-Gels kam eine 30%ige Polyacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese® Gel 30, Roth, Karlsruhe) (Acrylamid und N, N'-Methylen-Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1) zum Einsatz. 1,33 ml dieser Stammlösung wurden unter Anwendung jeweils eines der drei Puffer in einem Becherglas vermengt. Das Gesamtvolumen wurde mittels destillierten Wassers auf 20 ml erhöht.

Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)	1,33 ml
Puffer T18; T23 oder PBS	5 ml
Aqua dest.	ad 20 ml

Unter Einsatz eines Taumelschüttlers (Polymax 1040, Fa. Heidolph Instruments & Co.KG, Schwabach) wurde diese Lösung durchmischt. Im Verlauf der Durchmischung wurde folgendes zugesetzt:

Ammoniumperoxidsulfat (APS, Roth, Karlsruhe), 2%ige Lösung	300 µl
N, N, N, N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Roth, Karlsruhe)	10 µl

Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von ca. 12 Stunden. Hierzu wurde das Reaktionsgefäß unter Einsatz eines Parafilms (MAGV, Rabenau-Londorf) abgedichtet. Während dieser Zeit polymerisiert das Gel.

Anschließend wurde das Gel in einen Dialyseschlauch (Roth, Karlsruhe) gefüllt. Bei der Befüllung war auf Vermeidung von Luftblasenbildung zu achten. Der befüllte Schlauch wurde mittels eines Knotens an beiden Enden verschlossen und in eine phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS, Sigma-Aldrich, Steinheim) gegeben. Mit Hilfe eines Magnetrührers (IKA CombiMag Reo, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen) wurde die Lösung stetig durchmischt. In diesen Bedingungen erfolgte die Dialyse des Gels in der verschlossenen Flasche über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 4°C. Im Verlauf dieser Zeit wurde die phosphatgepufferte Salzlösung 3 bis 4mal gewechselt.

Im Anschluss erfolgte die Prüfung des Gels auf vollständige Polymerisation, Klarheit und Spinnbarkeit. Bei positiver Bewertung wurde das Gel in ein Becherglas gegeben und mittels eines Parafilms (MAGV, Rabenau-Londorf) verschlossen. Bis zur Anwendung wurde das Gel in dieser Form im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

### **3.1.2.2 1,9%iges Polyacrylamid-Gel**

Die Herstellung des 1,9%igem Polyacrylamid-Gel erfolgt analog den Schritten entsprechend der Herstellung des 2%igem Polyacrylamid-Gel. Die Variation der Konzentration rührte von der Zugabe der Menge an Polyacrylamid-Stammlösung. Diese betrug wie folgt:

Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)

1,266 ml

### **3.1.2.3 1,8%iges Polyacrylamid-Gel ohne Fruktose**

Die Herstellung des 1,8%igen Polyacrylamid-Gels erfolgt unter Verwendung einer 30%igen Polyacrylamid-Stammlösung (Acrylamid und N, N'-Methylen-Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1). 2,7 ml dieser Lösung wurden mit TRIS-Puffer (T 18) vermengt. Dem Gemisch wurde zur Volumenauffüllung Aqua bidest. hinzugegeben.

Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)	2,7 ml
TRIS-Puffer	11,4 ml
Aqua bidest.	29,97ml

Unter Einsatz einer Pipette (Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg) wurde diese Lösung durchmischt. Im Verlauf der Durchmischung wurde folgendes zugesetzt:

Ammoniumperoxidsulfat (APS, Roth, Karlsruhe), 10%ige Lösung	350 µl
N, N, N, N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Roth, Karlsruhe)	30 µl

Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von ca. 12 Stunden. Hierzu wurde das Reaktionsgefäß unter Einsatz eines Parafilms (MAGV, Rabenau-Londorf) abgedichtet. Während dieser Zeit polymerisiert das Gel.

#### **3.1.2.4 1,8%iges Polyacrylamid-Gel mit Fruktose**

Die Herstellung des 1,8%igen Polyacrylamid-Gels mit Fruktose erfolgt analog zur Herstellung des 1,8%igen Polyacrylamid-Gels unter Zugabe von einer 1%igen Fruktoselösung. Die Zugabe erfolgt vor der Durchmischung und der Beimengung von der 10%igen Ammoniumperoxidsulfat-Lösung (APS, Roth, Karlsruhe) und des N, N, N, N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Roth, Karlsruhe).

D(-)Fructose (Roth, Karlsruhe), 1%ige Lösung	226 µl
----------------------------------------------	--------

#### **3.1.2.5 1,5%iges Polyacrylamid-Gel mit Fruktose**

Zur Herstellung des 1,5%igen Polyacrylamid-Gels wird eine 30%ige Polyacrylamid-Stammlösung (Acrylamid und N, N'-Methylen-Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1) eingesetzt. 2,25 ml dieser Lösung wird TRIS-Puffer (T 18) sowie eine 1%ige Fruktoselösung beigemischt. Dem Gemisch wird anschließend zur Auffüllung des Volumens Aqua bidest. hinzugefügt.

Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)	2,25 ml
TRIS-Puffer	11,4 ml
D(-)Fruktose (Roth, Karlsruhe), 1%ige Lösung	0,0226 ml
Aqua bidest.	30,42 ml

Diese Lösung wird durchmischt. Während der Durchmischung erfolgt die Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS, Roth, Karlsruhe) und N, N, N, N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Roth, Karlsruhe) in folgenden Konzentrationen:

Ammoniumperoxidsulfat (APS, Roth, Karlsruhe), 10%ige Lösung	300 µl
N, N, N, N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED, Roth, Karlsruhe)	30 µl

Anschließend wurde die Lösung im Reaktionsgefäß zur Inkubation bei Raumtemperatur 12 Stunden lang mittels eines Parafilms (MAGV, Rabenau-Londorf) abgedichtet. In dieser Zeit erfolgt die Polymerisation des Gels.

### 3.1.3 Herstellung der phosphatgepufferten Salzlösung zur Dialyse

Unter Anwendung der unten genannten Zutaten fand die Herstellung einer fünffachen PBS-Stammlösung (PBS: phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung) statt. Dazu wurden die Bestandteile unter Zuhilfenahme einer Präzisionswaage (Mettler PJ300, Mettler-Toledo, Gießen) abgewogen. Anschließend wurden sie in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde in einer verschlossenen Flasche bei 4°C bis zur Anwendung aufbewahrt.

Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)	41 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim)	2,75 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (Sigma-Aldrich, Steinheim)	11 g
Aqua dest.	1000 ml

Für den Einsatz der fünffachen PBS-Stammlösung im Experiment erfolgte eine Verdünnung. Hierzu wurden 200 ml der Stammlösung separiert. Dieses Volumen wurde mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Dieser einfachen PBS-Lösung

wurde zusätzlich Fruktose hinzugefügt und mittels eines Magnetrührers (IKA CombiMag Reo, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen) durchmischt.

D(-)Fruktose (Roth, Karlsruhe)	10 g
Aqua dest.	800 ml

### **3.2 Penetrationsversuche**

Das Versuchsprinzip basiert auf dem „KREMER-Test“ (KREMER, 1965) unter Berücksichtigung der Modifikationen von BECHER et al. (2013).

Im Versuch wurden Eppendorfgefäße (Eppendorf Tubes Standard; Eppendorf, Hamburg) aus Plastik verwendet. Diese wurden in der Vorbereitung präpariert. Hierzu wurde eine Braunüle (Braun, Melsungen) verwendet, um die Deckel der Eppendorfgefäße mit jeweils zwei Löchern von der Größe einer Hämatokrit-Kapillare (75 mm/75 µl, Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt) zu versehen. Die so präparierten Gefäße wurden in einen vorgewärmten Heizblock auf einem Heiztisch (minitube, HAT 300) gestellt und so auf eine Temperatur von 37,5 °C gebracht.

#### **3.2.1 Hengste**

Für die Untersuchung standen Besamungsportionen von zwei gekörten Hengsten aus dem hessischen Landesgestüt Dillenburg zur Verfügung. Es handelte sich dabei um einen Holsteiner Prämienhengst im Alter von 16 Jahren und einen 6 jährigen Trakehner. Beide Tiere kamen regelmäßig im Deckgeschäft und im Reitsport zum Einsatz.

#### **3.2.2 Vorbereitung des Spermas**

Für den Einsatz des Tiefgefrierspermas in den Experimenten musste es zuvor aufgetaut werden. Dazu wurde das sich in 0,25 ml- beziehungsweise 0,5 ml- Pailletten befindende Hengstsperma 2 Minuten lang in ein 37,5°C warmes Wärmebad getaucht. Nach dem Auftauen wurde das Sperma aus der jeweiligen Paillette in ein Reagenzglas gegeben.

Zu Beginn des Experiments wurde die Spermaportion auf die vorbereiteten Eppendorfgefäße aufgeteilt, indem mittels einer Pipette (Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg) in jedes Gefäß jeweils 50 µl Sperma gegeben wurden.

### **3.2.3 Auswahlverfahren der Kapillaren**

Im Verlauf der Versuche kamen folgende Kapillaren zum Einsatz:

- Wiretrol® II Precision Micropipettes (Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting),  
Durchmesser: 2 mm  
Länge: 90 mm  
Volumen: 200 µl
- Hämatokrit-Kapillaren (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt),  
Durchmesser: 1 mm  
Länge: 75 mm  
Volumen: 75 µl
- Ringmarken Pipetten (Servoprax® GmbH, Wesel)  
Durchmesser: 0,8 mm  
Länge: 125 mm  
Volumen: 50 µl

Es stellte sich aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche heraus, dass sich die Hämatokrit-Kapillaren am besten eignen, sodass diese Kapillaren in den weiteren Experimenten zum Einsatz kamen.

### **3.2.4 Durchführung**

Zu Beginn des Experiments wurden die Kapillaren mit dem Gel gefüllt. Hierzu wurde das Gel in eine Einmalspritze mit einem Volumen von 10 ml aufgezogen. Die Einmalspritze wurde mit einem Zitzenhütchen (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) versehen. Mittels der so präparierten Einmalspritze erfolgte die Befüllung. Das eine Ende der Kapillare wurde im Anschluss mittels Verschluss-Kit (Hirschmann, Eberstadt) verschlossen. Die gefüllten Kapillaren wurden sorgfältig aus dem Gel-Gefäß entfernt und auf die Anwesenheit von Luftblasen untersucht. Kapillaren, in die das Gel unter Bildung von Luftblasen gezogen wurde, wurden verworfen.

Das Gel sollte ca. 1 mm aus dem offenen Ende der Kapillare herausragen. Gegebenenfalls wurde vom verschlossenen Ende her etwas Verschluss-Kit nachgegeben, um dies zu erreichen.

Das sich in den Kapillaren befindende Gel wurde mittels eines Heiztisches (Minitube, HT 300) auf 37,5 °C angewärmt.

Die so präparierten Kapillaren wurden durch die vorbereiteten Löcher der mit Sperma gefüllten Eppendorfgefäße senkrecht gestellt (Abbildung 1).

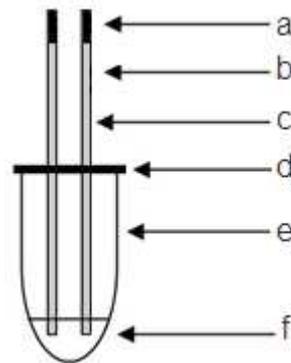


Abbildung 1: Grafik des Versuchsaufbaus nach Positionierung der Kapillaren zur Inkubation

a: Verschluss-Kit

b: Hämatokrit-Kapillare

c: Gelmatrix aus Polyacrylamid

d: mit zwei Öffnungen präparierter Gefäßdeckel zur genauen Positionierung der Kapillaren

e: Eppendorfgefäß

f: 50 µl equines Sperma

Für die Inkubation wurden die Gefäße sofort in einen auf 37,5 °C temperierten Wärmeschrank (UNB 200, Fa. Memmert, Schwabach) gestellt. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten.

Nach Ablauf dieser Zeitspanne wurden die Kapillaren sofort aus den mit Sperma gefüllten Gefäßen entfernt und auf Laderampen für TG- Sperma (Fa. Minitube, Tiefenbach) platziert. Diese wurden bei -20 °C in einem Tiefgefrierschrank gelagert, um einen Abbruch der Spermienvorwärtsbeweglichkeit zu bewirken. Die Zeitspannen der Tiefgefrierkühlung zur Immobilisation der Spermien durch Abtötung betragen 5, 10, 15 oder 20 Minuten. Die Vorversuche zeigten, dass mit einer Zeitspanne von 10

Minuten die geeignetsten Ergebnisse erzielt werden konnten. Aufgrund dessen wurde für die weiteren Versuche die Zeitspanne von 10 Minuten festgelegt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Kapillaren unter einem Phasenkontrastmikroskop (Leica CM E, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) betrachtet, um die Beurteilung vorzunehmen.

### 3.2.5 Auswertung

Zur Auswertung des Experiments wurden die Kapillaren im Anschluss an die Tiefgefrierkühlung auf einen Objektträger (IDL, Nidderau) platziert. Dieser wurde zuvor mit einer Millimeterskala versehen. Die Kapillare wurde parallel zur Skala gelegt, wobei das offene Ende sich an der Nullmarke befand (Abbildung 2).

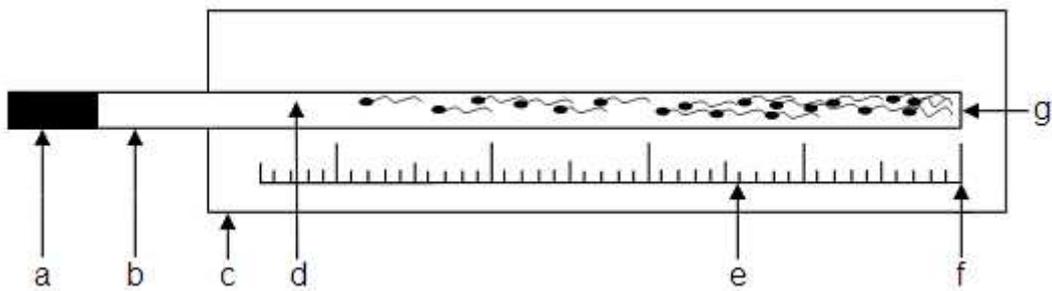


Abbildung 2: Anordnung einer Kapillare nach erfolgter Inkubation zur Messung der Spermienmigration unter einem Phasenkontrastmikroskop

- a: Verschluss-Kit
- b: Hämatokrit-Kapillare
- c: Objektträger
- d: Gelmatrix aus Polyacrylamid nach Inkubation
- e: Messskala in Millimeter
- f: Nullmarke der Messskala
- g: offenes Ende der präparierten Kapillare

Die Betrachtung der Spermien im Gel innerhalb der Kapillare erfolgte mit einem Lichtmikroskop mit Phasenkontrast (Leica CM E, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) bei einer 200fachen Vergrößerung.

Jede Kapillare wurde vom offenen Ende ausgehend bis hin zum vordersten Spermium durchmustert. Die Strecke, die das vorderste Spermium und die vordersten fünf Spermien zurückgelegt hat bzw. haben, wurde mit Hilfe der Skala ermittelt und schriftlich festgehalten. Die Daten wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst.

### **3.2.6 Bestimmung der Parameter der klassischen Samenanalyse**

#### **3.2.6.1 Ermittlung des Prozentanteils lebender Spermien**

Um den prozentualen Anteil lebender Spermien zu ermitteln, wurden jeweils einem Tropfen von jeder Spermienportion zwei Tropfen Eosin Farbstoff beigemischt. Die Beimischung erfolgte schonend auf einem angewärmten Objektträger (IDL GmbH, Nidderau). Mittels eines zweiten angewärmten Objektträgers wurde ein Tropfen des Gemisches ausgestrichen. Nach Trocknung wurde der Ausstrich unter einem Lichtmikroskop (Leica DMR, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) betrachtet. Zur Ermittlung des prozentualen Anteils lebender Spermien wurden hierbei 200 Spermien ausgezählt. Die ausgezählten Samenzellen wurden nach ihrer Färbung klassifiziert, wobei gefärbt als tot und ungefärbt als lebend gewertet wurde. Aus dieser Auszählung wurde der Prozentsatz lebender Spermien ermittelt.

#### **3.2.6.2 Computergestützte Spermaanlyse**

Die Dichte und die Motilitätsparameter wurden mit dem computerassoziierten Spermaanlysesystem „SpermVision™“ (Fa. Minitube Tiefenbach) ermittelt. „SpermVision™“ setzt sich aus einem Phasenkontrastmikroskop (Olympus BX41) mit einer Hochgeschwindigkeits-Schwarz-Weiß-Kamera in Verbindung mit einem PC mit Pentium® 4 Prozessor bei 2 GHz und der CASA-Software (CASA: computer-associated sperm analysis – computerassoziierte Spermaanlyse) zusammen.

Zur Analyse kommen spezielle Messkammern (20 Mikron, Fa. Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande) zum Einsatz. Eine Darstellung einer dieser Messkammern ist Abbildung 3 zu entnehmen. In diesen Messkammern befinden sich Mulden, die zur Befüllung mit Sperma vorgesehen sind. Die Befüllung erfolgt mit 2 µl Sperma, welches mittels einer Pipette („pipet-lite“, Rainin Instrument, Oakland, USA) in einem Zug unter Vermeidung von Luftblasen die Mulde gegeben wird. Mit einer Schichtdicke von 20

µm kann die Messkammer ein bestimmtes Volumen aufnehmen, anhand dessen die Analyse durchgeführt wird. In einem Durchgang werden 400 Spermien ausgewertet. Diese Anzahl umfasst 5 bis 7 Messfelder, wobei ein Messfeld einem Gesichtsfeld entspricht. Gemessen wird auf einer Längsachse und die verjüngten Kammerbereiche werden vermieden, so wie es der Hersteller empfiehlt. Eine Messung dauert 15 Sekunden. Aus den Daten in den verschiedenen Messfeldern errechnet das System die Durchschnittswerte, die als Gesamtergebnis angegeben werden.

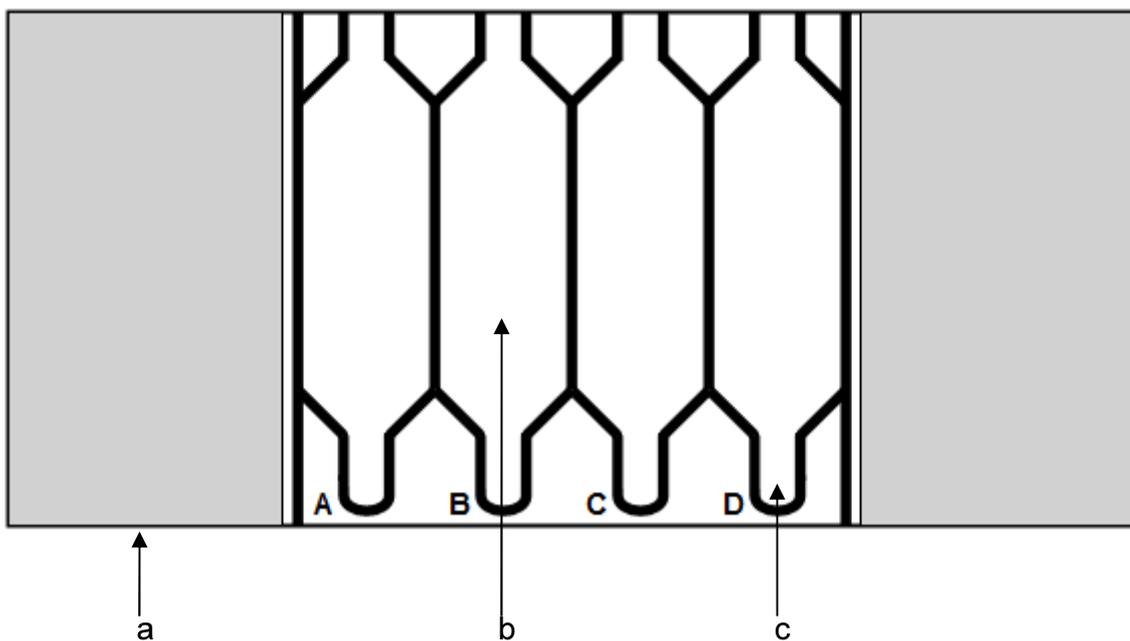


Abbildung 3: Grafik einer Leja-Messkammer; Verwendung im CASA-System zur Messung der Motilitätsparameter und der Spermiedichte

a: Leja-Messkammer

b: einzelne Messkammer, beinhaltet 7 Messfelder

c: Vertiefungen zur Befüllung

Um die Analyse zu optimieren wird innerhalb der Programmeinstellung festgelegt, welche Größe eine Zelle im Minimum und Maximum haben darf, um als Spermium gezählt zu werden.

Die Bewertung der Motilität erfolgt im Einzelnen anhand verschiedener Beweglichkeitsparameter (Tabelle 2), die grundsätzlich in zwei Stufen unterteilt werden.

- Stufe 1: unbeweglich, lokal-motil, progressiv-motil  
 Stufe 2: hyperaktiv, linear, nicht-linear, kurvig-linear

Aus der Gesamtheit dieser Parameter ergeben sich die Motilität und die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien. Bei der Motilität wird der prozentuale Anteil aller beweglichen Spermien berechnet. Die Vorwärtsbeweglichkeit gibt dagegen den Prozentanteil der Spermien mit einer vorwärts gerichteten Bewegung an. Das Programm erfasst die Parameter aus den Gesichtsfeldern und stellt sie für den Benutzer am Monitor sichtbar tabellarisch dar. Darüber hinaus erscheinen auf dem Monitor die Gesichtsfelder, die durch negatives Phasenkontrastverfahren dargestellt werden. Durch Farbvarianten werden die unterschiedlichen Bewegungsmuster der Spermien abgebildet und angezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Parameter der computerassoziierten Spermaanalyse verwendet:

- Dichte
- Motilität (MOT)
- Vorwärtsbeweglichkeit (PMS)

Tabelle 2: Beweglichkeitsparameter der computerassoziierten Samenanalyse

DCL	Kurvenstrecke
DAP	Durchschnittsstrecke
DSL	Geradlinige Strecke
VCL	Geschwindigkeit auf Kurvenstrecke
VAP	Durchschnittsgeschwindigkeit
VSL	Geschwindigkeit auf gradliniger Strecke
LIN	Linearität (VSL/VCL)
STR	Geradlinigkeit (VSL/VAP)
WOB	Schwankung (VAP/VCL)
BCF	Peitschfrequenz des Spermischwanzes
ALH	Amplitude der seitlichen Kopfbewegung
AOH	Durchschnittlicher Orientierungswechsel des Kopfes
Radius	Radial Koeffizient der von Spermien durchlaufenen Strecke
MOT	Gesamtmotilität
PMS	Vorwärtsbeweglichkeit

### 3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch die AG Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität, Gießen mit der Software BMDP (Fa. Statistical Solutions, Saugus, MA/ USA).

Die Vorversuche zur Auswahl des geeigneten Mediums zum Einfluss der Fruktose im Polyacrylamid-Gel wurden mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet. Hierbei wurde die Penetrationsstrecke als abhängige Variable und das Vorhandensein von Fruktose im Medium  $f \in \{0,1\}$  und der Hengst  $h \in \{1,2\}$  als freie Parameter betrachtet. Es wurde eine Gesamtheit von 102 unabhängigen Ergebnissen aus 51 Versuchen verwendet.

Bei der Auswertung der Hauptversuche wurde zunächst die Streuung der Ergebnisse, d.h. der Penetrationsstrecken durch eine dreifaktorielle hierarchische Varianzanalyse untersucht. Hierbei wurden die Einflussfaktoren Ejakulat, Ansatz und Wiederholung der Messungen als unabhängige Streuungsursachen angesehen. Ihre Anteile zur Streuung, deren Größe in dieser Arbeit als Standardabweichung des Mittelwertes angegeben wird, wurden berechnet und als anteilige Standardabweichungen angegeben. Die beiden eingesetzten Hengste wurden hierbei einzeln betrachtet.

Des Weiteren wurde die Häufigkeitsverteilung für die Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums und der vordersten fünf Spermien unabhängig voneinander über die Gesamtheit aller Hauptversuche ( $n = 365$ ) aufgetragen.

Die Einzelkorrelationen zwischen den Penetrationsstrecken des vordersten Spermiums und der vordersten fünf Spermien mit den klassischen spermatologischen Parametern Dichte, Motilität, Vorwärtsbeweglichkeit und Anteil lebender Spermien wurden mittels linearer Regressionsanalysen getestet. Hierbei und bei den folgenden Auswertungen erfolgte eine Mittelung der gemessenen Penetrationsstrecken von beiden Ansätzen jedes Versuches. Wertepaare, in denen mindestens ein Ansatz den Wert 0 ergab, blieben unberücksichtigt ( $n = 170$ ).

Weiterhin wurde der simultane Einfluss der Parameter mit einer multiplen Regressionsanalyse berechnet.

Korrelationen zwischen den klassischen, spermatologischen Parametern wurden ebenfalls mit linearen Regressionsanalysen analysiert.

Bei der Bewertung der Korrelationen wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt, sodass statistischen Signifikanzen mit einem p-Wert  $\leq 0,05$  anerkannt wurden.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Vorversuche**

#### **4.1.1 Auswahlverfahren des Gels**

Im Rahmen der Vorversuche wurden insgesamt neun Gele auf Polyacrylamid-Basis hergestellt und auf ihre Eignung hinsichtlich des Penetrationstest geprüft. Dabei wurde deutlich, dass die einzelnen Gele Unterschiede in ihrer Reproduzierbarkeit sowie in ihrer Anwendbarkeit zeigten.

##### **4.1.1.1 Reproduzierbarkeit der Gele**

Bei der Herstellung des 2%igen Polyacrylamid-Gels und des 1,9%igen Polyacrylamid-Gels ergaben sich Komplikationen in der Polymerisation. Unabhängig vom jeweils verwendeten Puffer (T18, T23, PBS) kam es im Verlauf des Herstellungsprozesses zu Phasenbildung. Dabei bildeten die Gele zwei Phasen: eine Phase von höherer Viskosität, die andere von flüssiger Konsistenz. Nach dem Entstehen der Phasen war es nicht möglich ein homogenes Gel herzustellen. Das Entstehen der Phasen wurde mittels Einsatz eines Taumelschüttlers nach der Ansetzung des Gels verhindert. Die Ergebnisse der Vorversuche hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Gele wurden in Tabelle 3 zusammengefasst.

Eine unvollständige Polymerisation des Gels konnte bei der Herstellung des 1,5%igen Polyacrylamid-Gels mit Fruktose sowie des 1,8%igen Polyacrylamid-Gels mit und ohne Fruktose nicht beobachtet werden.

Tabelle 3: Reproduzierbarkeit Gele; bei den Gelen mit den Polyacrylamid-Konzentrationen 1,9% und 2,0% wurde keine zuverlässige Reproduzierbarkeit (100 %) erreicht. Hierbei wurden die verschiedenen Gele nach ihrer Polyacrylamid-Konzentration zusammengefasst ohne Berücksichtigung der Puffer/ Zusätze.

<b>Polyacrylamid-Konzentrationen (%)</b>	<b>Anzahl hergestellte Gele</b>	<b>Anzahl polymerisierter Gele</b>	<b>Anteil polymerisierter Gele (%)</b>
1,9	66	8	12,1
2,0	51	12	23,5
1,8 mit Fruktose	6	6	100
1,8 ohne Fruktose	5	5	100
1,5 mit Fruktose	5	5	100

#### **4.1.1.2 Eignung der Gele**

Im Verlauf der Vorversuche trat bei der Herstellung des 2%igen Polyacrylamid-Gels sowie des 1,9%igen Polyacrylamid-Gels die Komplikation auf, dass sich in dem synthetischen Medium Luftblasen bildeten. Die Luftblasen entstanden durch intensives Vermengen der einzelnen Bestandteile mittels Taumelschüttler. Dieser Schritt in der Herstellung war notwendig, um eine vollständige Polymerisation des Gels zu gewährleisten.

Luftblasen innerhalb des Gels verhinderten die Penetration der Spermien. Aus diesem Grund war es notwendig, die Bildung der Luftblasen zu vermeiden bzw. so gering wie möglich zu halten. Dies wurde erreicht, indem die Lagerung der betreffenden Gele (2%iges Polyacrylamid-Gel, 1,9%iges Polyacrylamid-Gel) unter Ausschluss von Luft erfolgte. Es kamen 20-ml-Flaschen mit festem Schraubverschluss zum Einsatz.

Die Komplikation der Luftblasenbildung trat bei der Herstellung der Gele:

- 1,5% iges Polyacrylamid-Gel mit Fruktose
- 1,8% iges Polyacrylamid-Gel mit Fruktose
- 1,8% iges Polyacrylamid-Gel

nicht auf.

#### 4.1.1.3 Zusammenfassung der Komplikationen bei der Herstellung der Gele

Das Auftreten von Komplikationen bei den verschiedenen Polyacrylamid-Gele ist in der Tabelle 4 dargestellt. Hier wurden die bereits beschriebenen Komplikationen wie Phasenbildung, Einschlüsse von Luft, homogene Befüllbarkeit der Kapillaren sowie die vollständige Polymerisation des jeweiligen Gels aufgeführt.

Tabelle 4: Darstellung des Auftretens von Komplikationen bei den verschiedenen Gelen

Gel		Anzahl Ansätze	Nutzbare Gele	Phasenbildung	Luft einschlüsse	homogene Befüllung der Kapillare
Polyacrylamid-Konzentration (%)	Puffer/Zusatz					
2,0	T18	17	5	8	4	möglich
2,0	T23	17	3	11	3	möglich
2,0	PBS	17	4	6	7	möglich
1,9	T18	40	5	16	19	möglich
1,9	T23	16	1	7	8	möglich
1,9	PBS	10	2	3	5	möglich
1,8	mit Fruktose	6	6	0	0	möglich
1,8	ohne Fruktose	5	5	0	0	möglich
1,5	mit Fruktose	5	5	0	0	erschwert

Das 1,5%ige Polyacrylamid-Gel zog sich aufgrund der Viskosität langfädig in die Kapillare hinein, sodass eine Erstellung einer homogenen Gel-Matrix erschwert wurde.

Aufgrund dieser Ergebnisse kamen die 2%igen Polyacrylamid-Gele, die 1,9%igen Polyacrylamid-Gele sowie das 1,5%ige Polyacrylamid-Gel in den Hauptversuchen nicht zum Einsatz.

#### 4.1.1.4 Einfluss der Fruktose im Medium auf die Penetrationsstrecke

Die Auswertung der Versuchsreihen mit den Medien 1,8%iges Polyacrylamid-Gel mit bzw. ohne Fruktose ist in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt. Die Anzahl der Proben der jeweiligen Untergruppen ist den Angaben in den Diagrammsäulen zu entnehmen. Die Varianzanalyse ergab einen nicht signifikanten Einfluss des Tieres

( $p = 0,24$ ) auf die Penetrationsstrecke. Die Fruktose im Medium führte zu einem signifikanten Anstieg ( $p = 0,034$ ) der mittleren Penetrationsstrecke um 24 %. Die Wechselwirkung zwischen Tier und Fruktose hat sich als nicht signifikant ( $p = 0,15$ ) herausgestellt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die Hauptversuche mit fruktosehaltigem Medium durchgeführt.

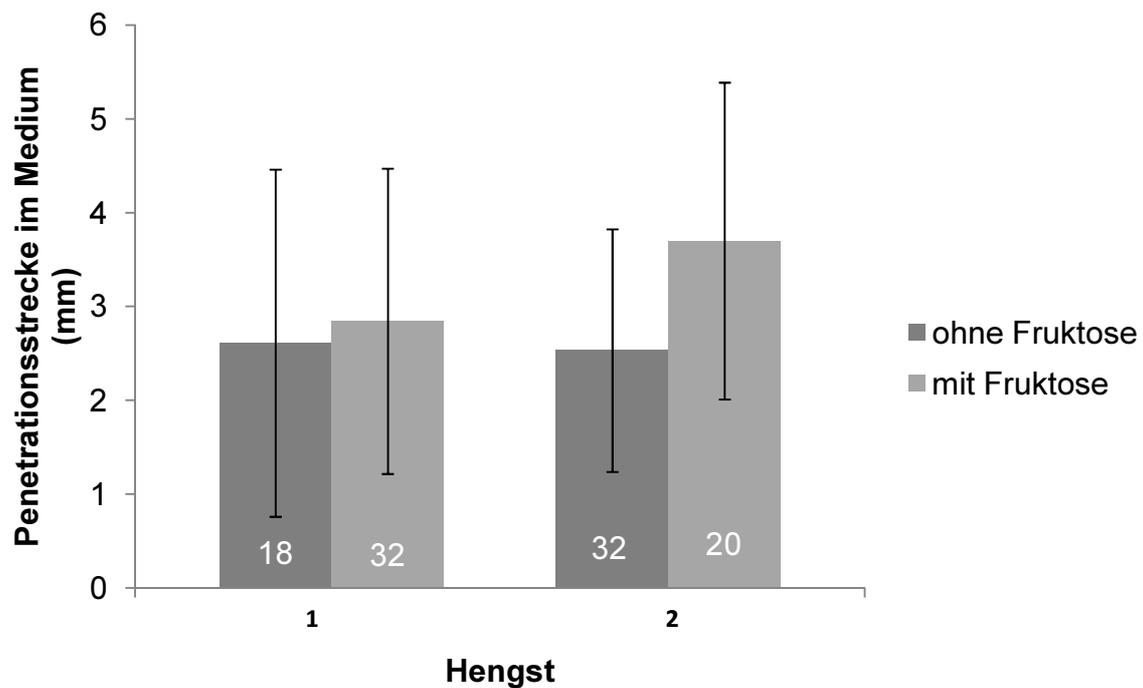


Abbildung 4: Darstellung der Mittelwerte der Penetrationsstrecken und ihrer jeweiliger Standardabweichung mit und ohne Fruktosezusatz im Medium für beide Hengste; die Zahlen innerhalb der Diagrammsäulen geben die Anzahl der Proben an. Die Zugabe von Fruktose führte bei beiden Hengsten zu einer Erhöhung der Penetrationsstrecke ( $p = 0,034$ ).

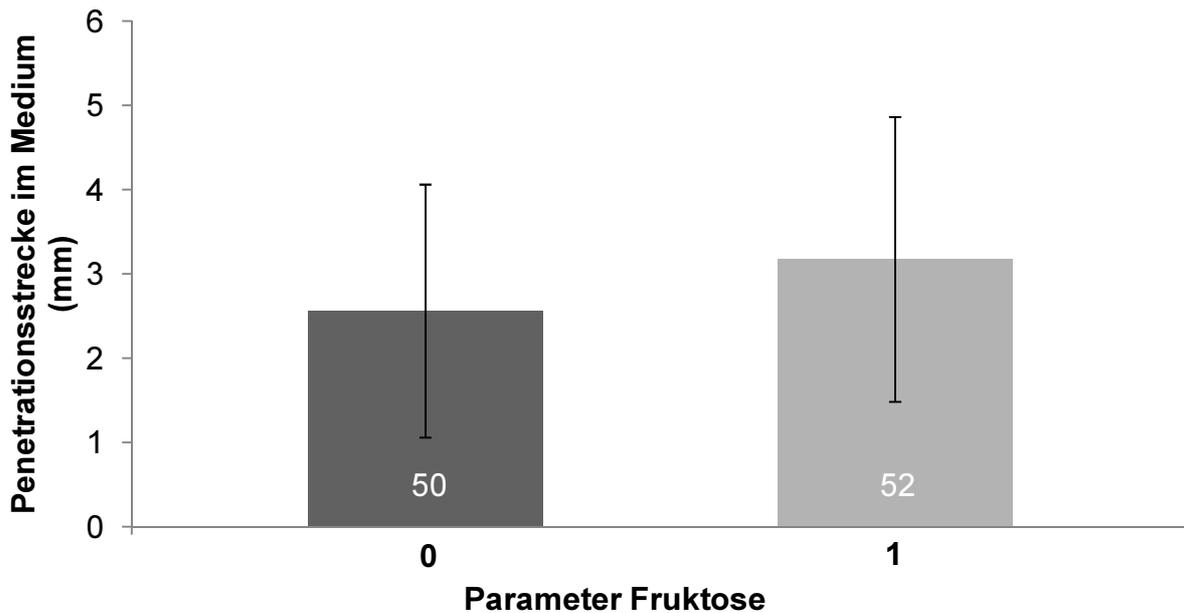


Abbildung 5: Darstellung der Penetrationsstrecke mit jeweiliger Standardabweichung für 1,8%iges Polyacrylamid-Gel mit (1) und ohne (0) Fruktosezusatz. Die Anzahl der Proben ist innerhalb der Diagrammsäulen angegeben.

#### 4.1.2 Auswahl der Pipetten / Kapillaren

Es wurden drei unterschiedliche Pipetten / Kapillaren getestet. Wesentlich für den Einsatz in den Versuchen waren hierbei eine problemlose Befüllung der Kapillaren / Pipetten mit dem jeweiligen Gel sowie die Gewährung einer einwandfreien Auswertung der Penetrationsstrecke der Spermien im Mikroskop. Bei der Befüllung schnitten die Wiretrol® II Mikropipetten am besten ab. Der synthetische Mukus ließ sich mit der Pipettierhilfe ohne Schwierigkeiten in die Mikropipetten einfüllen. Dagegen erwies sich die Befüllung der Hämatokrit-Kapillaren und der Ringmarken-Pipetten aufgrund ihres geringen Durchmessers als diffiziler. Die Ringmarken-Pipetten waren mit einem Durchmesser von 0,8 mm deutlich schwieriger zu befüllen als die Hämatokrit-Kapillaren mit einem 1,0 mm Durchmesser. Während bei den Hämatokrit-Kapillaren und den Ringmarken-Pipetten keine Veränderung der Gelmatrix im Verlauf des Versuches festzustellen war, konnten bei den Wiretrol® II Mikropipetten nach der Inkubationszeit Einschlüsse von Luftblasen in die Gelmatrix beobachtet werden. Derartige Veränderungen konnten in 43,8% der Versuche mit diesen Pipetten nachgewiesen werden. Desweiteren eigneten sie sich nicht zur

Durchmusterung im Mikroskop. Die Spermien innerhalb des Gels konnten unter Verwendung der Wiretrol® II Mikropipetten aufgrund der Tiefe dieser Pipetten im Mikroskop nicht erkannt werden. Diese Schwierigkeiten konnten weder bei den Hämatokrit-Kapillaren noch bei den Ringmarken-Pipetten beobachtet werden.

Schwierigkeiten in der Befüllung mit den jeweiligen Polyacrylamid-Gelen sowie in der Auswertung der Penetrationsstrecke der Spermien wurden in der Tabelle 5 zusammengefasst. Zum Einsatz in den Versuchen kamen die Hämatokrit-Kapillaren aufgrund dieser Ergebnisse.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Testung der Kapillaren / Pipetten

<b>Kapillare/ Pipette</b>	<b>Auftreten von Problemen in der Befüllung</b>	<b>Auftreten von Problemen während/ nach Inkubation</b>	<b>Auswertbarkeit der Penetrationsstrecke im Mikroskop</b>
Hämatokrit- Kapillaren	keine	keine	ja
Ringmarken Pipetten	erschwert	keine	ja
Wiretrol® II	keine	Luftblasenbildung in Gelmatrix	nein

#### **4.1.3 Festlegung der Gefrierzeit/ Abbruch des Penetrationsversuchs**

In den Versuchen (Kap. 3.2.4) wurde festgestellt, dass bei längerer Lagerung der Kapillaren bei einer Temperatur von -20°C die Gelmatrix einfriert und es zur Bildung von Luftblasen kommt. Diese Veränderung machte eine Auswertung der Penetrationsstrecke der Spermien innerhalb der Gelmatrix unmöglich. Aus diesem Grund wurde in einer Versuchsreihe die Zeitspanne ermittelt, in der die Spermien durch Abtötung immobilisiert werden, aber es zu keiner Beeinflussung der Gelmatrix durch Kühlung kommt, sodass eine Auswertung möglich ist.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche wurde die Gefrierzeit in den Hauptversuchen auf 10 Minuten festgelegt.

Tabelle 6: Ermittlung der Lagerungszeit bei -20°C zur vollständigen Immobilisation durch Abtötung der Spermien unter Vermeidung von Gefrierschäden an der Gelmatrix

<b>Minuten</b>	<b>Anzahl der Wiederholungen</b>	<b>Nachweis beweglicher Spermien</b>	<b>Auftreten von Gefrierschäden im Gel</b>
5	8	50%	0%
10	12	0%	0%
15	12	0%	16,6%
20	8	0%	50%

## **4.2 Hauptversuche**

### **4.2.1 Bestimmung der Streuungsursachen der Penetrationsstrecke**

Zur Ermittlung von Korrelationen zwischen den Parametern der klassischen Samenanalyse und des Penetrationstests wurden die Varianzkomponenten einzeln bestimmt. Hierbei wurde der Mittelwert der Penetrationsstrecke von 7,7 mm ermittelt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten des jeweils vordersten Spermiums und denen der vordersten fünf Spermien. Ausgewertet wurde die Streuung innerhalb eines gleichen Versuchsansatzes. Dabei konnten bei Betrachtung der Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums (Tabelle 7) bzw. der vordersten fünf Spermien (Tabelle 8) festgestellt werden, dass bei den Wiederholungen die größte Streuung zu finden ist.

Tabelle 7: Anteilige Standardabweichungen der verschiedenen Streuungsursachen bei Betrachtung des vordersten Spermiums; die Ansätze und Ejakulate trugen geringfügig zur Streuung bei, die stärkste Streuungsursache bestand in den Wiederholungen der gleichen Messung (inhärente Streuung).

Streuungsursache	Anzahl	Hengst	
		1	2
Ejakulat	6	1,12 mm	1,18 mm
Ansatz	13	0 mm	0,43 mm
Wiederholungsmessung	2	1,78 mm	2,5 mm

Tabelle 8: Anteilige Standardabweichung bei Betrachtung der vordersten fünf Spermien; die stärkste Streuung ist zwischen den Wiederholungen der gleichen Messung zu finden. Die Ansätze und Ejakulate trugen nur geringfügig zur Streuung bei.

Streuungsursache	Anzahl	Hengst	
		1	2
Ejakulat	6	1,11 mm	1,18 mm
Ansatz	13	0 mm	0,43 mm
Wiederholungsmessung	2	1,77 mm	2,5 mm

#### 4.2.2 Penetrationsstrecken

Statistisch wurde der Unterschied zwischen den Messungen der Penetrationsstrecken des vordersten Spermiums und der vordersten fünf Spermien erfasst. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Messungen (mittlere Differenz: < 0,02 mm). Es wurde ebenfalls eine Häufigkeitsverteilung (Histogramm) über die gemessenen Penetrationsstrecken erstellt. Dabei wurde ein Mittelwert von 7,7 mm mit einer Standardabweichung von 2,7 mm ermittelt (Abbildung 6).

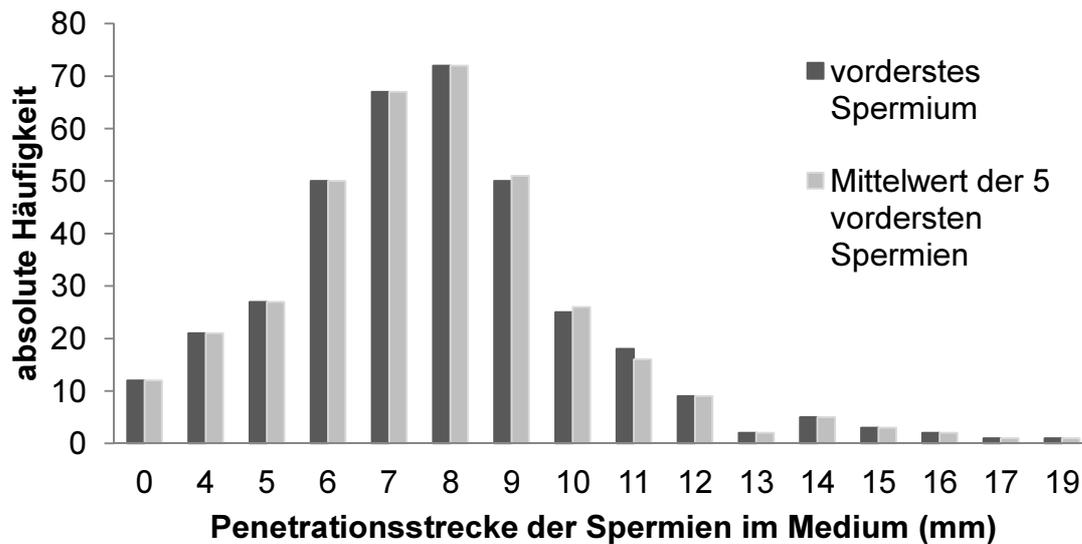


Abbildung 6: Histogramm der Penetrationsstrecke für das jeweils vorderste Spermium bzw. des Mittelwertes der vordersten fünf Spermien; die Werte der Penetrationsstrecke sind annähernd normalverteilt um den Mittelwert 7,7 mm (Standardabweichung: 2,7 mm)

#### 4.2.3 Regressionsanalyse

##### 4.2.3.1 Penetrationsstrecke versus Dichte

Die Regressionsanalysen des Zusammenhangs zwischen der Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums (Abbildung 7) bzw. der vordersten fünf Spermien (Abbildung 8) und der Dichte ergaben jeweils eine Signifikanz von  $p < 0,001$ . Für das vorderste Spermium beträgt der Regressionskoeffizient  $r = -0,293$ . Der Regressionskoeffizient der vordersten fünf Spermien liegt bei  $r = -0,296$ . Dies zeigt, dass eine negative Korrelation zwischen der Penetrationsstrecke und der Dichte vorliegt.

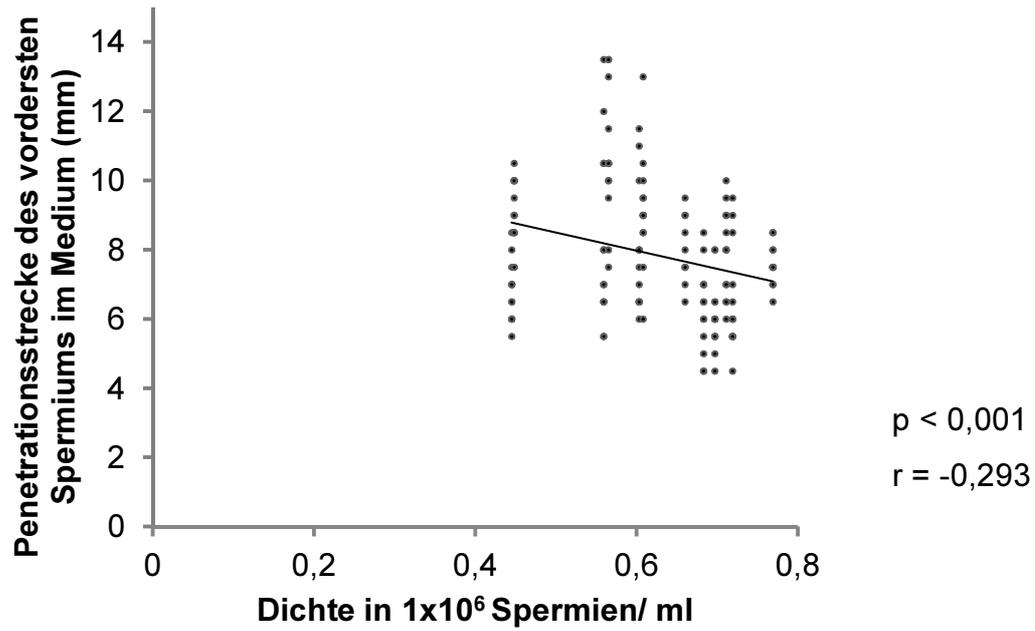


Abbildung 7: Korrelationsdiagramm zwischen Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums und der Dichte; es zeigt sich eine statistisch signifikante negative Korrelation. Die Streuung der Werte um die Regressionsgerade ist hoch ( $n = 170$ ).

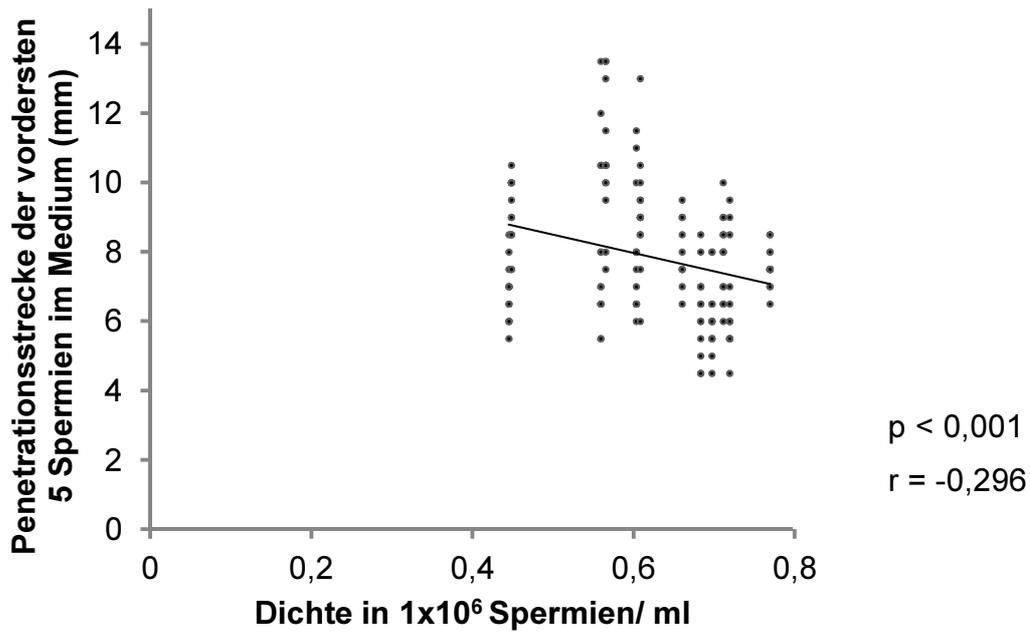


Abbildung 8: Korrelationsdiagramm zwischen Penetrationsstrecke der vordersten fünf Spermien und der Dichte; die negative Korrelation ist statistisch signifikant. Die Werte streuen stark um die Regressionsgerade (n = 170).

#### 4.2.3.2 Penetrationsstrecke versus Motilität

Die Ergebnisse der Regressionsanalyse zwischen der Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums (Abbildung 9) bzw. der vordersten fünf Spermien (Abbildung 10) waren signifikant ( $p = 0,009$  bzw.  $p = 0,008$ ). Die Werte des Regressionskoeffizienten ( $r = 0,201$  bzw.  $0,202$ ) belegen eine positive Korrelation zwischen der Penetrationsstrecke und der Motilität.

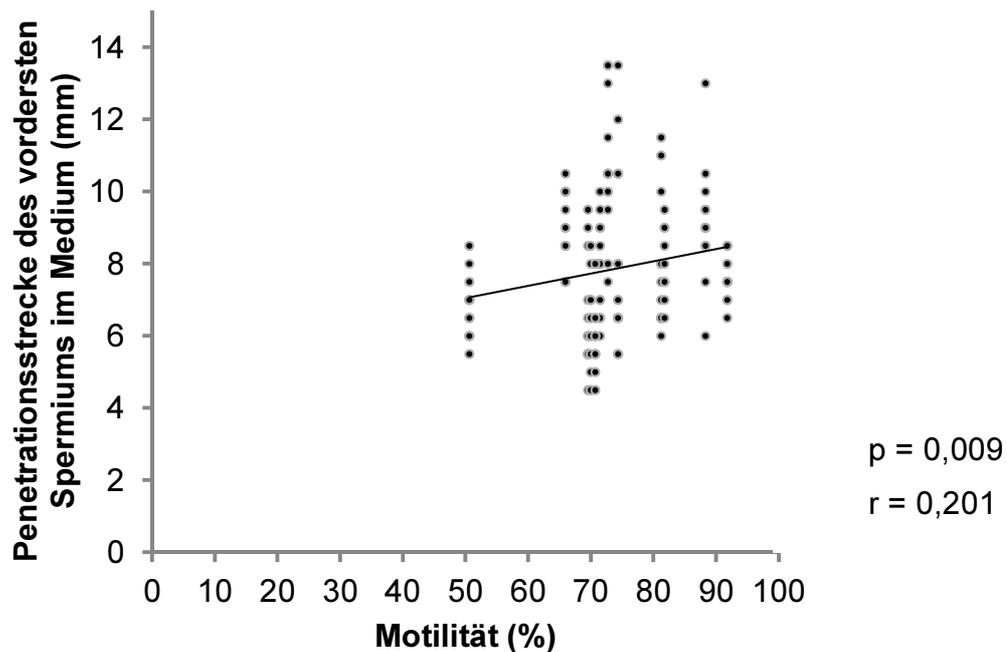


Abbildung 9: Korrelationsdiagramm zwischen Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums und der Motilität; die Werte zeigen eine hohe Streuung um die Regressionsgerade. Die Korrelation ist statistisch signifikant und positiv ( $n = 170$ ).

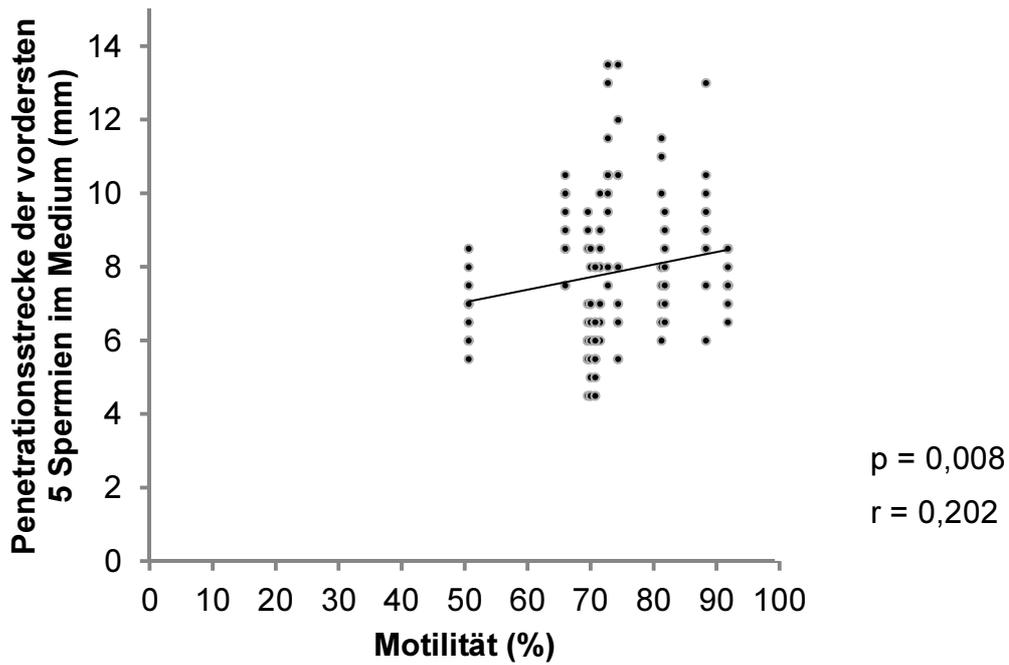


Abbildung 10: Korrelationsdiagramm zwischen Penetrationsstrecke der vordersten fünf Spermien und der Motilität; die Werte zeigen eine positive statistisch signifikante Korrelation. Die Streuung der Werte um die Regressionsgerade ist hoch (n = 170).

#### 4.2.3.3 Penetrationsstrecke versus Vorwärtsbeweglichkeit

Die statistische Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums (Abbildung 11) bzw. der vordersten fünf Spermien (Abbildung 12) und der Vorwärtsbeweglichkeit ergab jeweils  $p = 0,003$ . Der Zusammenhang ist daher signifikant. Die Korrelation ist positiv ( $r = 0,224$  bzw.  $r = 0,225$ ).

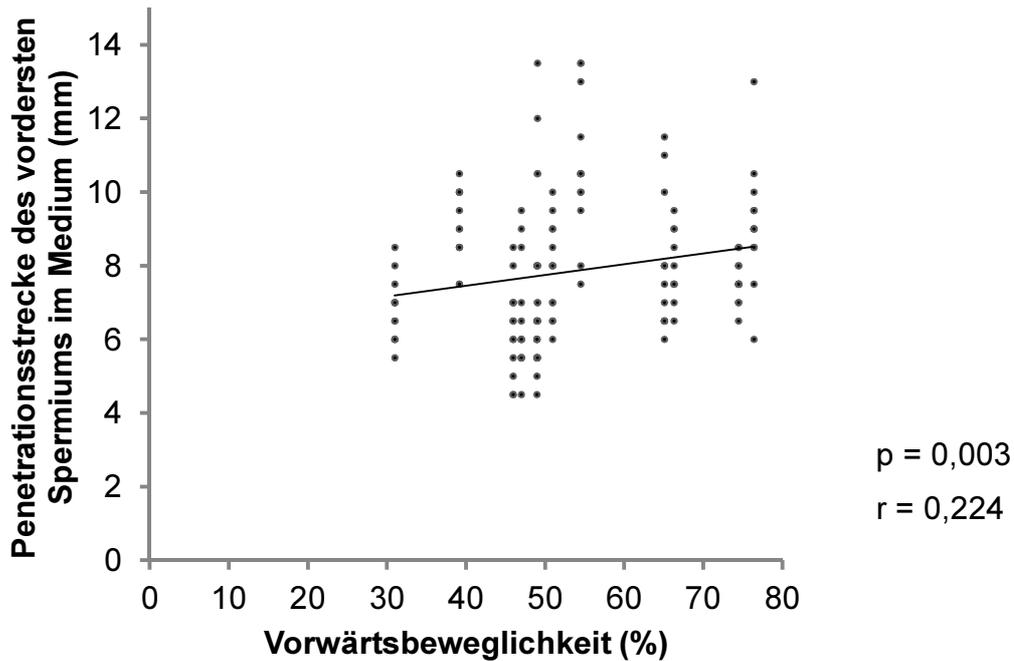


Abbildung 11: Korrelationsdiagramm zwischen Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums und der Vorwärtsbeweglichkeit; es liegt eine hohe Streuung der Werte um die Regressionsgerade vor. Es wurde eine statistisch signifikante positive Korrelation gefunden ( $n = 170$ ).

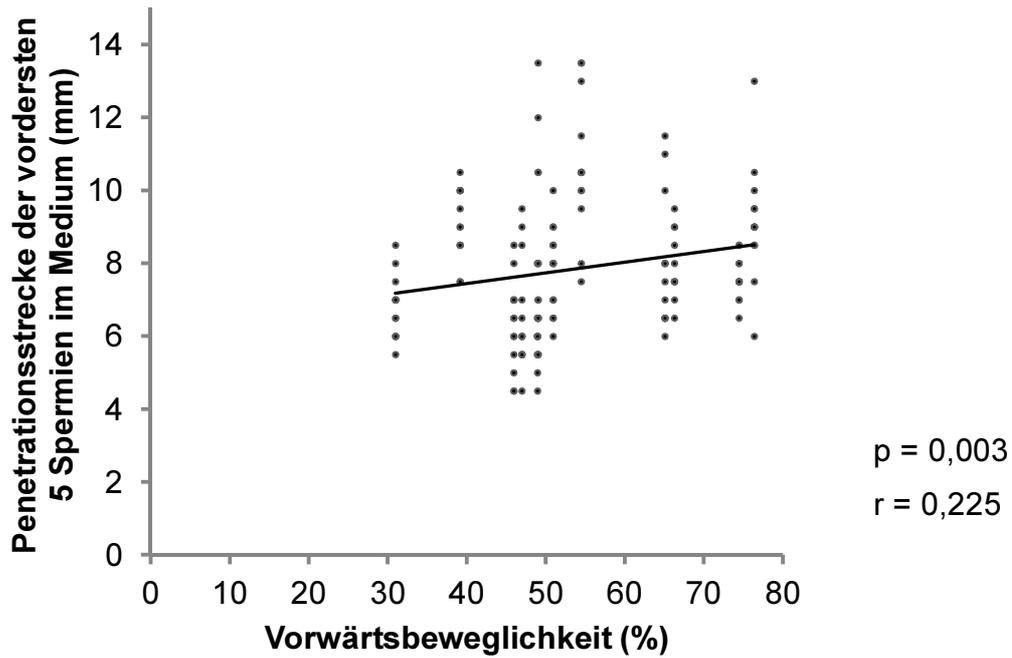


Abbildung 12: Korrelationsdiagramm zwischen Penetrationsstrecke der vordersten fünf Spermien und der Vorwärtsbeweglichkeit; die Werte zeigen eine hohe Streuung um die Regressionsgerade. Es konnte eine statistisch signifikante positive Korrelation ermittelt werden ( $n = 170$ ).

#### 4.2.3.4 Penetrationsstrecke versus Anteil lebende Spermien

Das Ergebnis der Regressionsanalyse zwischen der Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums (Abbildung 13) bzw. der vordersten fünf Spermien (Abbildung 14) und dem Anteil lebender Spermien in Prozent war signifikant ( $p = 0,030$  bzw.  $p = 0,028$ ). Der Korrelationskoeffizient für das vorderste Spermium beträgt  $r = 0,166$ . Für die vordersten fünf Spermien beträgt der Wert des Korrelationskoeffizienten  $r = 0,168$ . Diese Werte belegen, dass zwischen der Penetrationsstrecke und des prozentualen Anteils lebender Spermien eine positive Korrelation besteht.

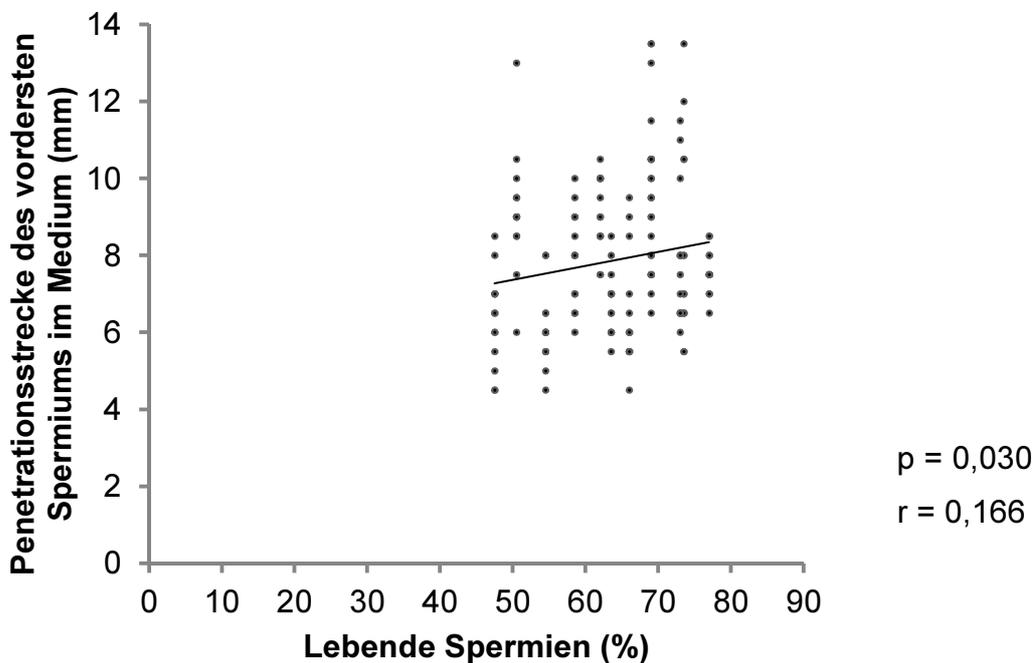


Abbildung 13: Korrelationsdiagramm zwischen Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums und dem Anteil lebender Spermien; die hohe Streuung der Werte um die Regressionsgerade ist dargestellt. Die gefundene positive Korrelation ist statistisch signifikant ( $n = 170$ ).

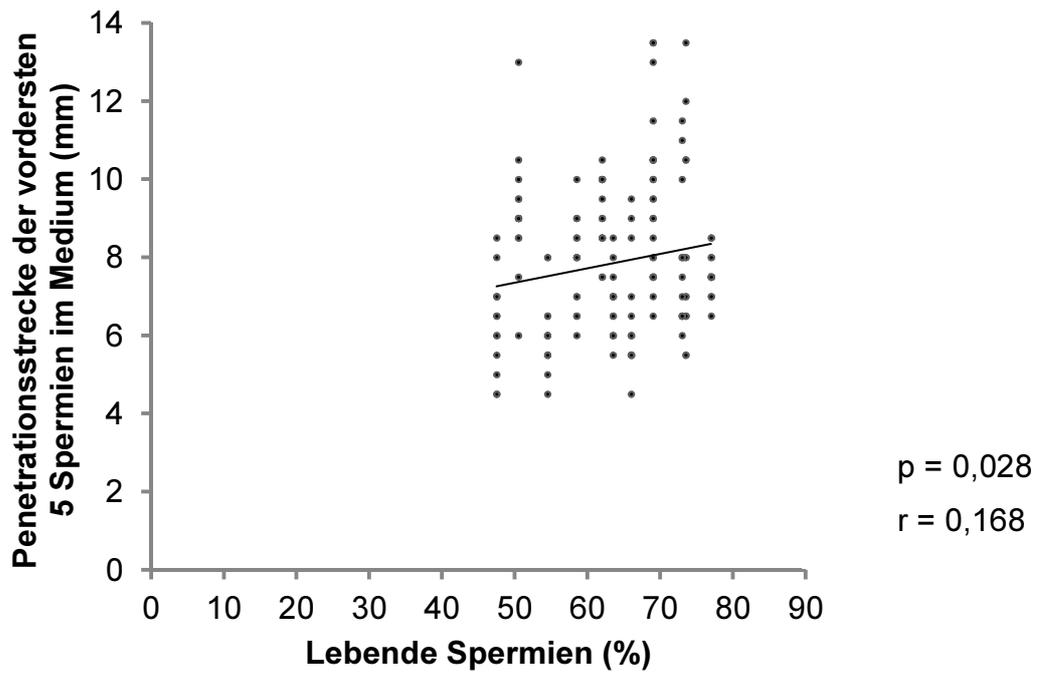


Abbildung 14: Korrelationsdiagramm zwischen Penetrationsstrecke der vordersten fünf Spermien und dem Anteil lebender Spermien; die Werte streuen hoch um die Regressionsgerade. Es konnte eine statistisch signifikante positive Korrelation gefunden werden ( $n = 170$ ).

#### 4.2.4 Gesamteinfluss der Parameter der klassischen Samenanalyse auf die Penetrationsstrecke

Die Korrelation zwischen dem Gesamteinfluss der Parameter der klassischen Samenanalyse und der Penetrationsstrecke wurde statistisch untersucht. Im Rahmen einer multiplen Regressionsanalyse wurde dabei überprüft, in wie weit sich die Parameter der klassischen Samenanalyse gegenseitig auf die Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums bzw. der vordersten fünf Spermien auswirken. Der Einfluss der Dichte auf die Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums bzw. der vordersten fünf Spermien ist signifikant ( $p < 0,0001$ ). Es besteht eine negative Korrelation ( $r = -1,04$ ). Die übrigen Parameter wiesen keinen statistisch signifikanten Einfluss auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Darstellung des Gesamteinflusses der klassischen Beurteilungsparameter auf die Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums bzw. der vordersten fünf Spermien; angegeben sind die standardisierten Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) und die zugehörigen Signifikanzwerte ( $p$ ).

Merkmal	klassische Beurteilungsparameter							
	Dichte		Motilität		Vorwärtsbeweglichkeit		proz. Lebende	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Vorderstes	-1,04	< 0,0001	0,0059	0,25	0,0026	0,49	0,0008	0,59
Vorderste 5	-1,04	< 0,0001	0,0059	0,24	0,0025	0,50	0,0008	0,58

#### 4.2.5 Korrelationsanalyse

Die Korrelation zwischen der Dichte, der Motilität, der Vorwärtsbeweglichkeit und dem Anteil lebender Spermien wurde statistisch ermittelt. Dabei wurden die spermatologischen Untersuchungsparameter als unabhängige Variable gesetzt.

#### 4.2.5.1 Dichte versus Motilität

Die Korrelationsanalyse des Zusammenhangs zwischen der Dichte des Spermas und der Motilität der Spermien (Abbildung 15) ergab eine signifikante Korrelation ( $p < 0,001$ ). Der Korrelationskoeffizient beträgt  $r = 0,549$ . Hieraus leitet sich eine positive Korrelation zwischen der Dichte und der Motilität ab.

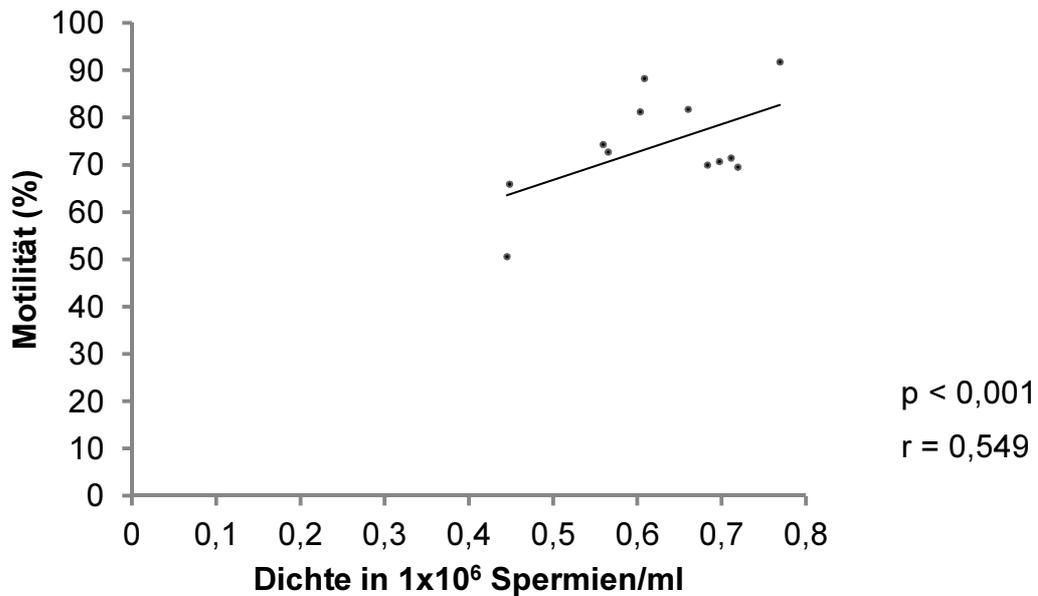


Abbildung 15: Korrelationsdiagramm zwischen den unabhängigen Variablen Dichte und Motilität; die Regressionsgerade zeigt eine positive Steigung, demnach ist die gefundene, statistisch signifikante Korrelation positiv ( $n = 183$ ).

#### 4.2.5.2 Dichte versus Vorwärtsbeweglichkeit

Die Ergebnisse der Berechnung der Korrelation zwischen der Dichte und der Vorwärtsbeweglichkeit wird in Abbildung 16 dargestellt. Der Zusammenhang der beiden unabhängigen Parameter war signifikant ( $p < 0,001$ ). Der Korrelationskoeffizient ( $r = 0,505$ ) gibt an, dass es sich um eine positive Korrelation handelt.

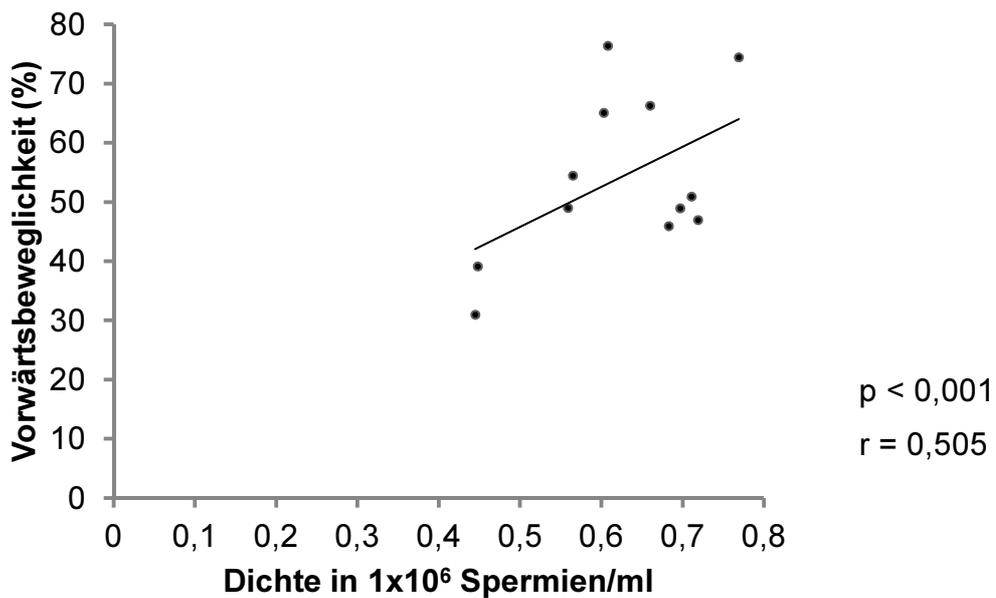


Abbildung 16: Korrelationsdiagramm zwischen den unabhängigen Variablen Dichte und Vorwärtsbeweglichkeit; die Werte streuen um die Regressionsgerade. Es konnte eine positive statistisch signifikante Korrelation gefunden werden ( $n = 183$ ).

#### 4.2.5.3 Dichte versus Anteil lebende Spermien

Die statistischen Auswertung der Korrelation zwischen der Dichte der Spermien und dem prozentualen Anteil lebender Spermien (Abbildung 17) lieferte einen Korrelationskoeffizienten von  $r = -0,051$ . Es besteht kein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,495$ ).

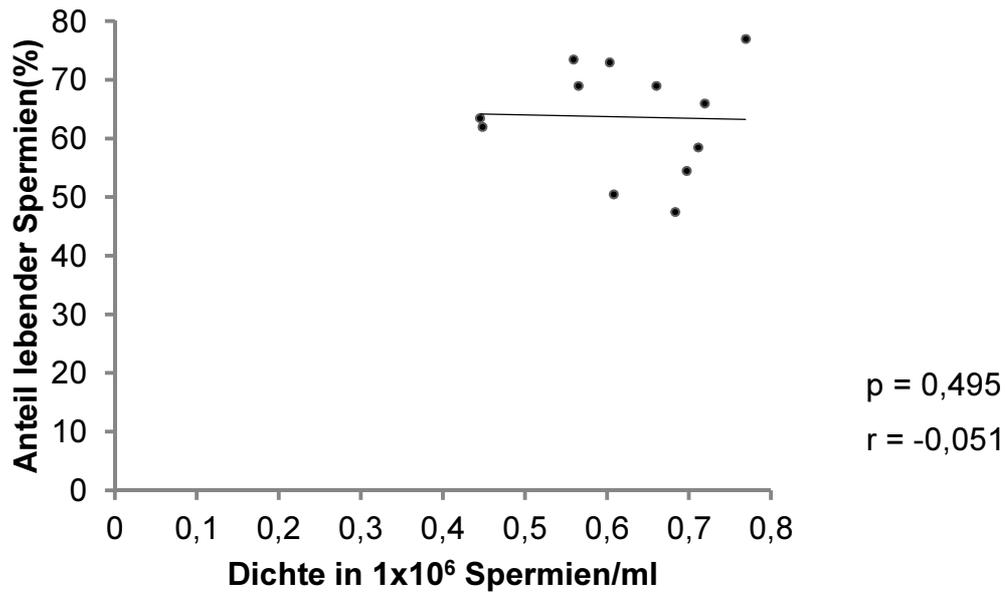


Abbildung 17: Korrelationsdiagramm zwischen den unabhängigen Variablen Dichte und prozentual lebende Spermien; es zeigt sich eine Streuung der Werte um die Regressionsgerade. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt werden ( $n = 183$ ).

#### 4.2.5.4 Motilität versus Vorwärtsbeweglichkeit

Die Korrelationsanalyse zwischen der Motilität und der Vorwärtsbeweglichkeit ergab eine Signifikanz ( $p < 0,001$ ). Die Korrelation ist positiv ( $r = 0,965$ ). Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 zusammengefasst.

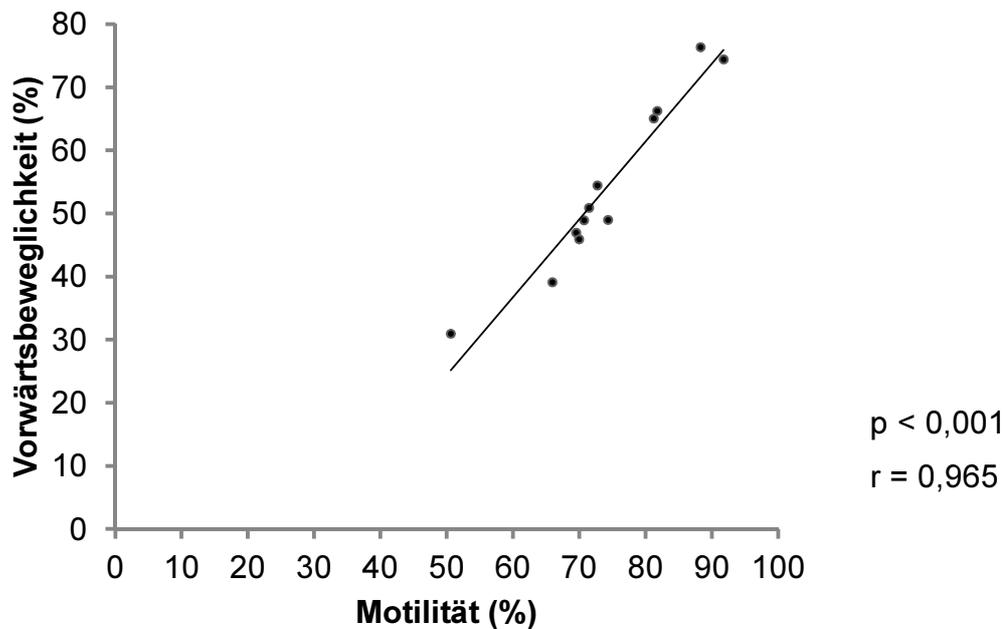


Abbildung 18: Korrelationsdiagramm zwischen den unabhängigen Variablen Motilität und Vorwärtsbeweglichkeit; die Werte liegen nah an der Regressionsgeraden, die eine starke, positive Steigung aufweist. Es liegt eine statistisch signifikante Korrelation vor ( $n = 183$ ).

#### 4.2.5.5 Motilität versus Anteil lebende Spermien

Der Zusammenhang zwischen der Spermienmotilität und dem prozentualen Anteil lebender Spermien wurde statistisch ermittelt und in Abbildung 19 dargestellt. Das Ergebnis ist signifikant ( $p = 0,006$ ). Der Korrelationskoeffizient beträgt  $r = 0,203$ . Die Korrelation ist daher positiv.

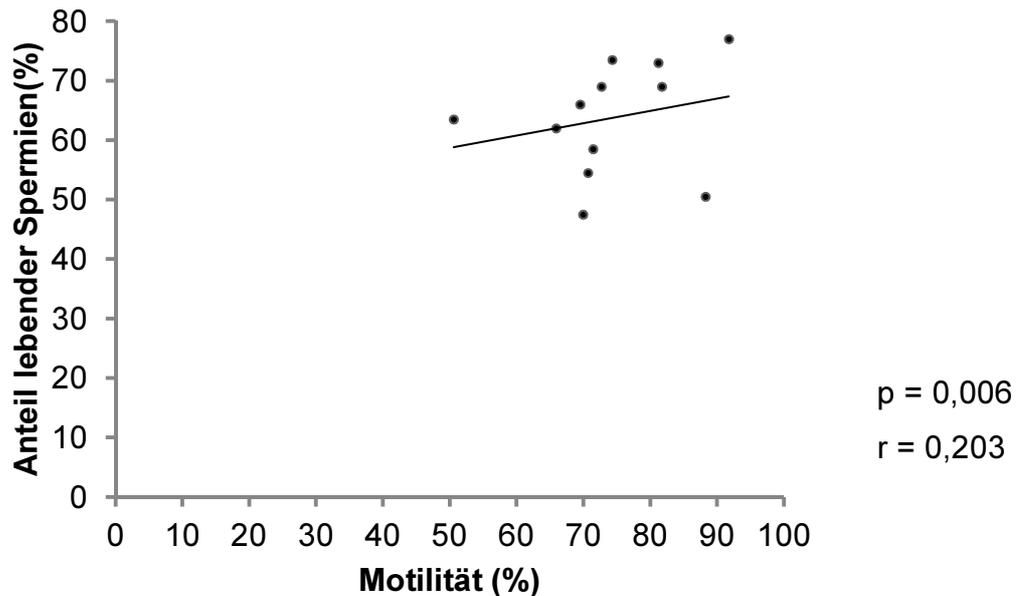


Abbildung 19: Korrelationsdiagramm zwischen den unabhängigen Variablen Motilität und prozentual lebender Spermien; die Streuung der Werte um die Regressionsgerade ist hoch. Es konnte eine positive und statistisch signifikante Korrelation ermittelt werden ( $n = 183$ ).

#### 4.2.5.6 Vorwärtsbeweglichkeit versus Anteil lebende Spermien

Bei der statistischen Berechnung der Korrelation zwischen der Vorwärtsbeweglichkeit und dem prozentualen Anteil lebender Spermien (Abbildung 20) ergab sich ein signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,019$ ). Der Korrelationskoeffizient beträgt  $r = 0,173$ . Es liegt eine positive Korrelation vor.

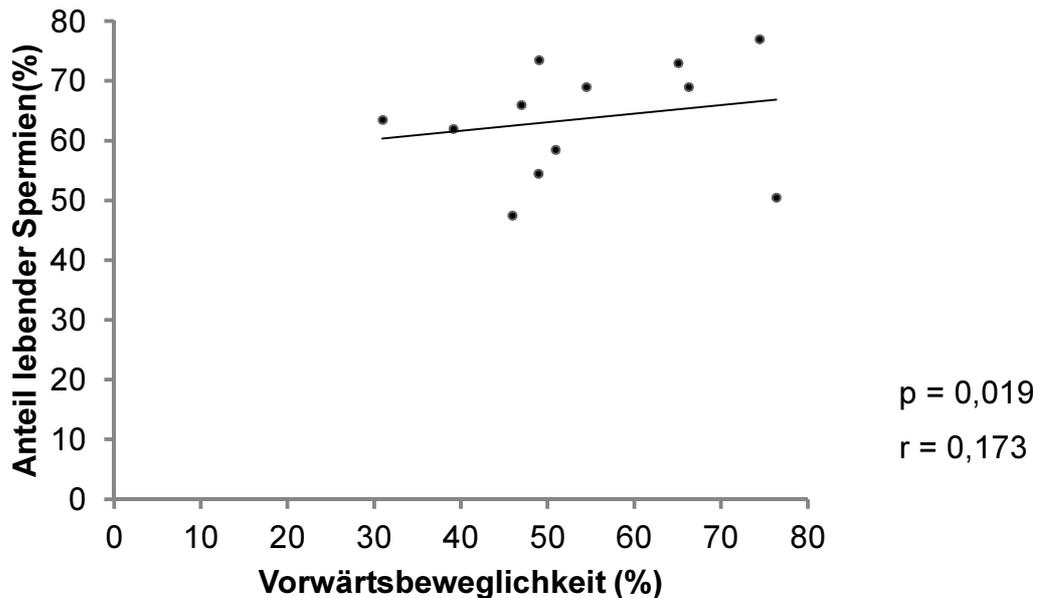


Abbildung 20: Korrelationsdiagramm zwischen den unabhängigen Variablen Vorwärtsbeweglichkeit und prozentual lebende Spermien; es liegt eine Streuung der Werte um die steigende Regressionsgerade vor. Es konnte eine statistisch signifikante Korrelation gefunden werden ( $n = 183$ ).

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Fragestellung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, einen Mukuspenetrationstest für equines Ejakulat zu etablieren. Dem zu Grunde liegt die Beobachtung, dass es zwar in der Literatur einige Veröffentlichungen über Methoden und Einsatz von Penetrationstests in der Human- und der Veterinärmedizin gibt, diese jedoch nicht speziell auf die Tierart Pferd abgestimmt sind. Lediglich im Rahmen von Funktionstests hinsichtlich der Eignung auf Kryokonservierung wird der Einsatz eines Mukuspenetrationstest zur Klassifizierung von Pferdesperma beschrieben (VON STERN, 2001). Die Autorin verwendete in ihrer Studie einen In-Vitro-Migrationstest nach dem Prinzip von KREMER (1965) mit einer Modifikation nach MORTIMER et al. (1990). Demnach entspricht der Versuchsaufbau zu weiten Teilen dem der vorliegenden Arbeit. Jedoch bestehen Unterschiede. VON STERN (2001) nutzte flache Kapillaren. Als synthetischer Mukus kam Phosphate-buffered Baker's Medium mit Hyaluronsäure-Zusatz zum Einsatz und es wurde natives, verdünntes sowie tiefgefrorenes Sperma verwendet. VON STERN (2001) kam in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass sich Mukuspenetrationstests für die Klassifizierung von Pferdesperma eignen. Die Ergebnisse zeigten eine große Streuung der Penetrationsstrecken, insbesondere bei der Verwendung von aufgetautem Tiefgefriersperma. Aus diesem Grund wurde dieser Test in der vorliegenden Arbeit nicht eingesetzt, sondern ein neuer Mukuspenetrationstest entwickelt. Dies erfolgte unter Berücksichtigung der in der Literatur bereits beschriebenen Penetrationstests. In der Veterinärmedizin wurden hauptsächlich Wiederkäuer bei der Entwicklung eines Penetrationstests berücksichtigt (EGGERT-KRUSE et al., 1989a; KREMER, 1965; MURASE et al., 1990). Insbesondere der „KREMER-Test“ (1965) lieferte die Grundlagen für eine Möglichkeit der Standardisierung eines derartigen Tests. Da bereits in der Literatur einige Modifikationen des „KREMER-Tests“ beschrieben wurden, fanden diese ebenfalls Berücksichtigung (FENEUX et al., 1985; MILLS und KATZ, 1978). Die Autoren kamen insgesamt zu dem Ergebnis, dass ein Mukuspenetrationstest als Ergänzung zur spermatologischen Untersuchung aufschlussreiche Informationen liefern kann. MURASE und BRAUN (1990) konnten signifikante Korrelationen zwischen der Spermienmotilität, der Penetrationsstrecke

der Spermien im Mukus und der Konzeptionsrate belegen. Die Studien von INSLEER et al. (1979), ALEXANDER (1981) und EGGERT-KRUSE et al. (1989a; 1989b) ergaben ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Fertilität und Penetration. Es ist daher naheliegend, einen derartigen Test für den Einsatz in der Routinediagnostik zu entwickeln. Dieser Aufgabe widmeten sich BECHER et al. (2013), in deren Studie verschiedene Varianten eines Mukuspenetrationstests für bovines Ejakulat erfolgreich auf die Möglichkeit der Standardisierung und Etablierung hin untersucht wurden. Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen erschien es zweckmäßig, die Modifizierung eines Mukuspenetrationstests auf die Tierart Pferd zu übertragen.

Das Augenmerk richtete sich insbesondere darauf, eine nach Möglichkeit leicht zu handhabende Methode zu entwickeln, deren Einsatz in der Routinediagnostik ohne einen erheblichen zeitlichen Mehraufwand und zusätzliche Kosten möglich ist. Im Rahmen der spermatologischen Diagnostik ist es sinnvoll, gerade auf Besamungsstationen auch funktionelle Tests zu etablieren, um die nativen Ejakulate zu untersuchen und die Ergebnisse in den Arbeitsprozess zu integrieren.

### **5.1.1 Einsatz der klassischen Untersuchungsmethoden für equines Ejakulat**

In der vorliegenden Studie wurden die Parameter des equinen Ejakulates aus der spermatologischen Routineuntersuchung gewonnen. Hierbei kamen insbesondere die Lebend-Tod-Färbung, die Auswertung der Pathomorphologie und die Untersuchung der Motilität und der Dichte mittels SpermVision® zum Einsatz.

Die Erfassung des Anteils an pathomorphologisch veränderten Samenzellen erfolgte in der vorliegenden Arbeit subjektiv mittels Eosin-Färbung. Dazu wurden die Samenzellen nach den Angaben von WEITZE (2001) und KLUG (1993) gefärbt und unter einem Lichtmikroskop betrachtet. Die Auswertung erfolgte nach der Klassifizierungsmethode von LEIDL et al. (1971). Die sich bei Hengstejakulat bewährte Spermac®-Färbung kam nicht zum Einsatz, da diese in Regel nicht zum Grundrepertoire eines Routinelabors gehört. Ein Einsatz dieser Färbung würde zusätzliche Anschaffungskosten und gesteigerten Zeitaufwand für die Mitarbeiter bedeuten.

Die Färbung mit Eosin nach WEITZE (2001) und KLUG (1993) bietet darüber hinaus den Vorteil, dass sich die auf diese Weise angefärbten Samenzellen auch für die Erfassung des prozentualen Anteils lebender Spermien eignen. Bei der Ermittlung

der Parameter Dichte, Vorwärtsbeweglichkeit und Motilität wurde der Einsatz von einer computerassoziierten Samenanalyse der subjektiven Auswertung vorgezogen. Die Entscheidung begründete sich mit Objektivität und Standardisierung. Der Einsatz von SpermVision®, dem CASA-System von Minitube® war naheliegend. Das System wurde bereits in mehreren Studien eingesetzt (PAGL et al., 2006; PRICE et al., 2008; SCHÄFER-SOMI und AURICH, 2007) und ist in der Routineuntersuchung etabliert. Darüber hinaus bietet das System durch das integrierte Mikroskop den Vorteil einer permanenten Sicht auf das Echtbild der zu untersuchenden Spermien.

### **5.1.2 Auswahl des geeigneten Mediums**

In der Literatur wurden unterschiedliche Medien beschrieben, die Einsatz in einem Mukuspenetrationstest fanden. Frühere Studien untersuchten und entwickelten derartige Tests unter Verwendung von nativem humanen und bovinen Zervikalmukus (KURZROK und MILLER , 1928; MOGHISSI, 1972; SIMS, 1866). Ein großes Problem war die Standardisierung des Mukus. Daher wurde versucht, individuelle Einflüsse in der Zusammensetzung durch Verwendung von Mukus aus gleichen Zyklusphasen entgegen zu wirken. Je nach wechselnder Beschaffenheit, Zusammensetzung und Qualität beeinflusst der Mukus die Penetrationsstrecke der Spermien. Die Ergebnisse sind folglich für die Entwicklung eines standardisierten Tests nur bedingt übertragbar und führten dazu, dass in der vorliegenden Arbeit kein nativer Mukus verwendet wurde.

In der vorliegenden Arbeit war es von entscheidender Bedeutung ein Medium zu finden, das keinen signifikanten individuellen Schwankungen unterliegt. Somit war die Verwendung eines synthetischen Mediums, welches reproduzierbar und einfach herzustellen ist, zwingend notwendig.

Synthetische Medien für Mukuspenetrationstests wurden ebenfalls in der Literatur beschrieben. MORTIMER (1990) verwendete Phosphate-buffered Baker`s medium mit Zusatz von Hyaluronsäure. Die Eignung dieses Mediums für einen Penetrationstest mit equinem Ejakulat wurde in der Studie von VON STERN (2001) nach einer Variation der Hyaluronsäurenkonzentration bereits beschrieben. Hierbei trat jedoch beim Einsatz von aufgetautem Tiefgefriersperma eine erhebliche Streuung der gemessenen Penetrationsstrecken auf. Die Werte variierten insgesamt um ca. 30 %. Im Einzelnen lag die Standardabweichung sogar bei ca. 80 %. Mit einer

derart hohen Streuung ist eine Etablierung dieses Tests in die Routinediagnostik nur schwer möglich. Aus diesem Grund wurde für den Mukuspenetrationstest der vorliegenden Arbeit ein anderes Medium gesucht und verwendet.

In der Studie von BECHER (2014) kamen zwei verschiedene synthetische Medien zum Einsatz:

- Agarose: Der Vorteil dieses Mediums bestand in der einfachen Herstellung und der relativ preisgünstigen Verfügbarkeit. Darüber hinaus ist Agarose ein Stoff, von dem keine Gesundheitsgefährdung ausgeht. Auf den Einsatz eines Agarosegels wurde in der vorliegenden Arbeit dennoch verzichtet, da die Ergebnisse von BECHER (2014) deutlich darauf hinweisen, dass sich solche Gele nicht für die Verwendung in Mukuspenetrationstests eignen.

- Polyacrylamid: Die Konzentrationen wurden hierbei in unterschiedlichen Variationen getestet. Die Ergebnisse dieser Studie lassen darauf schließen, dass sich Polyacrylamid-Gele je nach Konzentration und Pufferzusatz zur Anwendung in Mukuspenetrationstests eignen.

Die Eignung eines solchen Mediums wurde in den Studien von LORTON et al. (1981) und URRY et al.(1986) belegt. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf die Herstellung eines standardisierbaren Mediums auf Polyacrylamid-Basis gerichtet. Hierbei wurden durch diverse Versuche verschiedene Konzentrationen und Pufferzusätze auf Eignung geprüft. Diese Versuche ergaben, dass sich Polyacrylamid-Gel in einer 1,8%igen Konzentration am besten als Medium eignet.

Die Zusätze der unterschiedlichen Puffer wurden ebenfalls auf Einsatzfähigkeit getestet. Die Zusammensetzung und Herstellung der Zusätze beruhten auf den Angaben bereits veröffentlichter Studien (ANILKUMAR et al., 2001; LORTON et al., 1981). Hierbei war festzustellen, dass die beschriebene Methode über den Einsatz der gepufferten Salzlösung Schwierigkeiten in der Herstellung der Polyacrylamid-Gele aufkommen ließ. Die Reproduzierbarkeit der Gele, die auf diese Weise hergestellt wurden, war nicht hoch. Folglich wurde die Methode modifiziert. Das Endprodukt entsprach zwar noch dem bereits beschriebenen Gel, aber der Herstellungsprozess wurde in der Durchführung deutlich erleichtert. Aus diesem Grund wurde auf den Einsatz einer phosphatgepufferten Salzlösung zur Dialyse zugunsten einer vereinfachten und effizienteren Methode verzichtet. Da ein positiver

Einfluss von Fruktose im Medium auf die Penetrationsstrecke nachgewiesen werden konnte, ist der Zusatz von Fruktose sinnvoll. Daher kam in der vorliegenden Arbeit das 1,8%ige Polyacrylamid-Gel mit Fruktosezusatz zum Einsatz.

### **5.1.3 Auswahl der geeigneten Kapillaren**

Bisherige Studien über den Einsatz von Mukuspenetrationstests verdeutlichen, dass es im Versuchsaufbau bezüglich der verwendeten Kapillaren zwei unterschiedliche Ansätze gibt. Diskussionswürdig ist an dieser Stelle stets die Frage, ob runde oder flache Kapillaren zur Auswertung des Tests zum Einsatz kommen.

Die Autoren MILLS und KATZ (1978) verwendeten in ihrer Studie flache Kapillaren und modifizierten damit den „KREMER-Test“ (1965), in dem standardmäßig runde Kapillaren eingesetzt werden. Die Begründung der Modifikation liegt den Autoren zufolge in der besseren Beurteilbarkeit der Spermien im Lichtmikroskop. Dieses Argument ist auch in anderen Studien zu finden (ALEXANDER, 1981; VON STERN, 2001). Die Begründung der verschiedenen Autoren verweist in diesem Punkt auf die Krümmung der runden Kapillaren. Durch die Krümmung sei eine Erkennung der Samenzellen im mittleren Teil der Kapillare erschwert. Diese Beobachtung konnte in den Vorversuchen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Unter Einsatz eines Mikroskops guter Qualität war die Möglichkeit der Erkennung der Samenzellen in den runden Kapillaren im Vergleich zu den sich in flachen Kapillaren befindenden Spermien nahezu identisch. Es stellte sich vielmehr heraus, dass der Einsatz von flachen Kapillaren zwei entscheidende Nachteile bedingt. Zum Einen wurde für die Befüllung flacher Kapillare deutlich mehr Polyacrylamid-Gel verwendet. Zum Anderen bedarf die Durchführung eines Mukuspenetrationstests mit flachen Kapillaren einer erheblich größeren Menge an equinen Samenzellen. Der Mehrverbrauch an Medium und Sperma verursacht in Hinblick auf die Standardisierung höhere finanzielle Kosten. Hinzu kommt, dass die schlussendlich eingesetzten Hämatokrit-Kapillaren in der Beschaffung äußerst kostengünstig sind. Des Weiteren gehört diese Art der Kapillaren in der Regel zur Grundausstattung von Routinelaboren. Zusätzlicher Aufwand für die Beschaffung entfällt somit. Da das Ziel der vorliegenden Studie in der Entwicklung eines standardisierbaren Mukuspenetrationstests, der nach Möglichkeit kostengünstig und in der Durchführung einfach und praxisnah umzusetzen ist, war es naheliegend, die Versuche mit Hämatokrit-Kapillaren

durchzuführen. BECHER et al. (2013) kamen in ihrer Studie zu ähnlichen Erkenntnissen. Auch hier wurden Hämatokrit-Kapillaren bei der Durchführung von Mukuspenetrationstests verwendet.

#### **5.1.4 Auswahl der geeigneten Versuchsbedingungen/ Versuchsaufbau**

Die Grundlage des Versuchsaufbaus der vorliegenden Studie lieferte der „KREMER-Test“ (KREMER, 1965). Wie dort beschrieben, wurden mit synthetischem Mukus gefüllte Kapillaren eine bestimmte Zeitspanne lang einem Spermienreservoir zugeführt. Jedoch gibt hier der Versuchsaufbau vor, dass die Kapillaren in waagerechter Lage im Spermienreservoir inkubieren. LORTON et al. (1981) führten ihre Versuche ebenfalls auf diese Weise durch. Diese Versuchsanordnung wurde in der Literatur bereits von einigen Autoren modifiziert. So beschrieben URRY et al. (1986) und ANILKUMAR et al. (2001) jeweils eine vertikale Anordnung der Kapillaren während der Inkubationszeit im Spermienreservoir. Die Begründung der abgeänderten Anordnung der Kapillaren findet sich in der Überlegung, dass durch die waagerechte Ausrichtung Möglichkeiten der Beeinflussung des Tests gegeben sind. Den Autoren zufolge kann durch eine waagerechte Anordnung ein Zurücklaufen des Mukus in das Spermienreservoir nicht vollständig ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ist auch ein Fließen des Spermias in den Mukus möglich. Dies hätte bei der Auswertung des Penetrationstests die Folge, dass die Samenzellen den Mukus nicht eigenständig penetriert sondern durch physikalische Kräfte die entsprechende Position erreicht haben. Der Eintritt eines solchen Falles hätte verfälschende Auswirkungen auf die Auswertung des Tests. Um einen solchen Einfluss gänzlich auszuschließen, wurden die Kapillaren vertikal angeordnet.

Daraus ergibt sich abweichend vom Versuchsaufbau des „KREMER-Tests“ (KREMER, 1965) die Platzierung der präparierten Kapillaren in vorbereitete Eppendorfgefäße. Der Einsatz derartig modifizierter Eppendorfgefäße wurde in der Literatur bereits als geeignet beschrieben (BECHER et al., 2013). Dieser Versuchsaufbau bot dem synthetischen Mukus durch die präzise Platzierung der Kapillaren optimalen Kontakt zum Spermienreservoir. Des Weiteren ergab sich durch die Art der Anordnung die Möglichkeit der Doppelansätze, die in der Auswertung eine Sicherheit darstellen. Hinsichtlich des praxisnahen Einsatzes des Tests stellte sich dieser Versuchsaufbau als sehr anwenderfreundlich heraus. Die Platzierung der

Kapillaren erfolgt einfach und in kurzer Zeit und bedarf während der Inkubationszeit keines weiteren Handlungsschritts. In Hinblick darauf, dass sich der Mukuspenetrationstest für die spermatologische Untersuchung in Routinelaboren eignen soll, bietet die Verwendung von präparierten Eppendorfgefäßen Vorteile. Diese Gefäße sind kostengünstig und leicht verfügbar. Darüber hinaus gehören sie in der Regel zur Grundausstattung von andrologischen Untersuchungslaboren. Die Verwendung dieser Gefäße bei der Durchführung der Penetrationsversuche war daher naheliegend.

In einem anderen Punkt der Versuchsanordnung sind die Angaben in der Literatur einheitlich. Die Vorgabe von KREMER (1965) darüber, dass das Ende der Kapillare, das sich nicht im Spermienreservoir befindet, mittels eines Verschlusskits verschlossen werden sollte, findet sich in zahlreichen Publikationen wieder (u. a. BECHER, 2014; LORTON et al., 1981; VON STERN, 2001). Aufgrund der bereits veröffentlichten Erkenntnisse über die Auswirkung des Verschließens der Kapillaren wurde in der vorliegenden Arbeit dieser Schritt bei der Versuchsdurchführung ebenfalls durchgeführt.

Auch die bereits veröffentlichten Angaben über die Temperatur während der Inkubation ergeben ein einheitliches Bild. Demnach sollte die Inkubationstemperatur mindestens 37 °C betragen (BECHER, 2014; GALLI et al., 1991; KREMER, 1965), um eine Penetration des Mukus optimal zu gewährleisten. In Hinblick auf die physiologischen Bedingungen wurde die Inkubationstemperatur daher auf 37,5°C festgelegt.

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wurde das synthetische Medium bereits vor dem Einsatz im Mukuspenetrationstest auf 37,5°C erwärmt. Dieser Schritt war notwendig, da die Lagerung des Mediums bei einer Temperatur von 5°C erfolgte. Die Verwendung von derartig gekühltem Polyacrylamid-Gel in einem Penetrationstest entspricht nicht den physiologischen Bedingungen. Die Erwärmung erfolgte aus pragmatischen Gründen innerhalb der Kapillaren. So konnten die Befüllung, das Verschließen mittels Verschlusskits und die Erwärmung in einem einzigen Arbeitsschritt erfolgen. Diese Durchführung erwies sich als effizient.

Bei der Festlegung der Inkubationszeit wurden die Angaben bereits veröffentlichter Studien berücksichtigt. Hier war festzustellen, dass in der Literatur deutlich diskrepante Angaben über die Zeitspanne der Inkubation existieren. Während

MURASE et al. (1990) und LORTON et al. (1981) die Zeitspanne mit 10 bzw. 15 Minuten relativ kurz wählten, legte VON STERN (2001) die Inkubationszeit auf 120 Minuten fest. Bei der Verwendung von bovinem Ejakulat ist eine Zeitspanne von 30 Minuten beschrieben (ANILKUMAR et al., 2001; BECHER et al., 2013). Entgegen dieser Veröffentlichungen wurde die Inkubationszeit in der vorliegenden Arbeit auf 60 Minuten festgelegt. Eine Zeitspanne von 30 Minuten war unter Berücksichtigung der Kenntnisse über die Motilität von equinen Spermien zu kurz. Eine Inkubationsdauer von 120 Minuten (VON STERN, 2001) erwies sich in Hinblick auf den Einsatz in der Routineuntersuchung als zu lang. Die Festlegung auf eine Zeitspanne von 60 Minuten ermöglichte zum einen ausreichend Zeit für die Penetration des Mukus durch die Spermien, zum anderen bot diese Zeitspanne ausreichend Raum für die Durchführung weiterer spermatologischer Untersuchungen während der Inkubationszeit. Dies ist hinsichtlich des praktischen Einsatzes des Mukuspenetrationstests in einem Routinelabor von Bedeutung.

Eine Besonderheit in der Durchführung des Mukuspenetrationsversuches der vorliegenden Arbeit besteht in dem Abbruch der Penetration durch Kühlung. Hierfür wurden die Spermien nach Ablauf der Inkubationszeit durch eine Kühlung auf -20°C immobilisiert. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um eine weitere Penetration des Mukus durch die Spermien nach Ablauf der vorgegebenen Zeit zu verhindern. Erfolgt keine sichere Immobilisation, kann eine Veränderung der Penetrationsstrecke nach Ablauf der im Test festgelegten Penetrationszeit nicht sicher ausgeschlossen werden. Dies musste aber hinsichtlich der Praxistauglichkeit dieses Tests gewährleistet werden. Da die Bedingungen in praxi häufig eine sofortige Auswertung des Mukuspenetrationstests nicht ermöglichen, kann es zu Verzögerungen der Auswertung kommen. Um solche zeitlichen Einflüsse auszuschließen, wurde die Immobilisation der Spermien auf die beschriebene Weise durchgeführt. In der Arbeit von VON STERN (2001) finden sich keine Angaben darüber, ob oder wie die Penetration der Spermien im Medium nach Ablauf der Inkubationszeit beendet wurde. So ist zu vermuten, dass hierin eine der Ursachen zu finden ist, weshalb die von ihr gemessenen Penetrationsstrecken in der vorliegenden Arbeit nicht reproduzierbar waren.

Die Auswertung des Mukuspenetrationstest erfolgte analog zu den bereits veröffentlichten Angaben anderer Studien. Wie in der Literatur beschrieben wurden die einzelnen Kapillaren mittels eines Phasenkontrastmikroskops durchmustert und die Penetrationsstrecke bemessen (KREMER, 1965; MILLS und KATZ, 1978; MURASE und BRAUN, 1990; MURASE et al., 1990; URRY et al., 1986). Hierbei ergaben sich im Gegensatz zu der von LORTON et al. (1981) durchgeführten Untersuchung in der vorliegenden Arbeit keine Varianzmöglichkeiten der Auswertung der Samenzellen hinsichtlich der Unterscheidung zwischen lebenden und toten Spermien. Durch den Abbruch des Versuchs durch Kühlung waren keine Samenzellen mehr motil und konnten somit nicht unterschiedlich gewertet werden. Jedoch wurden analog zu seinen Vorgaben bei der Auszählung neben dem vordersten Spermium auch die vordersten fünf Samenzellen berücksichtigt.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

Die Varianzanalyse der Hauptversuche ergab, dass die Unterschiede zwischen verschiedenen Ejakulaten desselben Versuchstieres zu Streuungen in Höhe von ca. 15 % um den Mittelwert der Penetrationsstrecke im Medium führten. Im Gegensatz dazu erwiesen sich Ansätze des gleichen Ejakulats als zu vernachlässigende Streuungsursache. Allerdings bildeten die Wiederholungen der Messung des gleichen Ansatzes mit einer Streuung von 27 % die stärkste Streuquelle. Dies deutet daraufhin, dass der vorliegende Versuch einer starken Eigenstreuung (inhärente Streuung) unterworfen ist, die nicht auf externe Einflüsse zurückgeführt werden kann, oder weitere Streuungsursachen vorlagen, die in dem Versuch nicht erfasst werden konnten.

Möglicherweise bestanden Unterschiede in der Kryokonservierung der Ejakulate oder in deren Lagerungszeit. Denkbar wäre auch der Einfluss von Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit. Beim Einsatz von Polyacrylamid in der Gel-Elektrophorese wird in den Laboren auf einheitliches Raumklima geachtet, um Einflüsse auf das Medium zu verhindern. Da bei der Durchführung der Versuche der vorliegenden Arbeit die klimatischen Bedingungen im Labor einheitlich gehalten wurden, könnte der Einfluss nur durch minimale Veränderungen vorgelegen haben. Auch diese minimalen Schwankungen auszuschließen, würde den Einsatz eines Inkubators erfordern. Dies widerspricht jedoch der Eignung für den Einsatz in Routinelaboren.

Naheliegender ist jedoch die Annahme, dass die Penetrationsstrecke des equinen Spermas eine Größe ist, die generell stark streut. Auch in den Ergebnissen der Studie von VON STERN (2001) liegt die Streuung der Messwerte in der Größenordnung des Mittelwertes. Dort variieren die gemessenen Penetrationsstrecken von aufgetautem Tiefgefriersperma insgesamt um ca. 30 %.

Die Häufigkeitsverteilung der ermittelten Penetrationsstrecken ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen dem vordersten und den vordersten fünf Spermien, weshalb eine separate Bestimmung dieser beiden Parameter bei equinem Sperma im Gegensatz zu den Angaben der Studie von LORTON et al. (1981) nicht notwendig erscheint.

Die Häufigkeiten der gemessenen Penetrationsstrecken sind normal verteilt, was die Anwendbarkeit der hier eingesetzten statistischen Auswertungsmethoden begründet.

Der Mittelwert der gemessenen Penetrationsstrecken ergab 7,7 mm. Diese Distanz erscheint im Vergleich zu Messergebnissen anderer Studien gering. In der Studie von VON STERN (2001) wurden deutlich längere Penetrationsstrecken für aufgetautes Tiefgefriersperma beschrieben. Dass diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden konnten, lässt sich vermutlich auf den Einsatz verschiedener Medien sowie die unterschiedlich langen Inkubationszeiten zurückführen. Nicht auszuschließen ist hierbei auch eine erhebliche Varianz durch den nicht beschriebenen, daher vermutlich nicht durchgeführten Abbruch der Penetration der Spermien nach Ablauf der Inkubationszeit.

Bei Verwendung von bovinem Sperma konnten unter ähnlichen Versuchsbedingungen Penetrationsstrecken von über 3 cm gemessen werden (BECHER, 2014; URRY et al., 1986). CORREA et al. (1997) konnten in ihrer Studie feststellen, dass Bullen, deren Samenzellen die Marke von 2 cm nicht innerhalb der Inkubationszeit erreichen, in ihrer Fertilität negativ beeinflusst sind. Auch die Auswertungen von Penetrationstests humanmedizinischer Studien geben längere Penetrationsdistanzen der Spermien im Versuch an (ALEXANDER, 1981; MILLS und KATZ, 1978).

Diese Differenzen in den Ergebnissen sind unter Berücksichtigung der speziesabhängigen Unterschiede nicht verwunderlich. Die Fortpflanzungsphysiologie des Pferdes bedingt einige Besonderheiten, deren Einfluss auf die

Penetrationsstrecke nahelegt. Im Gegensatz zu Bulle und Mann gehört der Hengst zu den Uterusbesamern. Daraus resultiert, dass sowohl bei der natürlichen wie auch der instrumentellen Samenübertragung die Spermien direkt in den Gebärmutterkörper gelangen und folglich keine Penetration des Zervikalmukus stattfindet. Der anschließende Transport der Samenzellen in die Uterushornspitze erfolgt stärker passiv als durch eigene Motilität. Physiologischer Weise führt der Kontakt mit dem Inseminat im Körper der Stute zu einer Steigerung der Uterusmotilität. Der aktive Spermientransport spielt nur eine untergeordnete Rolle (SIEME, 2009). Deswegen ist die Art der Motilität der Samenzellen auch nicht von erheblichem Einfluss. Im tierartlichen Vergleich kann beim Hengst ein erhöhter Anteil Spermien mit Kreisbewegungen beobachtet werden, welcher in gewissen Maßen physiologisch ist (HOFFMANN, 2003).

Für die Dichte des Ejakulats wurde eine leicht negative Korrelation zur Penetrationsstrecke ermittelt. Daraus ergibt sich ein Hinweis auf eine Optimierung der Penetrationsdistanz durch Herabsetzung der Spermiedichte ähnlich der bereits nachgewiesenen Verbesserung der Motilität nach Aufbereitung des Ejakulats mit geeigneten Verdünnermedien. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang auch von einer anteiligen Veränderung der ortsbeweglichen Spermien gesprochen. Durch den Einsatz von Verdünnermedien verschiebt sich das Verhältnis der motilen Spermien zu Gunsten der vorwärtsbeweglichen Samenzellen (WABERSKI und SIEME, 2009). Ein Einfluss der Dichte auf die Penetrationsdistanz ist somit naheliegend.

Wie auch in den Studien von MURASE und BRAUN (1990) und BECHER et al. (2013) beschrieben, zeigte sich eine schwach positive, signifikante Korrelation zwischen der Motilität der Spermien und der Penetrationsstrecke im Medium.

Die Penetrationsstrecke korreliert ebenfalls signifikant mit der Vorwärtsbeweglichkeit. Diese Korrelation ist schwach positiv. AITKEN et al. (1992), BECHER et al. (2013), MORTIMER et al. (1990) und VON STERN (2001) konnten in ihren Studien ebenfalls eine derartige Korrelation nachweisen. Diese Ergebnisse sind nicht verwunderlich, da die Penetration des Mukus eine vorwärtsgerichtete Motilität der Spermien voraussetzt und aus ihr resultiert.

Darüber hinaus beschreiben AITKEN et al. (1992) und MORTIMER et al. (1990) jeweils Korrelationen zwischen Penetrationsstrecke und Vitalität. In der vorliegenden Arbeit konnte eine schwach positive, signifikante Korrelation zwischen Penetrationsstrecke und dem Anteil der lebenden Spermien belegt werden. Zwar ist der prozentuale Anteil lebender Spermien nicht mit Vitalität gleich zu setzen, jedoch geben die Korrelationen Hinweise auf einen Zusammenhang. Ein derartiger Zusammenhang war zu erwarten, denn nur vitale Spermien zeigen Motilität, die für die Penetration des Mukus benötigt wird. Tote Spermien stellen dagegen Hindernisse für die lebenden Samenzellen dar. Diese müssen noch vor und während der Penetration des Mukus von den lebenden Spermien überwunden werden. Derartige Hindernisse können zu einer Verzögerung aber auch zu einem Ausfall der Penetration führen. Es ist daher naheliegend, dass weniger tote Spermien und folglich weniger Hindernisse zu längeren Penetrationsdistanzen führen.

Die Einflüsse der klassischen spermatologischen Laborparameter Dichte, Motilität, Vorwärtsbeweglichkeit und Anteil lebende Spermien auf die Penetrationsstrecke sind sowohl einzeln als auch in Kombination kleiner als die zuvor beschriebenen Streuungen der Messungen. Somit können die klassischen Laborparameter nicht dazu beitragen, um Rückschlüsse auf die Penetrationsstrecke zu ziehen. Deshalb ist die Penetrationsstrecke als eigenständiger Laborparameter zu betrachten. Zu diesem Ergebnis gelangte auch VON STERN (2001). Um eine Beurteilung mit Hilfe der Penetrationsstrecke durchführen zu können, ist daher zwingend ein Mukuspenetrationstest notwendig. Wie bereits in ihrer Studie postuliert wurde, eignet sich die Penetrationsstrecke zur Beurteilung von Hengstsperma, muss jedoch mit Hilfe eines Mukuspenetrationstests bestimmt werden, da kein ausreichender Zusammenhang zwischen Penetrationsdistanz und den übrigen ermittelten Laborparametern belegt werden konnte.

Die multiple Regressionsanalyse, die die simultane, lineare Korrelation aller vier klassischen Laborparameter evaluiert, zeigte auf, dass in der Betrachtung des Gesamteinflusses lediglich die Dichte eine signifikante Korrelation aufweist. Der ermittelte Regressionskoeffizient von  $r = -1,04$  deutet hier jedoch daraufhin, dass sich die Penetrationsstrecke nicht als lineare Funktion der klassischen spermatologischen Parameter ausdrücken lässt.

Weiterhin wurden Korrelationen zwischen klassischen, spermatologischen Laborparametern untereinander mit Hilfe von linearen Regressionsanalysen untersucht. In der Literatur finden sich über derartige Untersuchungen keine Angaben. Bisher wurde ausschließlich der Zusammenhang der Untersuchungsparameter und der Fertilität bzw. Fertilitätsparametern untersucht. Hier jedoch zeigte sich die zu erwartende starke und signifikante Korrelation zwischen der Motilität und der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien. In der vorliegenden Arbeit stellt sich der Zusammenhang dieser beiden Parameter als derart stark dar, dass sich Hinweise darauf ergeben, dass die Bestimmung nur eines Parameters ausreichend wäre. Diese Annahme sollte jedoch durch weiterführende Studien untersucht werden.

Darüber hinaus zeigte sich eine schwach positive, signifikante Korrelation zwischen den Parametern Dichte und Motilität/Vorwärtsbeweglichkeit. Aufgrund stärkerer Streuung der Messwerte für Motilität/Vorwärtsbeweglichkeit um die Regressionsgerade ist eine Bestimmung der Dichte als unabhängiger Laborparameter dennoch notwendig.

Des Weiteren stellten sich die Parameter Prozentanteil lebender Spermien und Motilität/Vorwärtsbeweglichkeit als schwach positiv, signifikant korreliert dar. Da auch hier die Messwerte stark um die Regressionsgerade streuen, ist auch der Anteil lebender Spermien als unabhängiger Laborparameter zu betrachten und sollte Bestandteil der spermatologischen Routinediagnostik bleiben.

Zwischen den Parametern Dichte und Prozentanteil lebender Spermien konnte aus den Daten keine Korrelation ermittelt werden, woraus die Unabhängigkeit der beiden Parameter resultiert.

### **5.3 Abschließende Bemerkungen/ Empfehlungen zur Durchführung eines Mukus-Penetrationstests**

Der Versuchsaufbau unter Verwendung von Hämatokrit-Kapillaren erwies sich aufgrund leichter Handhabung, kostengünstigen Materialien, geringem Zeitaufwand und einfacher Durchführung als sehr effizient.

Durch die Ermittlung der Parameter der klassischen Spermaanlyse und die Berechnung der Korrelationen zur Penetrationsstrecke konnten trotz der schwachen

Korrelation zur Dichte Zusammenhänge so weit ausgeschlossen werden, dass sich eine Unabhängigkeit ergab. Somit stellt die Mukuspenetrationsdistanz einen ergänzenden, in Form eines eigenständigen Parameter zur Beurteilung von Hengstsperma dar.

Weiterhin konnte durch die Ergebnisse belegt werden, dass es im Gegensatz zu den Angaben von LORTON et al. (1981) bei der Auswertung von Penetrationstest mit equinem Ejakulat ausreicht, lediglich das vorderste Spermium zu messen.

Deutlich schwieriger als erwartet erwies sich der Einsatz des Mediums auf Polyacrylamid-Basis. Neben Schwierigkeiten in der Herstellung ergaben die Auswertungen der Penetrationstests im Mittel eine erreichte Distanz von 7,7 mm. Dieser Wert ist äußerst gering. Daraus ergeben sich schnell große Schwankungen innerhalb des Versuches. Auch ist die Auswertung durch derart geringe Distanzen erschwert. Beim Einsatz in spermatologischen Untersuchungslaboren kann es dadurch leicht zu Auswertungsfehlern kommen.

Zusammenfassend resultiert daraus, dass die vielversprechenden Ergebnisse von BECHER (2014) für den Bullen sich nicht auf die Anwendung mit equinem Ejakulat übertragen lassen.

In weiteren Studien sollten die Gründe der hohen Streuung dieses Tests untersucht werden. Hierbei wäre es interessant, ob diese hohen Varianzen in verschiedenen Medien gleichermaßen auftreten oder ob durch Modifikationen der Gelmatrix die hohe Streuung der Penetrationsstrecken ausbleibt.

## 6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, einen Mukuspenetrationstest für equines Ejakulat zu entwickeln, der sich für einen standardisierten Einsatz in der spermatologischen Untersuchung eignet. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der möglichst einfachen Integrierbarkeit der Methode in den Ablauf der spermatologischen Routineuntersuchung. Das Verfahren wurde daher mit Hinblick auf seine Praktikabilität, sowie einer nur minimalen Erhöhung von zeitlichem Aufwand und Materialkosten entwickelt.

Für die insgesamt 365 durchgeführten Mukuspenetrationstests wurden Medien auf Polyacrylamid-Basis und Ejakulate von zwei gesunden Hengsten verwendet.

Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die besten Ergebnisse konnten mit einem 1,8%igen Polyacrylamid-Gel, TRIS-Puffer und Fruktose-Zusatz erzielt werden.
- Der Einsatz von Hämatokrit-Kapillaren hat sich für die Durchführung des Mukuspenetrationstests als geeignet erwiesen.
- Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums bzw. der vordersten fünf Spermien nachgewiesen werden. Die Erfassung nur eines der beiden Messwerte ist somit ausreichend.
- Im Mittel ergaben sich Penetrationsstrecken von 7,7 mm, was im Vergleich zu den wenigen, vorhandenen Daten aus vorherigen Studien für equines Ejakulat unter Verwendung eines anderen Gels eine deutliche Reduktion der Messgröße darstellt.
- Es konnten signifikante Korrelationen zwischen der Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums und der vordersten fünf Spermien zu den Parametern Dichte ( $p < 0,001$ ;  $r = -0,293$  bzw.  $r = -0,296$ ), Motilität ( $p = 0,009$ ;  $r = 0,201$  bzw.  $p = 0,008$ ;  $r = 0,202$ ), Vorwärtsbeweglichkeit ( $p = 0,003$ ;  $r = 0,224$  bzw.  $r = 0,225$ ) und Anteil lebender Spermien ( $p = 0,030$ ;  $r = 0,166$  bzw.  $p = 0,028$ ;  $r = 0,168$ ) gefunden werden. Die Korrelationsanalysen zwischen der Penetrationsstrecke des vordersten Spermiums und der vordersten fünf Spermien zu den klassischen Laborparametern wiesen dabei jedoch eine hohe Streuung der Werte um die Regressionsgerade auf.
- Die multiple Korrelationsanalyse ergab, dass die Distanz im Mukuspenetrationstest als eigenständiger Parameter in der spermatologischen

Untersuchung zu werten ist und nicht aus den übrigen Messwerten bestimmt werden kann.

Grundsätzlich ist ein standardisierter Einsatz des entwickelten Mukuspenetrationstests in der spermatologischen Untersuchung von equinen Proben ohne wesentliche Erhöhung der Kosten und des zeitlichen Aufwandes möglich. Jedoch ist der in dieser Arbeit eingesetzte Test noch nicht praxistauglich. Weitere Modifikationen, insbesondere an der Gelmatrix, sind zur Standardisierung und zum Einsatz in praxi erforderlich.

## 7 Summary

The aim of this study was the adaptation of a mucus penetration for equine sperm specimen. The procedure was intended to be easily includable into the workflow of a spermatological routine analysis and was therefore designed to require minimal time and material costs.

A total of 365 mucus penetration test trials were performed in polyacrylamide media using sperm specimen of two healthy stallions.

The following results were achieved:

- A gel composition of 1.8% polyacrylamide, TRIS buffer and fructose provided the best results.
- The utilization of haematocrit capillaries to perform the mucus penetration test was found to be adequate.
- There was no significant difference in the penetration distance of the first single sperm and the distance of the first five sperms. Thus the acquisition of just one of these values is sufficient.
- The average penetration distance in the polyacrylamide gel was 7.7 mm, which is significantly shorter than the distances measured for equine sperm specimen in different gels within previous studies.
- The statistical analyses depicted significant correlations between the penetration distances of the first single/first five sperm(s) to the spermatological routine parameters density ( $p < 0.001$ ;  $r = -0.293 / -0.296$ ), motility ( $p = 0.009$ ;  $r = 0.201 / p = 0.008$ ;  $r = 0.202$ ), forward mobility ( $p = 0.003$ ;  $r = 0.224 / p = 0.003$ ;  $r = 0.225$ ) and live sperm fraction ( $p = 0.030$ ;  $r = 0.166 / p = 0.028$ ;  $r = 0.168$ ), yet with a large spread of the data around the linear regression lines.
- Multiple correlation analysis still showed that the penetration distance cannot be determined from the other values of the spermatological routine analysis and thus has to be considered to be an independent variable.

The standard utilization of the shown mucus penetration test in the spermatological routine analysis of equine specimen is basically feasible without significantly increasing material or time costs. However, the test developed in this work is in its current form not yet practically applicable.

Further modifications to the procedure and especially to the gel matrix are required to standardize the mucus penetration test for laboratory routine.

## 8 Anhang

### Bezugsquellen für Materialien und Einmalartikel

- B. Braun, Melsungen AG
  - Sicherheits-Venenverweilkanüle, Vasofix® Safety, Art.: 4268210S-01
  
- Carl Roth GmbH, Karlsruhe
  - Nadir ® -Dialyseschlauch, MWCO 10-20kDa, Art.: 5101
  - Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), Art.: 3029
  - APS (Ammoniumperoxidsulfat), reinst , Art.: 9592
  - TEMED (N,N,N,N`-Tetramethylethyldiamin), Art.: 2367
  - D(-)-Fruktose, Art.: 4981
  
- Eppendorf AG, Hamburg
  - Eppendorf Safe-Lock-Gefäße, Bestell-Nr.: 0030 121
  
- Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co, Eberstadt
  - Hämatokrit-Kapillaren, Code-Nr.: 910 0175
  - Versiegelungswachsplatte, Code-Nr.: 9120101
  
- IDL GmbH, Nidderau
  - Objektträger/ Microscope Slides, Ref.: 1900000010
  
- Leja, Nieuw-Vennep, Niederlande
  - Messkammer (20 Mikron) SpermVision, Art.no. SC 20-01-04-B
  
- Merck KGaA, Darmstadt
  - Natriumchlorid, Bestell-Nr.: 106404
  - Eosin B, Bestell-Nr.: 115935
  - TRIS (Trometamol), Bestell-Nr.: 108387

- MAGV, Rabenau-Londorf
  - Salzsäure, 1M, Art.: A1434
  - Parafilm® M, Art.: 3-1011
  
- Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
  - Adapter for use on capillaries, Ref 906-020
  
- Servoprax GmbH, Wesel
  - Ringmarken Pipetten, 50µl, Ref.: A1 0105
  
- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
  - $K_2HPO_4$  (Dipotassium hydrogenphosphate, P3786
  - PBS Tabletten (phosphate-buffered saline), P4417
  - $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  (Natrium-phosphat-dibasisch Dihydrat), P71645
  
- Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
  - Wiretrol® II Precision Micropipettes, 100-200µl, Cat.#5-00-2200

## 9 Literaturverzeichnis

AGARWAL A, SALEH RA, BEDAIWY MA (2003)

Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction.  
Fertil Steril 79: S. 829–843.

AHLGREN M (1975)

Sperm transport to and survival in the human fallopian tube.  
Gynecol Invest 6: S. 206–214.

AITKEN RJ (1988)

Assessment of sperm function for IVF.  
Hum Reprod 3: S. 89–95.

AITKEN RJ (1999)

The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis?  
J Reprod Fertil 115: S. 1–7.

AITKEN RJ (2004)

Founders' Lecture. Human spermatozoa. fruits of creation, seeds of doubt.  
Reprod Fertil Dev 16: S. 655–664.

AITKEN RJ (2006)

Sperm function tests and fertility.  
Int J Androl 29: S. 69-75; S. 105-108.

AITKEN RJ, BOWIE H, BUCKINGHAM D, HARKISS D, RICHARDSON DW, WEST KM (1992)

Sperm penetration into a hyaluronic acid polymer as a means of monitoring functional competence.  
J Androl 13: S. 44–54.

AITKEN RJ, BUCKINGHAM DW, WEST K, BRINDLE J (1996)

On the use of paramagnetic beads and ferrofluids to assess and eliminate the leukocytic contribution to oxygen radical generation by human sperm suspensions.  
Am J Reprod Immunol 35: S. 541–551.

AITKEN RJ, CLARKSON JS (1987)

Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa.  
J Reprod Fertil 81: S. 459–469.

AITKEN RJ, HARKISS D, KNOX W, PATERSON M, IRVINE DS (1998)  
A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation.

J Cell Sci 111 (Pt 5): S. 645–656.

AITKEN RJ, IRVINE DS, WU FC (1991)

Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility.

Am J Obstet Gynecol 164: S. 542–551.

AITKEN RJ, IRVINE S, KELLY RW (1986)

Significance of intracellular calcium and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in the mechanisms by which prostaglandins influence human sperm function.

J Reprod Fertil 77: S. 451–462.

AITKEN RJ, ROSS A, HARGREAVE T, RICHARDSON D, BEST F (1984)

Analysis of human sperm function following exposure to the ionophore A23187.

Comparison of normospermic and oligozoospermic men.

J Androl 5: S. 321–329.

AITKEN RJ, SUTTON M, WARNER P, RICHARDSON DW (1985)

Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes.

J Reprod Fertil 73: S. 441–449.

ALEXANDER NJ (1981)

Evaluation of male infertility with an in vitro cervical mucus penetration test.

Fertil Steril 36: S. 201–208.

ALTHOUSE GC, HOPKINS SM (1995)

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

Theriogenology 43: S. 595–603.

ANILKUMAR R, DEVANATHAN TG, PATTABIRAMAN SR, EDWIN MJ (2001)

Correlation between the spermatozoal characteristics and sperm penetration distance in polyacrylamide gel and bovine cervical mucus.

Theriogenology 55: S. 685–691.

- AUGER J, RONOT X, DADOUNE JP (1989)  
Human sperm mitochondrial function related to motility. a flow and image cytometric assessment.  
J Androl 10: S. 439–448.
- BALL BA, FAGNAN MS, DOBRINSKI I (1997)  
Determination of acrosin amidase activity in equine spermatozoa.  
Theriogenology 48: S. 1191–1198.
- BALLACHEY BE, EVENSON DP, SAACKE RG (1988)  
The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls.  
J Androl 9: S. 109–115.
- BALLACHEY BE, HOHENBOKEN WD, EVENSON DP (1987)  
Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility.  
Biol Reprod 36: S. 915–925.
- BECHER AC, FAILING K; KAUFFOLD J; WEHREND A (2013)  
Establishment of a practical sperm penetration test for bovine semen  
Tierärztl Prax: 41: S. 297-303
- BECHER AC (2014)  
Etablierung eines in-vitro-Spermien-Penetrationstestes zur Analyse boviner Samenzellen  
Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz, Justus-Liebig-Universität Gießen, Dissertation
- BOERSMA A, BRAUN J (1999)  
Computer-assisted analysis of sperm morphology in veterinary medicine  
Berl Münch Tierärztl Wochenschr 112: S. 81–85.
- BROWN KI, CRABO BG, GRAHAM EF, PACE MM (1971)  
Some factors affecting loss of intracellular enzymes from spermatozoa.  
Cryobiology 8: S. 220–224.
- CHENG FP, FAZELI A, VOORHOUT WF, MARKS A, BEVERS MM, COLENBRANDER B (1996)  
Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-

induced acrosome reaction in stallion spermatozoa.

J Androl 17: S. 674–682.

CHOI YH, LOVE CC, LOVE LB, VARNER DD, BRINSKO S, HINRICHS K (2002)  
Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes  
fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed  
spermatozoa.

Reproduction (Cambridge, England) 123: S. 455–465.

COLENBRANDER B, FAZELI AR, VAN BUITEN A, PARLEVLIET J, GADELLA BM  
(1992)

Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse.

Acta Vet Scand Suppl 88: S. 49–58.

CORREA JR, PACE MM, ZAVOS PM (1997)

Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine  
semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination  
program.

Theriogenology 48: S. 721–731.

DAVIS RO, BAIN DE, SIEMERS RJ, THAL DM, ANDREW JB, GRAVANCE CG  
(1992)

Accuracy and precision of the Cell-Form-Human automated sperm morphometry  
instrument.

Fertil Steril 58: S. 763–769.

DAVIS RO, GRAVANCE CG, CASEY PJ (1993)

Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa.

Am J Vet Res 54: S. 1808–1811.

DOTT HM (1975)

Morphology of stallion spermatozoa.

J Reprod Fertil Suppl: S. 41–46.

DOTT HM, FOSTER GC (1972)

A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are  
eosinophilic in a differential 'life-dead' stain.

J Reprod Fertil 29: S. 443–445.

- EGGERT-KRUSE W, GERHARD I, TILGEN W, RUNNEBAUM B (1989a)  
Clinical significance of crossed in vitro sperm-cervical mucus penetration test in infertility investigation.  
Fertil Steril 52: S. 1032–1040.
- EGGERT-KRUSE W, GERHARD I, TILGEN W, RUNNEBAUM B (1990)  
The use of hens' egg white as a substitute for human cervical mucus in assessing human infertility.  
Int J Androl 13: S. 258–266.
- EGGERT-KRUSE W, LEINHOS G, GERHARD I, TILGEN W, RUNNEBAUM B (1989b)  
Prognostic value of in vitro sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus.  
Fertil Steril 51: S. 317–323.
- EVENSON DP, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED MR (1980)  
Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.  
Science 210: S. 1131–1133.
- EVENSON DP, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED MR (1982)  
Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility.  
J Histochem Cytochem 30: S. 279–280.
- FAZELI AR, STEENWEG W, BEVERS MM, DE LOOS, F. A., VAN DEN BROEK, J., COLENBRANDER B (1993)  
Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen.  
Vet Rec 132: S. 14–16.
- FENEUX D, SERRES C, JOUANNET P (1985)  
Sliding spermatozoa. a dyskinesia responsible for human infertility?  
Fertil Steril 44: S. 508–511.
- FJÄLLBRANT B (1965)  
Immunoagglutination of sperm in cases of sterility.  
Acta Obstet Gynecol Scand 44: S. 474–490.

FJÄLLBRANT B (1971)

Binding sites of autoimmune spermatozoal antibodies.

Acta Obstet Gynecol Scand Suppl 9: S. Suppl 9:58.

GADDUM-ROSSE P, BLANDAU RJ, LEE WI (1980)

Sperm penetration into cervical mucus in vitro. I. Comparative studies.

Fertil Steril 33: S. 636–643.

GALLI A, BASETTI M, BALDUZZI D, MARTIGNONI M, BORNAGHI V, MAFFII M (1991)

Frozen bovine semen quality and bovine cervical mucus penetration test.

Theriogenology 35: S. 837–844.

GARNER DL, JOHNSON LA (1995)

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

Biol Reprod 53: S. 276–284.

GARNER DL, JOHNSON LA, YUE ST, ROTH BL, HAUGLAND RP (1994)

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

J Androl 15: S. 620–629.

GARNER DL, THOMAS CA, JOERG HW, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE (1997)

Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.

Biol Reprod 57: S. 1401–1406.

GRAHAM JK, FOOTE RH, PARRISH JJ (1986)

Effect of dilauroylphosphatidylcholine on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull spermatozoa into zona-free hamster eggs.

Biol Reprod 35: S. 413–424.

GRAHAM JK, KUNZE E, HAMMERSTEDT RH (1990)

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

Biol Reprod 43: S. 55–64.

GRAVANCE CG, GARNER DL, BAUMBER J, BALL BA (2000)

Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1.

Theriogenology 53: S. 1691–1703.

- GRAVANCE CG, LIU IK, DAVIS RO, HUGHES JP, CASEY PJ (1996)  
Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa.  
J Reprod Fertil 108: S. 41–46.
- HARRISON RA, VICKERS SE (1990)  
Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa.  
J Reprod Fertil 88: S. 343–352.
- HENRIC-PETRI U (1993)  
Beeinflussung der Motilität und Morphologie von Hengstsamen durch drei Verfahren  
der Spermiselektion zu verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung  
Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation
- HOFFMANN B (2003)  
Samenbeurteilung. In: HOFFMANN B (Hrsg), Andrologie. Physiologie, Pathologie  
und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung.  
LOB.de, Lehmanns Media, Berlin , Kap. 4 S. 19-28.
- IBRAHIM ME, PEDERSEN H (1988)  
Acridine orange fluorescence as male fertility test.  
Arch Androl 20: S. 125–129.
- INSLER V, BERNSTEIN D, GLEZERMAN M, MISGAV N (1979)  
Correlation of seminal fluid analysis with mucus-penetrating ability of spermatozoa.  
Fertil Steril 32: S. 316–319.
- JAGOE JR, WASHBROOK NP, HUDSON EA (1986)  
Morphometry of spermatozoa using semiautomatic image analysis.  
J Clin Pathol 39: S. 1347–1352.
- JASKO DJ, LEIN DH, FOOTE RH (1990)  
Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and  
fertility in stallions. 66 cases (1987-1988).  
J Am Vet Med Assoc 197: S. 389–394.
- JOHNSON L, NEAVES WB (1981)  
Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm  
production in stallions.  
Biol Reprod 24: S. 703–712.

JONES R, MANN T, SHERINS R (1979)

Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma.  
Fertil Steril 31: S. 531–537.

KATILA T (2001)

In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen. a review.  
Acta Vet Scand 42: S. 199–217.

KATZ DF, OVERSTREET JW, SAMUELS SJ, NISWANDER PW, BLOOM TD,  
LEWIS EL (1986)

Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility.  
J Androl 7: S. 203–210.

Kenney RM, Hurtgen J, Pierson R, Witherspoon D, Simons J (1983)

Theriogenology and the equine, part II. the stallion.  
J Soc Theriog 9.

KIRK ES, SQUIRES EL, GRAHAM JK (2005)

Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa.  
Theriogenology 64: S. 1422–1439.

KLUG E (1993)

Frischsamenübertragung beim Pferd  
M. und H. Schaper Verlag, Alfeld-Hannover , Kap. Samenuntersuchung S. 57-69.

KLUG E, SIEME H (2003a)

Geschlechtsapparat des Hengstes In: KLUG E, SIEME H (Hrsg.), Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis  
M. und H. Schaper Verlag, Alfeld-Hannover , Kap. 3 S. 25-28.

KLUG E, SIEME H (2003b)

Samenaufbereitung In: KLUG E, SIEME H (Hrsg.), Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis  
M. und H. Schaper Verlag, Alfeld-Hannover , Kap. 9 S. 59-74.

KOHN FM, HAIDL G (2007)

Andrological diagnostics.  
Urologe A 46: S. 1557–1572.

KREMER J (1965)

A simple sperm penetration test.

Int J Fertil 10: S. 209–215.

KREMER J, JAGER S (1976)

The sperm-cervical mucus contact test. a preliminary report.

Fertil Steril 27: S. 335–340.

KREMER J, JAGER S, KUIKEN J (1977)

The meaning of cervical mucus in couples with antisperm antibodies.

In: INSLER V, BETTENDORF G (Hrsg.), The uterine cervix in reproduction; Georg Thieme, Stuttgart, Kap. 4, S.181-187

KREMER J, KROEKS MV (1975)

Modifications of the in vitro spermatozoal penetration test by means of the sperm penetration meter.

Acta Eur Fertil 6: S. 377–380.

KURZROK R., MILLER EG (1928)

Biochemical studies of human semen and its relation to mucus of the cervix uteri.

Am J Obstet Gynecol: S. 56–72.

LANDIM-ALVARENGA FC, ALVARENGA MA, Seidel, GE, Jr, SQUIRES EL, GRAHAM JK (2001)

Penetration of zona-free hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187.

Theriogenology 56: S. 937–953.

LEE WI, GADDUM-ROSSE P, BLANDAU RJ (1981)

Sperm penetration into cervical mucus in vitro. III. Effect of freezing on estrous bovine cervical mucus.

Fertil Steril 36: S. 209–213.

LEE WI, VERDUGO P, BLANDAU RJ, GADDUM-ROSSE P (1977)

Molecular arrangement of cervical mucus. a reevaluation based on laser light-scattering spectroscopy.

Gynecol Invest 8: S. 154–166.

- LEIDL W, SCHEFELS W, STOLLA R, METZGER E (1971)  
Differentiation and fertilization capacity of pathological spermatozoa.  
Dtsch Tierärztl Wochenschr 78: S. 129-32 .
- LIU DY, BAKER HW (1992)  
Tests of human sperm function and fertilization in vitro.  
Fertil Steril 58: S. 465-83.
- LIU DY, BAKER HW (2000)  
Defective sperm-zona pellucida interaction. a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization.  
Hum Reprod 15: S. 702–708.
- LIU DY, BAKER HW (2003)  
Disordered zona pellucida-induced acrosome reaction and failure of in vitro fertilization in patients with unexplained infertility.  
Fertil Steril 79: S. 74–80.
- LORTON SP, KUMMERFELD HL, FOOTE RH (1981)  
Polyacrylamide as a substitute for cervical mucus in sperm migration tests.  
Fertil Steril 35: S. 222–225.
- LOVE CC, KENNEY RM (1998)  
The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion.  
Theriogenology 50: S. 955–972.
- LOVE CC, THOMPSON JA, BRINSKO SP, RIGBY SL, BLANCHARD TL, LOWRY VK, VARNER DD (2003)  
Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry.  
Theriogenology 60: S. 1127-38.
- MALMGREN L (1997)  
Assessing the quality of raw semen. a review.  
Theriogenology 48: S. 523–530.
- MANN T, LUTWAK-MANN C (1981)  
Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids; application to andrological problems. In: MANN T, LUTWAK-MANN C (Hrsg.), Male reproductive

function and semen.

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Kap. 9 S. 267-288

MEYERS SA, LIU IK, OVERSTREET JW, VADAS S, DROBNIS EZ (1996)

Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa. comparisons between fertile and subfertile stallions.

Theriogenology 46: S. 1277–1288.

MILLS RN, KATZ DF (1978)

A flat capillary tube system for assessment of sperm movement in cervical mucus.

Fertil Steril 29: S. 43–47.

MOCE E, GRAHAM JK (2008)

In vitro evaluation of sperm quality.

Anim Reprod Sci 105: S. 104–118.

MOGHISSI KS (1972)

The function of the cervix in fertility.

Fertil Steril 23: S. 295–306.

MORRELL JM, GERAGHTY RM (2006)

Effective removal of equine arteritis virus from stallion semen.

Equine vet J 38: S. 224–229.

MORTIMER D, MORTIMER ST, SHU MA, SWART R (1990)

A simplified approach to sperm-cervical mucus interaction testing using a hyaluronate migration test.

Hum Reprod 5: S. 835–841.

MORTIMER D, PANDYA IJ, SAWERS RS (1986)

Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro.

J Reprod Fertil 78: S. 93–102.

MORUZZI JF, WYROBEK AJ, MAYALL BH, GLEDHILL BL (1988)

Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis.

Fertil Steril 50: S. 142–152.

MULLER Z (1982)

Fertility of frozen equine semen.

J Reprod Fertil Suppl 32: S. 47–51.

MULLER Z (1987)

Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen.

J Reprod Fertil Suppl 35: S. 121–125.

MURASE T, BRAUN JW (1990)

Impact of methodological factors on sperm penetration into cervical mucus in cattle.

Theriogenology 34: S. 73–80.

MURASE T, OKUDA K, SATO K (1990)

Assessment of bull fertility using a mucus penetration test and a human chorionic gonadotrophin stimulation test.

Theriogenology 34: S. 801–812.

NOLAN JP, GRAHAM JK, HAMMERSTEDT RH (1992)

Artificial induction of exocytosis in bull sperm.

Arch Biochem Biophys 292: S. 311–322.

OKOLSKI A, BABUSIK P, TISCHNER M, LIETZ W (1987)

Evaluation of mare oocyte collection methods and stallion sperm penetration of zona-free hamster ova.

J Reprod Fertil Suppl 35: S. 191–196.

PADILLA AW, TOBBACK C, FOOTE RH (1991)

Penetration of frozen-thawed, zona-free hamster oocytes by fresh and slow-cooled stallion spermatozoa.

J Reprod Fertil Suppl 44: S. 207–212.

PAGL R, AURICH JE, MULLER-SCHLOSSER F, KANKOFER M, AURICH C (2006)

Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 degrees C.

Theriogenology 66: S. 1115–1122.

PARLEVLIET JM, KEMP B, COLENBRANDER B (1994)

Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions.

J Reprod Fertil 101: S. 183–187.

PERREAULT SD, NAISH SJ, ZIRKIN BR (1987)

The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus formation is related to sperm nuclear disulfide bond content.

Biol Reprod 36: S. 239–244.

PESCH SK (2005)

Licht- und Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Hengstejakulat sowie biochemische Analysen des Seminalplasmas.

Gießen, Justus-Liebig-Universität, Dissertation

PICHARDO AI, ARAGON A, AYALA ME, DOMINGUEZ IA (2009)

Viability Tests, Active Caspase-3 and -7, and Chromatin Structure in Ram Sperm Selected Using the Swim-Up Procedure.

J Androl 31: S. 169–176.

PRICE S, AURICH J, DAVIES-MOREL M, AURICH C (2008)

Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15 degrees C.

Reprod Domest Anim 43: S. 261–266.

QUINTERO-MORENO A, MIRO J, TERESA RIGAU A, RODRIGUEZ-GIL JE (2003)

Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates.

Theriogenology 59: S. 1973–1990.

ROASA LM, CHOI YH, LOVE CC, ROMO S, VARNER DD, HINRICHS K (2007)

Ejaculate and type of freezing extender affect rates of fertilization of horse oocytes in vitro.

Theriogenology 68: S. 560–566.

RUMKE P, VAN AMSTEL N, MESSER EN, BEZEMER PD (1974)

Prognosis of fertility of men with sperm agglutinins in the serum.

Fertil Steril 25: S. 393–398.

RUNCAN EE, POZOR MA, ZAMBRANO GL, BENSON S, MACPHERSON ML (2013)

Use of two conventional staining methods to assess the acrosomal status of stallion spermatozoa.

Equine Vet J. doi: 10.1111/evj.12179

SAID TM, AGARWAL A, SHARMA RK, MASCHA E, SIKKA SC, Thomas, A. J., Jr. (2004)

Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility.

Fertil Steril 82: S. 871–877.

SAMPER JC, HELLANDER JC, CRABO BG (1991)

Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality.

J Reprod Fertil Suppl 44: S. 107–114.

SCHÄFER-SOMI S, AURICH C (2007)

Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution.

Anim Reprod Sci 102: S. 1–13.

SCHILL WB, TÖPFER-PETERSEN E, HEISLER E (1988)

The sperm acrosome: functional and clinical aspects.

Hum Reprod. 3: S. 139-45.

SCHROP H (1992)

Einfluss der Membranprotektiva Lecithin und Phenylmethansulfonylfluorid auf Motilität und Akrosomintegrität im aufgetauten Samen; Beurteilung mittels indirekter Immunfluoreszenz im Vergleich zur Spermac®-Färbung

Hannover, tierärztliche Hochschule, Dissertation

SHARARA FI, BEATSE SN, BAILEY SA, NEAL GS, Coddington, C C 3rd, Scott, R T Jr (1994)

Characterization of Tru-Trax in-vitro penetration testing of cervical mucus.

Hum Reprod. (Oxford, England) 9 (11): S. 2027–2031.

SIEME H (2009)

Instrumentelle Besamung in der Pferdezucht. In: Aurich C (Hrsg.),

Reproduktionsmedizin beim Pferd. Gynäkologie, Andrologie, Geburtshilfe ; 54

Tabellen. Parey, Stuttgart, Kap. 16 S. 317–318.

SIEME H, MARTINSSON G, RAUTERBERG H, WALTER K, AURICH C, PETZOLDT R, KLUG E (2003)

Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen.

Reprod Domest Anim 38: S. 134–140.

SIMS JM (1866)

The vagina must be capable of receiving and of retaining the spermatic fluid. In: SIMS JM, Clinical notes on uterine surgery. With special reference to the management of the sterile condition.

Hardwicke, London, Kap. VI S. 350-353.

SOTO-ALBORS C, DALY DC, YING YK (1989)

Efficacy of human menopausal gonadotropins as therapy for abnormal cervical mucus.

Fertil Steril 51: S. 58–62.

SUKCHAROEN N, KEITH J, IRVINE DS, AITKEN RJ (1995)

Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro. importance of sperm morphology and leukocyte contamination.

Fertil Steril 63: S. 1293–1300.

TWIGG J, FULTON N, GOMEZ E, IRVINE DS, AITKEN RJ (1998)

Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa. lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants.

Hum Reprod 13: S. 1429–1436.

URRY RL, MIDDLETON RG, MAYO D (1986)

A comparison of the penetration of human sperm into bovine and artificial cervical mucus.

Fertil Steril 45: S. 135–137.

VAN DER HOLST, W. (1975)

A study of the morphology of stallion semen during the breeding and non-breeding seasons.

J Reprod Fertil Suppl: S. 87–89.

VEERAMACHANENI DN, MOELLER CL, SAWYER HR (2006)

Sperm morphology in stallions: ultrastructure as a functional and diagnostic tool.

Vet Clin North Am Equine Pract 22: S. 683-92

- VIDAMENT M, COGNARD E, YVON J, M S, E P, M M (1998)  
Evaluation of stallion semen before and after freezing.  
Reprod Domest Anim 33: S. 271–277.
- VIDAMENT M, ECOT P, NOUE P, BOURGEOIS C, MAGISTRINI M, PALMER E (2000)  
Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa.  
Theriogenology 54: S. 907–919.
- VON STERN K (2001)  
Prognose der Tiefgefriereignung von Hengstsperma mit Hilfe von Funktionstests.  
Berlin, Freie Universität, Tierklinik für Fortpflanzung, Dissertation.
- WABERSKI D, SIEME H (2009)  
Andrologische und spermatologische Untersuchung  
(Zuchttauglichkeitsuntersuchung) beim Hengst. In: AURICH C (Hrsg.),  
Reproduktionsmedizin beim Pferd. Gynäkologie, Andrologie, Geburtshilfe ; Parey,  
Stuttgart, Kap.14 S. 261-263.
- WARD WS, COFFEY DS (1991)  
DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa. comparison with  
somatic cells.  
Biol Reprod 44: S. 569–574.
- WEITZE K (2001)  
Spermatologische Untersuchung. In: BUSCH W, HOLZMANN A (Hrsg.),  
Veterinärmedizinische Andrologie. Schattauer Verlag, Stuttgart, 561.Kap. 6 S. 87-  
118.
- WILHELM KM, GRAHAM JK, SQUIRES EL (1996)  
Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion  
analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration.  
Theriogenology 46: S. 559–578.
- WILSON L (1954)  
Sperm agglutinins in human semen and blood.  
Proc Soc Exp Biol Med 85: S. 652–655.

WINDSOR DP, WHITE IG (1993)

Assessment of ram sperm mitochondrial function by quantitative determination of sperm rhodamine 123 accumulation.

Mol Reprod Dev 36: S. 354–360.

YANAGIMACHI R (1972)

Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs in vitro.

J Reprod Fertil 28: S. 477–480.

YANAGIMACHI R, YANAGIMACHI H, ROGERS BJ (1976)

The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa.

Biol Reprod.15: S.471-6.

ZHANG BR, LARSSON B, LUNDEHEIM N, RODRIGUEZ-MARTINEZ H (1998)

Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls.

Int J Androl 21: S. 207–216.

ZORN B, VIDMAR G, MEDEN-VRTOVEC H (2003)

Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection.

Int J Androl 26: S. 279–285.

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.

Cerstin Blaß

## **Danksagung:**

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel Wehrend für die Überlassung des Themas und die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Klaus Failing und Frau Marion Sparenberg vom Institut für Biomathematik der JLU Gießen danke ich für die Hilfe und Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

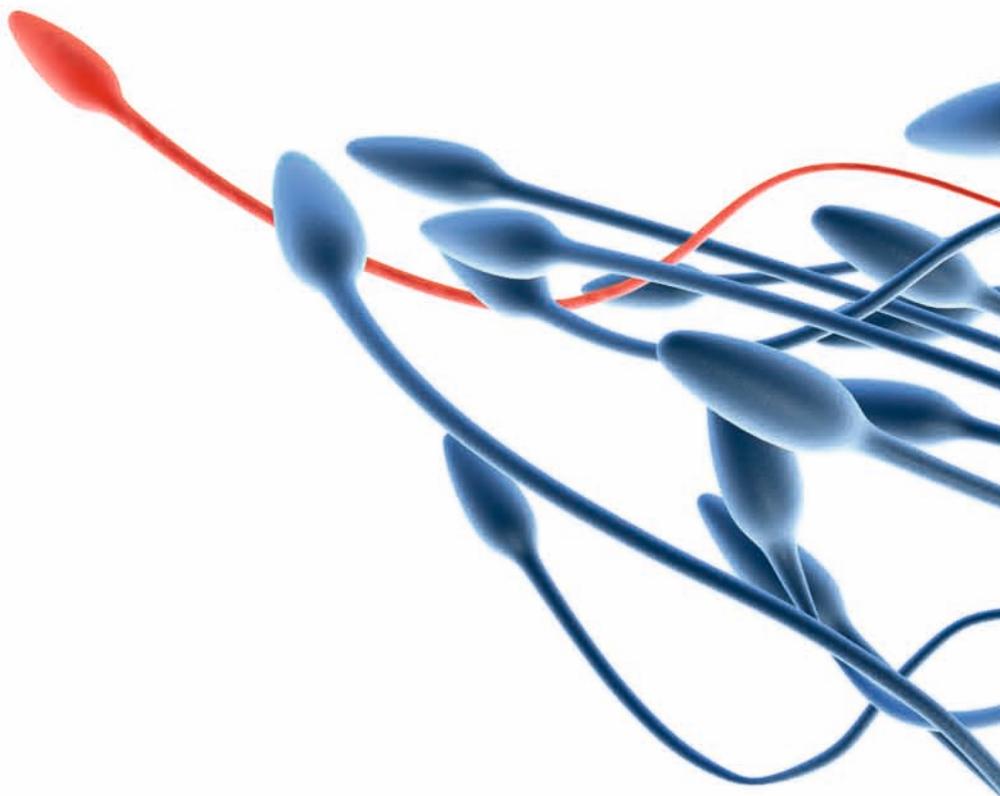
Ein besonderes Dankeschön geht an Franz Sechser für die Hilfestellung und Unterstützung in labortechnischen Fragen.

Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Rudolf Müller für sein Verständnis, seine Unterstützung und seine Hilfe danken.

Von ganzem Herzen danke ich Aolty und Michele für ihre unermessliche Geduld und unerschöpfliche Hilfsbereitschaft.

Dankeschön, Anja, du bist die Beste und hast immer ein s an der richtigen Stelle.

Nicht zuletzt möchte ich an dieser Stelle allen Menschen danken, die mich während dieser Zeit auf ihre Art unterstützt, aufgebaut und motiviert haben. Ich danke euch von Herzen, dass ihr immer an mich geglaubt habt: Uti, Simone und Björn, meiner unerschütterlichen Familie, den Adlern aus Frankfurt und dem gesamten Veterinäramt des Wetteraukreises.



*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: 978-3-8359-6267-5



9 783835 196267 5