

ETABLIERUNG EINES IN-VITRO-SPERMIEN-
PENETRATIONSTESTS ZUR ANALYSE
BOVINER SAMENZELLEN

Anja Becher



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

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

1. Auflage 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.

1st 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

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 IN-VITRO-SPERMIEN-PENETRATIONSTESTS ZUR
ANALYSE BOVINER SAMENZELLEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Anja Becher

Tierärztin aus Erfurt (Thüringen)

Gießen 2014

Gefördert durch den Förderverein für Biotechnologie e. V., Bonn

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. Klaus Doll

Tag der Disputation: 17.02.2014

Jutta und Alfred gewidmet

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. sind in Vorbereitung:

Becher A.C., Failing K., Kauffold J., Wehrend A. (2013) Establishment of a practical sperm penetration test for bovine semen. *Tierärztl Prax* 2013; 41: 297-303

Becher A.C., Failing K., Kauffold J., Wehrend A. (2014) Correlations between a new sperm penetration assay and CASA parameters in bovine semen. (im Abschluss)

In Form eines Vortrages wurde auf der „44. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung“, gleichzeitig „36. Veterinär-Humanmedizinische Gemeinschaftstagung“ vom 16. - 18. Februar 2011 in Hannover vorgestellt:

Wehrend A., Schuenemann M., Becher A., Richterich P. (2011) Development of a (Quick-) Sperm migration test in bull for everyday use. *Reproduction in Domestic Animals* 46 Suppl 1, S. 45 [Abstract]

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	In-vitro-Penetrationstests zur Beurteilung der Samenzellqualität	2
2.1.1	In-vitro-Penetrationstests in der Humanmedizin	2
2.1.2	In-vitro-Penetrationstests in der Veterinärmedizin	12
3	MATERIAL UND METHODEN	18
3.1	Herstellung der Polyacrylamid-Gele	18
3.1.1	Herstellung des 2 %-igen Polyacrylamid-Gels (PAG 2)	18
3.1.2	Herstellung des 1,9 %-igen Polyacrylamid-Gels (PAG 1,9)	19
3.1.3	Herstellung der Pufferlösungen.....	19
3.1.3.1	Herstellung von Puffer I.....	19
3.1.3.2	Herstellung von Puffer II.....	19
3.1.3.3	Herstellung von Puffer III.....	20
3.1.3.4	Herstellung der phosphatgepufferten Salzlösung zur Dialyse	20
3.2	Herstellung der Agarose-Gele	21
3.2.1	Herstellung des 0,1 %-igen Agarose-Gels	21
3.2.2	Herstellung des 0,2 %-igen Agarose-Gels	21
3.2.3	Herstellung des 0,3 %-igen Agarose-Gels	22
3.2.4	Herstellung des 0,4 %-igen Agarose-Gels	22
3.2.5	Herstellung des 0,5 %-igen Agarose-Gels	22
3.2.6	Herstellung der phosphatgepufferten Salzlösung	22
3.3	Spermavorbereitung	23
3.3.1.1	Versuchsaufbau I – Vorbereitung und Untersuchung des Tiefgefrierspermas	23
3.3.1.2	Lichtmikroskopische Beurteilung des Spermas im Eosin-Ausstrich ..	24
3.3.1.3	Computergestützte Spermaanlyse	24
3.3.2	Versuchsaufbau II – Nativsperma.....	26
3.3.2.1	Gewinnung und Untersuchung der Ejakulate	26
3.3.2.2	Einfrieren des Frischspermas.....	27
3.4	Migrationstest	28
3.4.1	Auswahl der geeigneten Kapillaren.....	28

3.4.2	Durchführung des Migrationstests mittels Polyacrylamid-Gel	28
3.4.3	Durchführung des Migrationstests mittels Agarose-Gel	30
3.4.4	Auswertung des Migrationstests	31
3.5	Statistische Auswertung.....	35
4	ERGEBNISSE	37
4.1	Vorversuche	37
4.1.1	Schwierigkeiten bei der Herstellung der synthetischen Medien	37
4.1.2	Bildung von Luftblasen.....	37
4.1.3	Auswahl der geeigneten Pailletten/Kapillaren	38
4.2	Hauptversuche.....	39
4.2.1	Versuchsaufbau I - Tiefgefrier-Samen	39
4.2.1.1	Spermatologische Parameter	39
4.2.1.2	Penetrationstest in Agarose-Gel.....	40
4.2.1.3	Penetrationstest in Polyacrylamid-Gel.....	44
4.2.1.3.1	Unterschied zwischen Ansatz 1 und Ansatz 2.....	44
4.2.1.3.2	Ergebnisse des Penetrationstests in Bezug auf die einzelnen Medien	44
4.2.1.3.3	Korrelationen zwischen den Auswertmethoden.....	53
4.2.1.3.4	Korrelationen zwischen den Auswertmethoden und Parametern der spermatologischen Untersuchung.....	56
4.2.2	Versuchsaufbau II - Nativsperma.....	62
4.2.2.1	Einfluss der Behandlung der Ejakulate.....	62
4.2.2.2	Ergebnisse des Penetrationstests vor und nach Kryokonservierung.	69
5	DISKUSSION.....	74
5.1	Diskussion der Fragestellung.....	74
5.2	Diskussion der Methode	75
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	78
5.3.1	Penetrationsmedium	78
5.3.2	Auswertung des Penetrationstests.....	79
5.3.3	Auswertmethoden und spermatologische Untersuchung	80
5.3.4	Puffer	82
5.3.5	Behandlung der Samenzellen	83
5.3.6	Ergebnisse des Penetrationstests vor und nach Kryokonservierung	84

5.3.7	Empfehlung zur Durchführung des Kapillarpenetrationstestes	86
5.3.8	Weiterer Forschungsbedarf.....	86
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	87
7	SUMMARY	89
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	91

1 Einleitung und Fragestellung

Zu den Standardverfahren der Ejakulatbeurteilung in der Veterinärmedizin gehören die makroskopische Untersuchung, die chemisch-physikalische und die mikroskopische Untersuchung. Um den diagnostischen Wert der Spermauntersuchung zu erhöhen, wurden komplexere Methoden entwickelt, wie beispielsweise die biochemische Untersuchung des Seminalplasmas oder die DNA-Analyse der Spermatozoen mittels Spermien-Chromatin-Test. Auch mit In-vitro-Funktionstests wird seit vielen Jahren gearbeitet. Diesen zusätzlichen Analysemethoden gemein sind in vielen Fällen der hohe technische Aufwand und die Notwendigkeit von Spezialkenntnissen bei der Durchführung. Ein einfach durchführbarer und günstiger Funktionstest, der in der Humanmedizin zu den Standardverfahren der Infertilitätsdiagnostik zählt und durch die World Health Organisation in einer standardisierten Technik empfohlen wird, ist der sogenannte Spermien-Mukus-Penetrationstest. Dieser Test wird regelmäßig in wissenschaftlichen Arbeiten auch für den veterinärmedizinischen Einsatz getestet, er hat jedoch bisher keinen Eingang in die Standard-Samenanalyse gefunden. Infolge dessen kristallisierte sich nach eingehender Literaturrecherche zu diesem Thema als Ziel der vorliegenden Arbeit heraus, einen einfachen, kostengünstigen In-vitro-Penetrationstest für bovine Samenzellen auf Grundlage eines synthetisch hergestellten Mediums zu etablieren und im Studienverlauf folgende Fragen zu klären:

- Welches artifizielle Medium eignet sich zur Etablierung des Spermien-Penetrationstests (SPT)?
- Welche der bis dato in der Literatur vielfältig beschriebenen Methoden zur Testauswertung kann als Standardverfahren empfohlen werden?
- Spiegelt sich eine künstlich erzeugte Schädigung der eingesetzten Samenzellen im Ergebnis des SPT wider?
- In welchem Zusammenhang stehen die Ergebnisse des SPT mit den Resultaten der klassischen spermatologischen Analyse?
- Inwieweit kann der an Frischsamen durchgeführte SPT Aufschluss geben über die Qualität der Samenzellen nach Kryokonservierung?

2 Literaturübersicht

2.1 In-vitro-Penetrationstests zur Beurteilung der Samenzellqualität

2.1.1 In-vitro-Penetrationstests in der Humanmedizin

Beim menschlichen Koitus wird das Ejakulat vaginal abgesetzt. Demzufolge besteht das erste natürliche Hindernis der Spermien nach der Ejakulation darin, die Barriere, die der weibliche Zervikalmukus darstellt, zu überwinden. Vermögen die Spermien den Mukus nicht zu durchqueren, kann dies in Infertilität resultieren (REICHMAN et al., 1973; FENEUX et al., 1985). Im Umkehrschluss liegt dementsprechend die Annahme nahe, die Penetrationsfähigkeit der Spermien könnte zu einer objektiven Aussage über die Qualität des Ejakulates verhelfen.

Bereits 1867 beschrieb SIMS einen ersten In-vivo-Postkoitaltest, mit dem er die Interaktion zwischen Spermien und Zervikalmukus beobachtete und beurteilte, indem er postkoital Zervikalmukus mikroskopisch auf das Vorhandensein von Spermien sowie deren Morphologie und Bewegungsmuster untersuchte. Aufgrund fehlender Standardisierbarkeit der Testdurchführung und vielfältiger Interpretationsmöglichkeiten der Resultate war es allerdings nicht möglich, Rückschlüsse auf die Fertilität zu ziehen (MOGHISSI, 1972). Vor rund 100 Jahre ergaben Studien, dass Postkoitaltest-Resultate zwischen fertilen und infertilen Paaren nicht signifikant verschieden waren (DANEZIS et al., 1962).

KURZROK und MILLER (1928) begründeten die Entwicklung von In-vitro-Penetrationstests, indem sie den Zervikalmukus einer Frau auf einem Objektträger ausstrichen, mit einem Deckglas bedeckten und einen Tropfen Sperma an den Rand des Deckglases brachten. So war es möglich, erste Aussagen über die Interaktion zwischen Mukus und Spermien zu treffen. Allerdings war auch hier eine Standardisierung des Tests, beispielsweise hinsichtlich Tiefe der Mukusschicht oder Größe und Form der Sperma-Mukus-Übergangsstelle, nicht möglich.

Einen standardisierbaren und somit objektiveren Test beschrieb KREMER (1965). Bei Paaren mit Fertilitätsproblemen entnahm man der Frau während der Ovulationsperiode Zervikalmukus, füllte ihn in Kapillarröhrchen, verschloss ein Ende und brachte die offene Seite in Kontakt mit dem zu testenden Samen unter Zuhilfenahme eines eigens entwickelten „sperm penetration meters“ (SPM, Abb. 1,

Abb. 2). Der gesamte Penetrationsapparat wurde danach bei 37 °C inkubiert und regelmäßig mittels Phasenkontrastmikroskop durchmustert, um die Penetrationsdistanz, -richtung und -geschwindigkeit der Spermien zu studieren. Hierbei wurde beobachtet, dass sich der größte Teil der Spermien parallel zur Kapillare zum anderen Ende hin vorwärts bewegte. Als problematisch stellte sich allerdings die Rundung der Kapillare heraus. Direkt unter der Glaswand waren die Spermien sehr gut zu beurteilen, in der Mitte des Röhrchens jedoch zum Teil nur durch ihre Vorwärtsbewegung zu identifizieren.

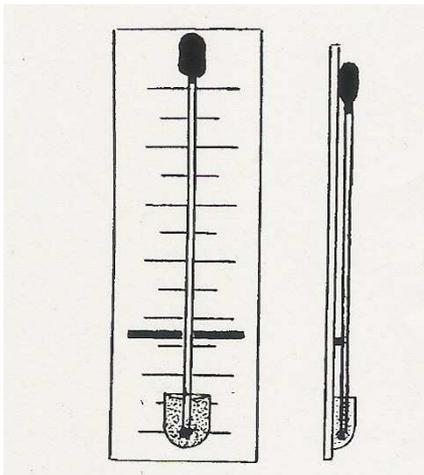


Abb. 1: sperm-penetration-meter
nach KREMER (1965), einfach

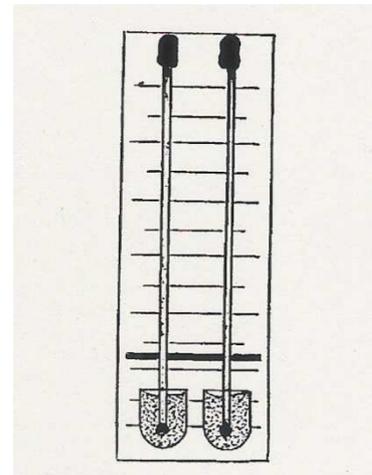


Abb. 2: sperm-penetration-meter
nach KREMER (1965), doppelt

FJÄLLBRANT und ACKERMANN (1969) führten einige Modifikationen des SPT durch. Sie benutzten Kapillaren mit einem kleineren Durchmesser. Dies ermöglichte es, eine größere Anzahl von Kapillaren mit der gleichen Zervikalmukus-Probe zu befüllen und anschließend in größerem Umfang Tests durchzuführen, die somit die gleichen Ausgangsvoraussetzungen erfüllten. Des Weiteren wurden die befüllten Kapillaren nicht mehr bei +4 °C, sondern bei -70 °C gelagert, nachdem sich gezeigt hatte, dass dies die Durchdringbarkeit des Mukus nicht veränderte.

DAVID et al. (1979) führten den SPT mit Glaskapillaren und humanem Mittzyklusmukus durch im Vergleich zur konventionellen Samenanalyse. Es ergab sich eine starke Korrelation zwischen SPT und Motilität und Vitalität der Spermien, die Spermienkonzentration hingegen korrelierte nur schwach mit den Ergebnissen

des SPT. Somit stellten die Autoren die Spermienmotilität und –morphologie als wichtigste die Penetrationsfähigkeit beeinflussende Parameter heraus.

In der weiteren Entwicklung des SPT wurden flache Kapillaren eingesetzt, um der Rundungsungenauigkeit entgegenzuwirken (MILLS und KATZ, 1978), und Motilität und Geschwindigkeit der in den Mukus penetrierenden Spermien wurden per Photomikrographie ermittelt (KATZ et al., 1980). Die Autoren berechneten die Korrelation der Anzahl erfolgreich migrierter mit der Anzahl der insgesamt mit dem Mukus kollidierten Spermien, eine Signifikanz ergab sich hierbei nicht.

GADDUM-ROSSE et al. (1980a) stellten erstmals speziesübergreifende Vergleiche der Interaktion zwischen Spermatozoen und Zervikalmukus an. Sowohl bei Sperma von Bullen als auch bei menschlichem Sperma konnte die Ausprägung der Penetration sowie das Muster der Spermienbewegung durch vorherige Manipulation des Mukus beeinflusst werden. Wird der Mukus ohne weitere Dehnung auf einem Objektträger ausgebreitet und die Spermien rundherum an den Rand des Mukus gebracht, ordnen sich die eingedrungenen Spermien in Keilform an und richten sich mehr oder weniger zum Zentrum des Mukus aus. Streckt man den Mukus jedoch in die Länge, bringt ihn in dieser Form auf einem Objektträger auf und bringt dann die Spermien an einer Seite in Verbindung mit dem Mukus, richten sich über 90 % zur Längsachse des Mukus aus und durchqueren selbigen mit erhöhter Geschwindigkeit, wobei sowohl humane als auch bovine Spermien eine ausgeprägte Rotation um die Längsachse zeigten. Die Autoren widersprechen damit der bis dato gängigen Auffassung, Mittzyklus-Zervikalmukus sei ein starres Netzwerk aus Aggregaten von langen Glycoprotein-Molekülen, die parallel zueinander ausgerichtet und in regelmäßigen Abständen untereinander vernetzt seien (ODEBLAD, 1968, 1977) und folgen der Theorie von LEE et al. (1977), wonach Zervikalmukus aus einem Ensemble zufällig verbundener Makromoleküle mit inter- und intrakettigen Verflechtungen bestünde. Durch das Ausdehnen des Mukus werden dieser Theorie zufolge die Makromoleküle auseinandergezogen und linear zueinander angeordnet, was den Spermien größere Aktionsfreiheit und damit einhergehend höhere Geschwindigkeiten erlaubt. Ferner zeigten die Autoren, dass Spermatozoen von Kaninchen, Meerschweinchen, Ratten und Mäusen nicht in der Lage sind, mittzyklischen humanen bzw. östrischen bovinen Mukus zu penetrieren. Des Weiteren fanden die Autoren (GADDUM-ROSSE et al., 1980b) heraus, dass sich

humane Spermien schneller durch Zervikalsekret von östrischen Rindern bewegen als durch humanen Mukus. Hierbei wurden sowohl Bewegungsmuster anhand des oben beschriebenen Objektträger-Testes beurteilt als auch die zurückgelegte Strecke in Versuchen mit flachen Kapillaren gemessen. Letztere zeigten zunächst ein schnelles Eindringen der humanen Spermien in den bovinen Mukus und eine fast 100 %-ig gerade ausgerichtete Bewegung aller Spermatozoen. Diese Unidirektionalität nahm jedoch mit fortschreitender Zeit ab, und nach etwa ein bis zwei Stunden schien sich der Großteil der Spermien in zufällige Richtungen zu bewegen. Weiterhin sind humane Spermatozoen nicht in der Lage, Mukus von Kühen zu penetrieren, der in der Lutealphase entnommen wurde, was auf den geringeren Wassergehalt im Mukus zurückgeführt wird (LEE et al., 1977, GADDUM-ROSSE et al., 1980b).

In den folgenden Jahren wurde in der Humanmedizin dazu übergegangen, bovinen östrischen Zervikalmukus als Substitut für humanes Zervikalsekret zu verwenden, da er zum einen in Bezug auf viskoelastische Eigenschaften dem humanen Pendant sehr ähnlich ist (LEE et al., 1977; GADDUM-ROSSE et al., 1980a; ALEXANDER, 1981), zum anderen bis zu vier Wochen bei -12 °C lagerfähig ist, ohne seine Eigenschaften signifikant zu verändern (BLANDAU et al., 1978; LEE et al., 1981) und nicht zuletzt in größeren Mengen leicht zu gewinnen ist (BLANDAU et al., 1978; BERGMAN et al., 1981).

Mit dem Ziel, eine verlässliche Methode für die Verwendung von bovinem Zervikalmukus in der humanen Spermaanlyse zu etablieren, führten BERGMAN et al. (1981) einem vergleichenden Test zwischen frischem bovinem (fbZM), tiefgefrorenem bovinem (TGbZM) sowie frischem humanem (hZM) Zervikalmukus durch. Dazu wurde jede Samenportion gedrittelt, und je ein Teil für die Penetration in fbZM, in TGbZM und in hZM genutzt. Die Korrelationen der Penetrationswerte zwischen den drei verschiedenen Medien waren hochsignifikant. Aufgrund der Schwierigkeiten beim Gewinn von humanem Zervikalmukus in für den Test ausreichenden Mengen regten die Autoren an, kastrierte Kühe als Spender zu verwenden, deren Mukusproduktion über Östrogenbehandlung gesteuert wird. Das Anlegen einer Zervikalmukus-Bank mit entsprechender Lagerung bei -20 °C würde es vereinfachen, den Penetrationstest als Standardverfahren in der humanen Reproduktionsmedizin zu etablieren. Als empfehlenswert hielten die Autoren

Letzteres, da mit einem einzigen Test zugleich Aussagen über die Fähigkeit der Spermien, Zervikalmukus zu penetrieren, über Motilität und Vitalität sowie über morphologische Eigenschaften der Spermien (DAVID et al., 1979) gemacht werden können.

Nach der von LORTON et al. (1981) veröffentlichten Entwicklung eines Polyacrylamid-Gels als standardisierbaren Ersatz für bovinen Zervikalmukus wurden die zunächst mit bovinem Ejakulat durchgeführten Versuche mit humanen Spermien fortgesetzt (GOLDSTEIN et al., 1982). Das synthetische Gel wurde nach der bereits beschriebenen Rezeptur (LORTON et al., 1981) angefertigt, und es zeigte sich, dass die Migrationsdistanz parallel zur Motilität der Spermien sank. GOLDSTEIN et al. (1982) empfahlen abschließend, Polyacrylamid-Gel in der Infertilitätsdiagnostik als Ersatz für humanen Zervikalmukus einzusetzen, da es im Gegensatz zu bovinem Zervikalmukus unter sterilen Bedingungen hergestellt werden kann.

MOGHISSI et al. (1982) führten einen weiteren Vergleichstest zwischen humanem und bovinem (bZM) Mukus im Penetrationstest mit Hilfe flacher Kapillaren durch, und es resultierte eine signifikant kürzere Penetrationsdistanz des bZM durch humane Spermien. Gleichsam fanden die Autoren eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Penetration von bZM und der von hZM. Die Penetrationsdistanz korrelierte bei beiden Mukusarten signifikant mit der Spermienanzahl sowie der Motilität. Des Weiteren stellten die Autoren eine positive Korrelation zwischen der Morphologie der Spermien und der Spermienmigration in bZM fest: je höher der Anteil morphologisch intakter Spermien war, desto weiter migrierten sie in den Mukus.

In einem Folgeversuch aus dem gleichen Institut resultierte eine weniger starke Korrelation zwischen den Penetrationsraten der Spermien in beiden Medien (HAYES et al., 1984). Die Autoren führen dies darauf zurück, dass in der vorausgehenden Studie (MOGHISSI et al., 1982) der Mukus Spenderinnen entnommen wurde, während bei HAYES et al. (1984) alle Probandinnen Teil eines infertilen Paares waren. Ein signifikanter Unterschied in den Ergebnissen des Penetrationstests unter Verwendung von humanem Zervikalmukus zwischen Spenderpaaren und wegen Infertilitätsproblemen vorstelliger Paare wurde später nachgewiesen (JONSSON et al., 1986).

FENEUX et al. (1985) untersuchten per Mikrokinematografie das Ejakulat von vier sterilen Männern. Die Spermien hatten zuvor im Mukuspenetrationstest ein völliges Unvermögen gezeigt, durch humanen Zervikalmukus zu migrieren. Bei allen vier Probanden wiesen die Spermatozoen ein abweichendes Bewegungsmuster auf: die Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung war sehr klein, ebenso wie die Amplitude der Welle, die das Flagellum ausführte. Dies resultierte in einer niedrigeren Schlageffizienz bei höherer Schlagfrequenz im Vergleich zu den Spermien der Kontrollgruppe. Auch JEULIN et al. (1985) stellten fest, dass weiblicher Zervikalmukus als effektive Barriere für abnormal geformte Spermien dient. Sie analysierten zwanzig Spermaproben vor und nach der Durchführung des SPT. Es stellte sich heraus, dass der Prozentsatz normal geformter Spermien im Zervikalmukus signifikant erhöht war. Gleichzeitig war der Prozentsatz von Spermien mit pathomorphologischen Kennzeichen im Mukus signifikant erniedrigt. MORTIMER et al. (1986) und FREUNDL et al. (1988) bestätigten diese Ergebnisse in eigenen Versuchsreihen.

Um den prognostischen Wert eines Penetrationstestes im Hinblick auf nachfolgende In-vitro-Fertilisation (IVF) herauszufinden, führten DE GEYTER et al. (1988) im Vorfeld der IVF den Penetrationstest sowohl mit humanem als auch mit bovinem Zervikalmukus durch. Zum Einsatz kam hierbei in Bezug auf bovinen Mukus ein bereits etabliertes kommerzielles Testkit (KEEL et al., 1987; GALLI et al., 1991), für die Testdurchführung mit humanem Mukus wurden Kapillaren verwendet, die dem kommerziellen Produkt in Größe und Material entsprachen. Die Ergebnisse wurden zwei Stunden sowie 24 Stunden nach Inkubationsbeginn abgelesen. Parallel zu den Penetrationstests erfolgte die Beurteilung der eingesetzten Ejakulate zusätzlich zum einen auf konservative Weise durch einen Untersucher, zum anderen durch computerassoziierte Spermaanlyse. Signifikante Korrelationen wurden zwischen dem Ergebnis der IVF – ausgedrückt als Prozentsatz der befruchteten Eizellen - und der Migrationsdistanz des vordersten Spermiums ($p < 0,001$) sowie der Penetrationsdichte an willkürlich festgelegten Punkten der Kapillare (1 cm und 4,5 cm; $p < 0,05$) des Penetrationstests mit bovinem Zervikalmukus gefunden. Der Penetrationstest mit humanem Zervikalmukus erbrachte keine Korrelation von statistischer Signifikanz. Da in der Spermaanlyse lediglich ein Parameter, die Gesamtmotilität, eine statistisch signifikante Korrelation mit der Oozyten-

Fertilisationsrate aufwies, verweisen DE GEYTER et al. (1988) darauf, dass die Analyse jedes einzelnen Spermienparameters den SPT in seinem prognostischen Wert für die IVF nicht zu ersetzen vermag. BARRATT et al. (1989) kommen zu ähnlichen Ergebnissen.

MORTIMER et al. (1990) entwickelten einen synthetischen Mukus auf Basis eines Phosphatpuffers mit Hyaluronsäurezusatz, der sich als geeignet erwies, als Kontrolle für den mit humanem oder bovinem Zervikalmukus durchgeführten SPT zu dienen bzw. ihn gänzlich zu ersetzen. Penetrationstestvergleiche unter Verwendung von vier verschiedenen Medien – humaner Zervikalmukus, boviner Zervikalmukus, humanes Seminalplasma und Hyaluronsäure – ergaben die beste Reproduzierbarkeit beim Einsatz von Hyaluronsäure (NEUWINGER et al., 1991). Vergleiche zwischen kommerziell erhältlichen Testkits, die entweder bovinen Zervikalmukus (Penetrak®) oder ein Hyaluronsäure-Medium (Sperm Select®) enthielten, ergaben hochsignifikante Korrelation zwischen beiden (AITKEN et al., 1992).

NIEDERBERGER et al. (1993) ermittelten im Vergleich zweier kommerzieller, mit bovinem Zervikalmukus befüllter Penetrationstest-Kits (Penetrak®, Serono Laboratories, Norwell, MA und Tru-Trax®, Humagen, Charlottesville, VA, Abb. 3), die Penetrationsdistanz, die das vorderste Spermium zurückgelegt hatte, und befanden beide Tests als verlässlich und reproduzierbar. Zudem konnte in beiden eine signifikante Korrelation zwischen den Penetrationsresultaten und der Motilität bzw. der Dichte festgestellt werden.

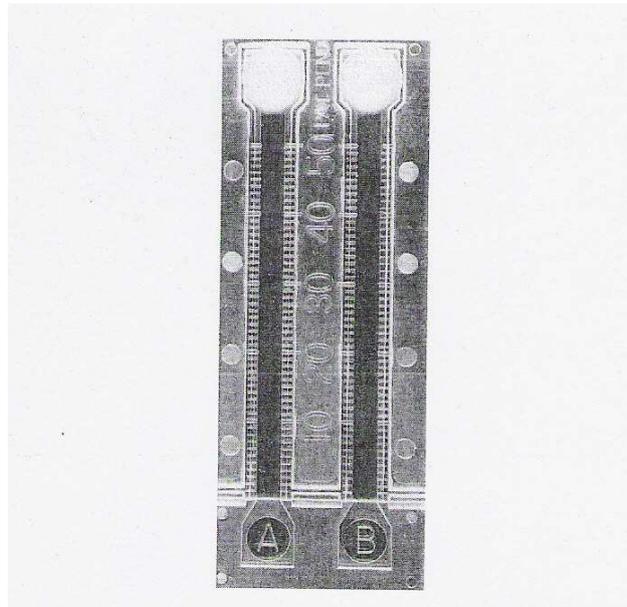


Abb. 3: Tru-Trax-System. Die beiden parallel verlaufenden Kammern können mit humanem oder bovinem Zervikalmucus befüllt werden, die unteren Reservoire werden mit dem zu testenden Sperma befüllt, und anhand der Millimeter-Skala kann das Ergebnis lichtmikroskopisch abgelesen werden (NIEDERBERGER et al., 1993)

In dem seit 1980 in bereits drei Auflagen verlegten Laborhandbuch trug die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) der Notwendigkeit der Standardisierung von gängigen Untersuchungsmethoden menschlichen Ejakulates Rechnung. Bezüglich des SPT mittels Kapillaren empfiehlt die WHO in ihrem aktuellen Handbuch (WHO, 2010) die Konstruktion eines „Kremer sperm penetration meters“ (KREMER, 1965; Abb. 4).

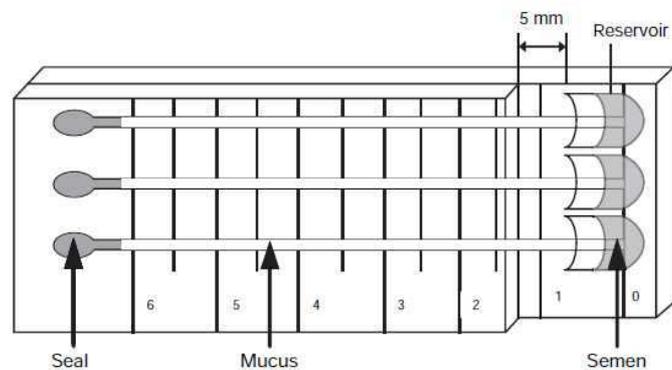


Abb. 4: Konstruktionsempfehlung eines „Kremer sperm penetration meters“ (WHO, 2010)

Literaturübersicht

Humanes Zervikalsekret sollte bläschenfrei in die Kapillare gesaugt werden, das obere Ende des Röhrchens wird mit einem Abdicht-Kitt verschlossen. Der Mukus sollte am gegenüberliegenden, freien Ende etwas hervortreten. Etwa 100 µl frischen Samens werden spätestens eine Stunde nach Ejakulation in das jeweilige Samenreservoir des Penetrationsapparates pipettiert und die Kapillare wird dann mit dem offenen Ende so auf dem Objektträger fixiert, dass der Mukus mit dem Samen in Kontakt kommt. Nach horizontaler Inkubation bei 37 °C in feuchter Umgebung für zwei Stunden findet die Durchmusterung der Kapillaren bei 100-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes statt. Aufgenommen werden hierbei die Penetrationsdistanz des vordersten Spermatozoons und die Spermiendichte bei 1 cm und 4,5 cm.

Zur Bestimmung der Spermiendichte erfolgt zunächst die Schätzung der Spermienanzahl in fünf aneinandergrenzenden Gesichtsfeldern an beiden Punkten, danach wird eine Rangfolge gemäß Tabelle 1 vergeben. Der jeweils höchste Rang wird zur weiteren Klassifikation festgehalten.

Literaturübersicht

Tab. 1: Rangfolge der Penetrationsdichte nach WHO (2010)

Mittlere Spermienanzahl pro Gesichtsfeld	Rangfolge
0	1
0-5	2
6-10	3
11-20	4
21-50	5
51-100	6
>100	7

Basierend auf der ermittelten Penetrationsdichte empfiehlt die WHO weiter die Bestimmung der Migrationsreduktion, die über die Differenz der Rangfolge bei 4,5 cm und 1 cm erfolgt und als Migrationsreduktionswert ausgedrückt wird. Sollte die Migrationsdichte von 1 cm bis 4,5 cm steigen, beträgt der Migrationsreduktionswert = 0. Zur Interpretation der Resultate des Kapillartests kann Tabelle 2 herangezogen werden.

Tab. 2: Klassifikation der Resultate des Kapillartests nach WHO (2010)

Migrations- distanz (cm)		Höchste Penetrations- dichte (Spermienanzahl pro Gesichtsfeld bei 1 oder 4,5 cm)		Migrations- reduktion von 1 bis 4,5 cm (Differenz der Rangfolge)		Dauer der Vorwärts- bewegungen im Mukus (Std.)	Klassifikation
1		0		-		-	negativ
< 3	oder	< 10	oder	> 3	oder	2	schlecht
4,5	und	> 50	und	< 3	und	> 24	gut
Alle anderen Kombinationen der Resultate							ausreichend

2.1.2 In-vitro-Penetrationstests in der Veterinärmedizin

Auch bei den Scheidenbesamern unter den Haussäugetieren wie beispielsweise Rind, Schaf und Ziege (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001) müssen die Spermazellen nach erfolgter Bedeckung durch zervikalen Mukus migrieren, um in den Uterus zu gelangen. Von dort aus werden sie hauptsächlich über uterine Muskelbewegungen zum Ovidukt transportiert (VERBERCKMOES et al., 2002).

Nachdem schon von GADDUM-ROSSE et al. (1980b) empfohlen wurde, bovines Zervikalsekret als Substitut für humanes Zervikalsekret im reproduktionsmedizinischen Bereich der Humanmedizin zu nutzen, wandten sich KUMMERFELD et al. (1981a) erstmals in der SPT-Forschung gänzlich veterinärmedizinischen Fragestellungen zu. Mit dem Ziel, eine Korrelation zwischen SPT und Fertilität bei Bullen festzustellen, führten die Autoren den Test mit kryokonserviertem Samen hochfertiler Holstein-Bullen und bovinem Zervikalmukus durch. Als Fertilitätsindikator diente die 59-Tage-Non-Return-Rate, die bei allen getesteten Bullen zwischen 68 und 78 % lag. In dieser Studie korrelierte die Mukuspenetration nicht mit dem Fertilitätslevel. Die Autoren führen dies auf die dicht beieinanderliegenden Fruchtbarkeitsleistungen der von ihnen getesteten Bullen zurück und betonen die Notwendigkeit, gleichartige Experimente mit subfertilen Bullen durchzuführen, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erlangen. Studien zur Lagerfähigkeit von bovinem Zervikalmukus ergaben einen signifikant negativen Einfluss der Lagerungsdauer auf die Penetrationsdistanz sowie keinen Einfluss der Lagermethode (KUMMERFELD et al., 1981b).

Eine signifikante Korrelation zwischen SPT und Konzeptionsrate zeigte sich in einem modifizierten SPT, bei dem jede Kapillare horizontal auf einem Objektträger befestigt und die Samenprobe am offenen Ende der Kapillare auf den Objektträger gegeben wurde (MURASE et al., 1990). Ein Deckgläschen wurde über das Ende der Kapillare und den Ejakulattropfen gelegt, rundherum mit flüssigem Paraffin abgedichtet (Abb. 5) und so inkubiert. Die Autoren empfahlen, den SPT als Screening-Methode einzusetzen, um Bullen mit einer Konzeptionsrate von weniger als 60 % ausfindig machen zu können. Die Ausrichtung der Kapillare während der Inkubation hatte keinen Einfluss auf die Penetrationsdistanz, die Inkubation bei Raumtemperatur erbrachte jedoch signifikant niedrigere Penetrationsdistanzen als die Inkubation bei 38°C (MURASE et al., 1999), ein ähnlicher Einfluss der Umgebungstemperatur

wurde in Studien zum SPT mit ovinem Samen festgestellt (MOLE und FITZGERALD, 1990).

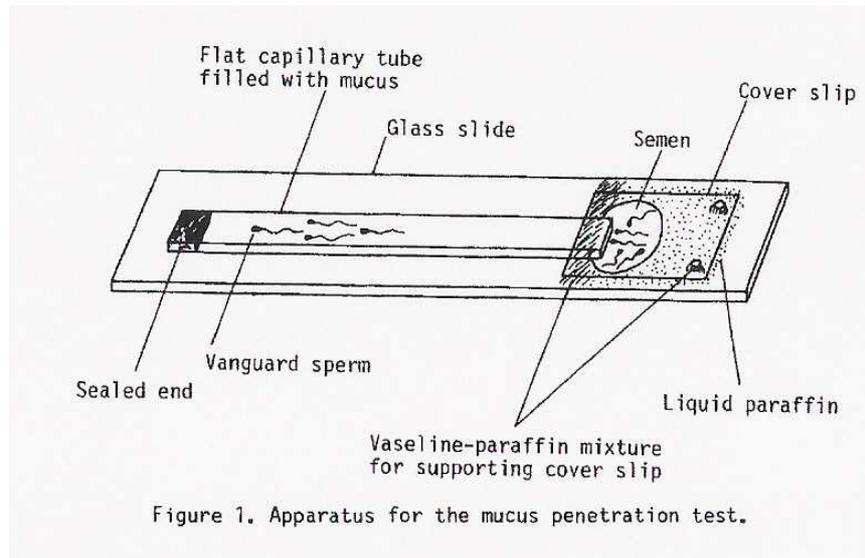


Abb. 5: Penetrationstest - Aufbau nach MURASE et al. (1990); die Sperma-Mucus-Interaktionszone wird mittels Deckglas und Paraffin abgedichtet

Aufgrund der großen Abhängigkeit der Mukuseigenschaften vom humanen bzw. bovinen Spender einerseits und den Lagerungsbedingungen andererseits sowie der damit einhergehenden fehlenden Uniformität des Penetrationstests wurden synthetische Medien als Ersatz für Zervikalmucus gesucht. LORTON et al. (1981) verwendeten hierzu erstmals Polyacrylamid-Gel (PAG) und stellten Medien in Konzentrationen von 1 bis 3 % PAG her und führten Vergleichsstudien mit bovinem Zervikalmucus durch. Von den verschiedenen getesteten Gel-Konzentrationen entsprach das Medium mit einer Konzentration von 1,8 % PAG dem natürlichen Mucus am ehesten und erzielte die besten Ergebnisse in Bezug auf Spinnbarkeit, parallele Orientierung der migrierenden Spermien sowie Penetrationsdistanz. Zusätzlich stellte sich heraus, dass auch nach einer Aufbewahrung des Polyacrylamid-Gels bei 4 °C für vier Monate keine Verschlechterung der Penetrationseigenschaften zu verzeichnen war. Zervikalmucus verschiedener Kühe führte zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen bei Verwendung identischer Ejakulate (LORTON et al., 1981, MATOUSEK et al., 1989, MURASE und BRAUN, 1990), während sich die SPT-Resultate in unabhängig voneinander hergestellten

PAG-Medien nicht voneinander unterschieden (LORTON et al., 1981), wenngleich sich die mittleren Penetrationsdistanzen in Zervikalmukus als höher erwiesen als in PAG (ANILKUMAR et al., 2001).

GALLI et al. (1991) verwendeten einen in der Humanmedizin bereits etablierten kommerziellen Penetrationstest-Kit (Penetrak®, Fa. Serono Diagnostik, Braintree, MA), der standardisierten bovinen Zervikalmukus enthielt, um bovinen Tiefgefriersperma dem Migrationstest zu unterziehen. Als Penetrationsdistanz wurde die Strecke festgelegt, die A) bei 21 °C und B) bei 37 °C von C) der vordersten mobilen Samenzelle bzw. D) der großen Masse noch mobiler Spermien innerhalb von 90 Minuten zurückgelegt wurde. Die höchsten Korrelationskoeffizienten wurden methodisch durch Messen der Penetrationsdistanz des vordersten mobilen Spermiums bei einer Temperatur von 37 °C erreicht. Die Autoren stellten einen signifikanten Unterschied zwischen der Vorwärtsbeweglichkeit von Proben mit einer Penetrationsdistanz von ≤ 20 mm und solchen mit einer Penetrationsdistanz von > 20 mm fest. Zudem fanden sie keine Korrelation zwischen der Penetration von bovinem Zervikalmukus und der Fertilität der getesteten Bullen. Unter Verwendung des gleichen kommerziellen Penetrations-Kits kamen CORREA et al. (1997) zu dem Ergebnis, dass die Penetrationsdistanz der Spermien hochfertiler Bullen nach 30-minütiger Inkubationszeit bei 37 °C mit > 20 mm deutlich größer war als bei Bullen mit geringerer Fertilität, die innerhalb von 30 Minuten die 20 mm-Marke nicht überschritten.

Um unter Feldbedingungen und in Entwicklungsländern einfach und kostengünstig die Qualität des Spermas von Schafböcken feststellen zu können, entwickelten SUTTIYOTIN et al. (1991; 1992) einen modifizierten SPT. Der entscheidende Unterschied zu allen zuvor entwickelten Testvariationen war die Ablesbarkeit der Penetrationsdistanz mit bloßem Auge. Die Autoren verwendeten als synthetisches Medium eine TRIS-Glukose-Lösung. Nach fünfzehnminütiger Inkubationszeit bei 37 °C wurde die Kapillare aus dem Spermienreservoir entfernt und die Höhe des getrübbten Abschnitts makroskopisch auf den nächsten Millimeter gerundet abgelesen und als Penetrationsdistanz statuiert. Aus den Versuchen resultierte eine signifikante Korrelation zwischen der Penetrationsdistanz und der Non-Return-Rate sowie der Konzeptionsrate.

Im Rahmen von Funktionstests zur Tiefgefriereignung von Hengstsperma wurde der SPT unter Einsatz eines hyaluronsäurehaltigen Mediums durchgeführt (VON STERN, 2001). Im Test waren sowohl natives als auch flüssig- und kryokonserviertes Sperma. Ausschließlich beim Tiefgefriersperma war die Penetrationsstrecke positiv mit dem prozentualen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien korreliert. Die Autorin folgerte daraus, dass die Penetrationsstrecke bei Nativsamen nicht mit der Vorwärtsbeweglichkeit korreliert und somit einen unabhängigen Parameter zur Beurteilung darstellt.

Eine selbstentwickelte Testtechnik setzten TAS et al. (2007a) ein, um die Frage nach einer Relation zwischen dem Zervikalmukus-Penetrationstest und der Fertilität von Bullen zu beantworten. Verwendet wurde Tiefgefriersperma von sechs anhand ihrer 60-90-Tage Non-Return-Rate in zwei Fertilitätsgruppen eingeteilten Holstein-Friesian-Bullen. Zervikalmukus östrischer, geschlechtsgesunder Kühe wurde in Plastikpailletten aufgezogen, die zuvor bei 3,25 cm, 3,5 cm, 5,0 cm und 5,25 cm vom offenen Ende aus markiert worden sind (Abb. 6). Die Inkubation der vertikal ausgerichteten Pailletten in Spermareservoirs von 500 µl erfolgte bei 37 °C und 41 °C.

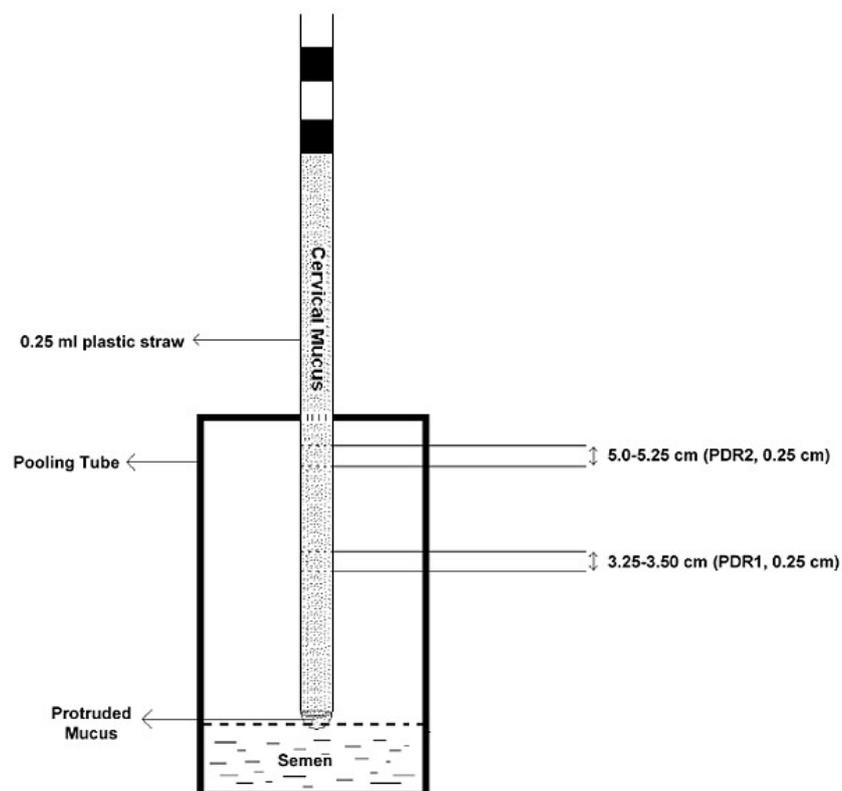


Abb. 6: Penetrationstest–Aufbau nach TAS et al. (2007a)

Anschließend wurden lediglich die beiden markierten je 2,5 mm langen Stellen ausgeschnitten – definiert als Penetrationsdistanzbereich 1 und 2 (penetration distance range, PDR1 und PDR2) – und die darin befindlichen Spermien per Phasenkontrastmikroskop gezählt. Mit dieser Methode des SPT fanden TAS et al. (2007a) signifikante positive Korrelationen zwischen den Non-Return-Raten der Bullen und den Spermienkonzentrationen im PDR1 und PDR2 sowohl bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C als auch bei 41 °C. Zudem war die Anzahl der Spermien der hochfertilen Gruppe in PDR2 bei 37 °C sowie in PDR1 und PDR2 bei 41 °C signifikant höher als die der geringer fertilen Gruppe. Die Autoren ziehen aus ihren Ergebnissen den Schluss, dass der modifizierte SPT geeignet ist, um die Fertilität von Bullen in Kombination mit anderen Routinetests zu ermitteln, und dass eine Versuchsdurchführung mit einer Inkubationstemperatur von 41 °C zu deutlicheren Ergebnissen führt als die bis dato routinemäßig angewandte Temperatur von 37 °C.

In weiterführenden Untersuchungen verglichen TAS et al. (2007b) die Spermienpenetration von bovinem Zervikalmukus mit der Penetration in Polyacrylamid-Gel. Hierbei stellten sie zunächst ein Polyacrylamid-Hydrogel her, um dies zu Pulver weiterzuverarbeiten und vor Versuchsstart unter Verwendung von mit Fruktose versetzter phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) bzw. ebenfalls mit Fruktose versetzter Natriumchlorid-Lösung (NaCl-Lösung) aufzuquellen. Der weitere Versuchsaufbau entspricht dem soeben beschriebenen, davon abweichend ist lediglich die Erweiterung der Festlegung von PDR1 und PDR2 auf PDR1 (1,5-1,75 cm), PDR2 (3,25-3,5 cm) und PDR3 (5,0-5,25 cm); alle Tests wurden im Dreifachansatz mit bovinem Zervikalmukus (Versuch 1), in PBS (Versuch 2) sowie in NaCl-Lösung (Versuch 3) aufgequollenem Polyacrylamid-Gel durchgeführt. In Versuch 1 konnte bei der hochfertilen Gruppe eine signifikant höhere Anzahl von Spermien ($p < 0,0001$) in PDR3 gefunden werden als bei der niedriger fertilen Gruppe. In der Auswertung von Versuch 2 ergaben sich insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Fertilitätsgruppen, Versuch 3 zeigte eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$) zwischen der Fertilität und der Anzahl der Spermien, die bis zu PDR3 migriert waren.

Um auf Besamungsstationen einsetzbare Funktionstests mit einer tatsächlichen Korrelation zur Fruchtbarkeit von Bullen herauszustellen, führten GILLAN et al. (2008) neben einer Reihe anderer Spermafunktionstests den Penetrationstest durch. Als Medium diente hierbei Hyaluronsäure in Verbindung mit einem Tiefgefrierverdünner bestehend aus TRIS, Zitronensäure, Fruktose und bovinem Serumalbumin. Auf den Zusatz von Glycerol und Eigelb wurde verzichtet, um den Effekt von Medium und Verdünner auf die Penetrationsfähigkeit der Spermien zu minimieren. Basierend auf ihrer 56-Tage-Non-Return-Rate wurden die verwendeten zehn Bullen in eine Gruppe mit hoher, eine mit mittlerer und eine Gruppe mit niedriger Fertilität eingeteilt. Die Autoren stellten eine signifikante Korrelation ($r = 0,701$; $p < 0,05$) zwischen der Distanz des vordersten Spermiums und der Fertilität der Bullen fest.

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung der Polyacrylamid-Gele

Alle Versuche sind mit Polyacrylamid-Gel in 2-prozentiger und 1,9-prozentiger Konzentration unter Verwendung von jeweils drei verschiedenen Puffern durchgeführt worden, so dass in der Untersuchung insgesamt sechs verschiedene Polyacrylamid-Gele getestet worden sind.

3.1.1 Herstellung des 2 %-igen Polyacrylamid-Gels (PAG 2)

Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)	1,33 ml
Puffer I, II oder III	5 ml
Aqua dest.	ad 20 ml

1,33 ml einer 30 %-igen Polyacrylamid-Stammlösung (Acrylamid und N, N'-Methylen-Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1) wurden zusammen mit 5 ml von Puffer I, II bzw. III in ein Becherglas gegeben und mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt. Während der Durchmischung der Lösung mittels Taumelschüttler (Polymax 1040, Fa. Heidolph Instruments & Co.KG, Schwabach) erfolgte die weitere Zugabe von:

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

Nach Abdichtung der Reaktionsgefäße mittels Parafilm fand die Inkubation bei Raumtemperatur für ca. 12 Stunden statt. Das nach dieser Zeit polymerisierte Gel wurde anschließend unter Vermeidung von Luftblasenbildung in einen Dialyseschlauch (molecular weight cut off 10-20 kDa; Roth, Karlsruhe) gefüllt. Der beidseitig mit einem einfachen Knoten verschlossene Schlauch wurde in mit Fructose angereicherte PBS-Lösung gehängt. Unter regelmäßigem Durchmischen mittels Magnetrührer (IKA CombiMag Reo, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen) wurde das Gel in der mit einem Schraubdeckel verschlossenen Flasche 24 Stunden lang bei 4 °C dialysiert. In dieser Zeit erfolgte 3 bis 4x ein Wechsel des Puffers. Nach der

Dialyse wurde das Gel auf Vollständigkeit der Polymerisierung, Klarheit und Spinnbarkeit geprüft, in ein Becherglas mit Schraubverschluss umgefüllt und bei 4 °C im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.1.2 Herstellung des 1,9 %-igen Polyacrylamid-Gels (PAG 1,9)

Bei der Herstellung des 1,9 %-igen Gels wurden sämtliche Schritte analog zum Gel in 2 %-iger Konzentration durchgeführt, lediglich die Menge der zugesetzten Polyacrylamid-Stammlösung variierte wie folgt:

Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe)	1,266 ml
---------------------------------------	----------

3.1.3 Herstellung der Pufferlösungen

3.1.3.1 Herstellung von Puffer I

TRIS (Roth, Karlsruhe)	18,17 g
------------------------	---------

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

Eine 1,5 M TRIS-Puffer-Lösung wurde hergestellt, indem die angegebene Puffermenge mit einer Präzisionswaage (Mettler PJ300, Mettler-Toledo, Gießen) abgewogen, in ca. 40 ml zweifach destilliertem Wasser gelöst und anschließend mittels 1N HCl bis zum pH 8,8 titriert wurde. Die Aufbewahrung des fertigen TRIS-Puffers bis zur Verwendung erfolgte in einer verschlossenen Flasche bei 4 °C. Vor der Verwendung wurde der Puffer auf Raumtemperatur erwärmt.

3.1.3.2 Herstellung von Puffer II

Bei der Herstellung von Puffer II wurden sämtliche Schritte analog zu Puffer I durchgeführt, lediglich die zugesetzte TRIS-Menge variierte wie folgt:

TRIS (Roth, Karlsruhe)	23,64 g
------------------------	---------

3.1.3.3 Herstellung von Puffer III

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

Die PBS-Tablette wurde in 250 ml destilliertem Wasser unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers (IKA CombiMag Reo, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen) gelöst. Vor der Verwendung wurde der Puffer auf Raumtemperatur erwärmt.

3.1.3.4 Herstellung der phosphatgepufferten Salzlösung zur Dialyse

Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)	41 g
KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, Steinheim)	2,75 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim)	11 g
Aqua dest.	1000 ml
Aqua dest.	800 ml

Eine fünffache PBS-Stammlösung wurde hergestellt, indem die Zutaten mit einer Präzisionswaage (Mettler PJ300, Mettler-Toledo, Gießen) abgewogen und in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst wurden. Die Lagerung erfolgte in einer verschlossenen Flasche bei 4 °C im Kühlschrank. Zur Verwendung im Experiment wurde eine einfache PBS-Lösung hergestellt, indem 200 ml der Stammlösung mittels destillierten Wassers auf 1000 ml aufgefüllt wurden. Zusätzlich wurde dem einfachen PBS-Puffer vor der Verwendung zur Dialyse

D(-)Fructose (Sigma-Aldrich, Steinheim)	10 g
---	------

zugemischt und mit einem Magnetrührer (IKA CombiMag Reo, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen) gründlich vermischt.

3.2 Herstellung der Agarose-Gele

Alle Versuche sind mit Agarose-Gel in den Konzentrationen 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 % und 0,5 % durchgeführt worden.

3.2.1 Herstellung des 0,1 %-igen Agarose-Gels

Agarose Multi Purpose (Bioline GmbH, Luckenwalde)	0,05 g
D(-)Fructose (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0,5 g
Phosphatgepufferte Salzlösung	50 ml

0,05 g des Agarose-Pulvers wurden zusammen mit 0,5 g Fructose in 50 ml phosphatgepuffertes Salzlösung gelöst. Die Lösung wurde für ca. 60 Sekunden geschwenkt und anschließend bei 800 Watt für etwa 30 Sekunden in der Mikrowelle bis zum Kochen erhitzt. Die zum Erstarren des Gels führende Abkühlung erfolgte danach bei Raumtemperatur im offenen Becherglas.

3.2.2 Herstellung des 0,2 %-igen Agarose-Gels

Bei der Herstellung des 0,2 %-igen Gels wurden sämtliche Schritte analog zum Gel in 0,1 %-iger Konzentration durchgeführt, lediglich die zugesetzte Agarose-Menge variierte wie folgt:

Agarose Multi Purpose (Bioline GmbH, Luckenwalde)	0,10 g
---	--------

3.2.3 Herstellung des 0,3 %-igen Agarose-Gels

Bei der Herstellung des 0,3 %-igen Gels wurden sämtliche Schritte analog zum Gel in 0,1 %-iger Konzentration durchgeführt, lediglich die zugesetzte Agarose-Menge variierte wie folgt:

Agarose Multi Purpose (Bioline GmbH, Luckenwalde)	0,15 g
---	--------

3.2.4 Herstellung des 0,4 %-igen Agarose-Gels

Bei der Herstellung des 0,4 %-igen Gels wurden sämtliche Schritte analog zum Gel in 0,1 %-iger Konzentration durchgeführt, lediglich die zugesetzte Agarose-Menge variierte wie folgt:

Agarose Multi Purpose (Bioline GmbH, Luckenwalde)	0,2 g
---	-------

3.2.5 Herstellung des 0,5 %-igen Agarose-Gels

Bei der Herstellung des 0,5 %-igen Gels wurden sämtliche Schritte analog zum Gel in 0,1 %-iger Konzentration durchgeführt, lediglich die zugesetzte Agarose-Menge variierte wie folgt:

Agarose Multi Purpose (Bioline GmbH, Luckenwalde)	0,25 g
---	--------

3.2.6 Herstellung der phosphatgepufferten Salzlösung

PBS-Tablets (Sigma-Aldrich, Steinheim)	1 Stück
--	---------

Aqua dest.	250 ml
------------	--------

Die PBS-Tablette wurde in 250 ml destilliertem Wasser unter Zuhilfenahme eines Magnetrührers (IKA CombiMag Reo, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen) gelöst.

3.3 Spermavorbereitung

3.3.1.1 Versuchsaufbau I – Vorbereitung und Untersuchung des Tiefgefrierspermas

Für den ersten Teil der Versuche wurde Tiefgefriersperma verschiedener Bullen verwendet. Das Auftauen der 0,25 ml- bzw. 0,5 ml-Pailletten erfolgte in erforderlicher Menge für 60 Sekunden im Wasserbad (Fa. Memmert, Schwabach) bei 37,5 °C. Handelte es sich um mehrere Pailletten eines Bullen, wurden diese nacheinander aufgetaut und anschließend der Samen in einem Reagenzglas im Wasserbad bei 37,5 °C gepoolt.

Im Rahmen der Spermauntersuchung wurde jeder Spermapool im Eosin-Ausstrich auf das Lebend-Tot-Verhältnis und die Pathomorphologie sowie per computerassoziierter Spermaanlyse im Hinblick auf folgende kinetische Eigenschaften überprüft:

DAP = distance average path, durchschnittlich zurückgelegte Strecke;

DCL = distance curve line, tatsächlich zurückgelegte Strecke;

DSL = distance straight line, direkte Strecke zwischen Anfangs- und Endpunkt;

VAP = velocity average path, Geschwindigkeit über den gemittelten Weg;

VCL = velocity curve line, Geschwindigkeit über die tatsächliche Strecke;

VSL = velocity straight line, Geschwindigkeit über die direkte Strecke zwischen Anfangs- und Endpunkt;

STR = straightness, Linearität des durchschnittlichen Strecke;

LIN = linearity; Linearität der tatsächlich zurückgelegten Strecke;

WOB = wobble, Abweichung der tatsächlich zurückgelegten von der gemittelten Strecke;

ALH = amplitude of lateral head displacement, Größe der seitlichen Spermienkopfauslenkung von der durchschnittlich zurückgelegten Strecke;

BCF = beat cross frequency, Frequenz, mit der durchschnittlich zurückgelegte Strecke des Spermiums die tatsächlich zurückgelegte kreuzt

Zu Beginn des Penetrationstests erfolgte dann die Aufteilung des Spermas in Portionen von je 50 µl in die vorbereiteten Eppendorf-Gefäße mittels Pipette (Eppendorf Reference, Eppendorf, Hamburg).

3.3.1.2 Lichtmikroskopische Beurteilung des Spermas im Eosin-Ausstrich

Zur Beurteilung des prozentualen Anteils lebender Spermien wurden zunächst ein Tropfen des Samens sowie ein Tropfen Eosin-Farbstoff nebeneinander auf einem Objektträger aufgebracht, dann für 20 Sekunden durch Schwenken miteinander vermischt und schließlich mithilfe eines zweiten Objektträgers gleichmäßig auf dem ersten ausgestrichen. Anschließend erfolgte im Lichtmikroskop die Durchmusterung des Ausstriches, wobei jeweils 200 Spermien ausgezählt wurden. Ungefärbte Spermatozoen wurden als lebend und rot gefärbte als tot gewertet.

Für die Pathomorphologie wurden ebenfalls 200 Spermien ausgezählt und die Veränderungen an Kopf und Geißel klassifiziert.

3.3.1.3 Computergestützte Spermaanlyse

Zur Erfassung der Samendichte und der Motilität wurde das computerassoziierte Spermaanlysesystem „Sperm VisionTM“ (Fa. Minitüb, Tiefenbach) eingesetzt. Das System besteht aus der CASA-Software (CASA: computer-assisted sperm analysis – computerassistierte Spermaanlyse), einem Phasenkontrastmikroskop (Olympus BX41), einer Hochgeschwindigkeits-Schwarz-Weiß-Kamera sowie einem PC mit Pentium® 4 Prozessor bei 2 GHz.

Für die Analyse wird die Messkammer (20 Mikron, Fa. Leja, Nieuw-Venep, Niederlande; Abb. 7) in der dafür vorgesehenen Mulde mit 2,5 µl (Pipette „pipet-lite“, Rainin Instrument, Oakland, USA) des gepoolten Ejakulates in einem Zug beschickt, auf korrekte Befüllung geprüft – Luftblasen oder eine unvollständige Befüllung führten zum Ausschluss und der Befüllung der nächsten Kammer – und sofort der Messung zugeführt. Die Messkammer besitzt eine Schichtdicke von 20 µm und kann

ein definiertes Volumen aufnehmen (Abb. 7). Pro Untersuchungsgang wurden 400 Spermien bewertet, das entspricht etwa 5 - 7 Messfeldern innerhalb einer Messkammer. Ein Messfeld ist hierbei gleichzusetzen mit einem Gesichtsfeld.

Gemessen wird die entsprechende Anzahl an Gesichtsfeldern auf einer Längsachse. Gemäß den Empfehlungen des Herstellers werden Messungen innerhalb der sich verjüngenden Kammerbereiche vermieden.

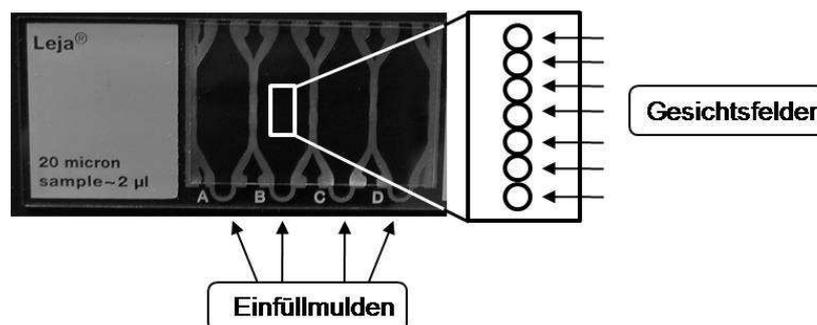


Abb. 7: Leja-Messkammer zur Erfassung von Spermiedichte und Motilitätsparametern in der computergestützten Spermaanalyse

Für die vorliegende Arbeit wurden zur Analyse von bovinem Sperma folgende Einstellungen verwendet (Tab. 3):

Tab. 3: Grundeinstellungen für die Spermienanalyse via Sperm Vision™
 AOC = Average Orientation Change (°); DSL = Distance: Straight Line (µm); VCL = Velocity: Curve Line (µm/s); LIN = Linearity; ALH = Amplitude of Lateral Head Displacement (µm); STR = Straightness; DAP = Distance: Average Path (µm)

Spermien-erkennung	Level 1 - Klassifikation		Level 2 - Klassifikation			
	unbeweglich	Lokal-motil	Hyperaktiv	Linear	Nicht-linear	kurvilinear
Fläche (µm) von - bis						
22 - 88	AOC <5,0	DSL <4,5	VCL >80 LIN < 0,65 ALH >6,5	STR >0,5 LIN >0,35	STR >0,5 LIN < 0,35	DAP/ Radius ≥ 3 LIN < 0,5

Sperm Vision™ erhebt die beschriebenen Parameter für jedes einzelne der analysierten 5 - 7 Messfelder. Der Benutzer sieht jedes der Gesichtsfelder per negativem Phasenkontrastverfahren dargestellt auf dem Monitor. Die unterschiedlichen Bewegungsmuster der Spermien werden mit verschiedenen Farben graphisch angezeigt. Das Programm stellt die Ergebnisse zudem tabellarisch auf dem Bildschirm dar. Gleichzeitig werden sämtliche Daten gemittelt und die entsprechenden Werte in Bezug auf die gesamte Probe angezeigt. Des Weiteren erlaubt das Programm das Exportieren sämtlicher Analysedaten in eine Excel-Tabelle, um sie in dieser Form einer statistischen Auswertung zuführen zu können.

3.3.2 Versuchsaufbau II – Nativsperma

3.3.2.1 Gewinnung und Untersuchung der Ejakulate

Für den zweiten Teil der Versuche gelangte frischgewonnenes Bullensperma zur Anwendung. Die Absamung der drei zur Verfügung stehenden schwarzbunten Holstein-Bullen erfolgte mithilfe einer künstlichen Vagina (Modell „Hannover“, Minitüb, Tiefenbach) unter Verwendung eines zweiten Bullen als Aufsprungpartner. Die Samenentnahme erfolgte in der Regel nach einem Blindsprung.

3.3.2.2 Thermische Behandlung und Untersuchung der Ejakulate

Jedes Ejakulat wurde nach Zugabe eines Flüssigkonservierers (Triladyl, Minitüb, Tiefenbach) in fünf Teile aliquotiert, und jedes Aliquot wurde einer thermischen Stressbehandlung nach vorgegebenem Protokoll (Tab. 4) unterzogen. Nach der Stressung wurden Dichte, Lebend-Tot-Verhältnis sowie Morphologie der einzelnen Aliquots erfasst. Das Verhältnis lebender zu toten Spermien sowie die Morphologie der Samenzellen wurde im Eosin-Ausstrich wie unter Punkt 3.3.1.2 beschrieben durchgeführt. Danach erfolgte die Erfassung der Motilitätsparameter mittels CASA gemäß Punkt 3.3.1.3 sowie die Durchführung des Penetrationstests (siehe 3.4).

Tab. 4: Versuchsaufbau mit Frischsperma;
SPT = Spermien-Penetrationstest, TG = Tiefgefriersperma-Herstellung

Aliquot	Behandlung	SPT	TG
1	verdünnt; 1/2 Stunden Raumtemperatur	x	x
2	verdünnt; Lagerung bei 37,5 °C für 3 Stunden auf einer Wärmeplatte	x	x
3	verdünnt; Lagerung im Kühlschrank für 5 Stunden, anschließend für 12 Stunden bei Raumtemperatur	x	x
4	verdünnt; Lagerung im Kühlschrank für 24 Stunden	x	x
5	verdünnt; Lagerung im Kühlschrank für 24 Stunden, anschließend bei 41 °C für 1,5 Stunden im Wärmeschr ank	x	x

3.3.2.3 Einfrieren, Auftauen und weitere Untersuchung des Frischspermas

Während der Inkubationsphase des Penetrationstests wurde das jeweils im Versuch befindliche verdünnte Frischsperma für den Einfriervorgang vorbereitet, indem 0,5 ml – Pailletten (Minitüb, Tiefenbach) mittels Aufziehhilfe (WITEG, Wertheim) befüllt und zunächst für 2 Stunden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert wurden. Danach erfolgte der Gefriervorgang mithilfe eines Einfrierautomaten (Computer Controlled Rate Freezer IceCube 14S, Minitüb, Tiefenbach) und dazugehöriger Computersoftware (IceCube Series V1.21A, Minitüb, Tiefenbach), der die Pailletten innerhalb von 11 Minuten von 4 °C auf ca. -150 °C abkühlte. Anschließend wurden die Pailletten sofort in einen mit Flüssigstickstoff gefüllten Container verbracht. Die gefrorenen Pailletten wurden nach mindestens 24-stündiger Aufbewahrung in einem Flüssigstickstoffbehälter für 60 Sekunden bei 37,5 °C im Wasserbad aufgetaut und jeweils erneut sowohl der computerassoziierten Samenanalyse als auch dem Penetrationstest zugeführt.

3.4 Penetrationstest

3.4.1 Auswahl der geeigneten Kapillaren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Kapillaren bzw. Pailletten getestet:

1. Wiretrol® II Precision Micropipettes (Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting), Durchmesser 2 mm, Länge 90 mm, Volumen 200 µl
2. Clinitubes (Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dänemark), innerer Durchmesser 1,5 mm, Länge 75 mm, Volumen 125 µl
3. Hämatokrit-Kapillaren (nichtheparinisiert, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt), innerer Durchmesser 1 mm, Länge 75 mm, Volumen 75 µl
4. Ringmarken Pipetten (Servoprax® GmbH, Wesel), innerer Durchmesser 0,8 mm, Länge 125 mm, Volumen 50 µl

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche fiel die Entscheidung zugunsten der nichtheparinisierten Hämatokrit-Kapillaren.

3.4.2 Durchführung des Migrationstests mittels Polyacrylamid-Gel

Zunächst wurden die Deckel von Plastik-Eppendorf Gefäßen (Eppendorf Tubes Standard; Eppendorf, Hamburg) mit Hilfe einer Braunüle (Braun, Melsungen) mit je zwei Löchern von der Größe einer Hämatokrit-Kapillare (75 mm/75 µl, Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt) versehen und in einem vorgewärmten Metallblock auf einem Wärmetisch (HAT 300, Minitüb, Tiefenbach) bei 37,5 °C platziert.

Zur Befüllung der Kapillaren mit dem kurz vor Versuchsbeginn aus dem Kühlschrank entnommenen Polyacrylamid-Gel fand eine 10-ml-Einwegspritze (Braun, Melsungen) mit aufgesetztem Zitzenhütchen Verwendung, mit deren Hilfe das Gel vorsichtig in die Kapillare gesaugt wurde. Das obere Ende wurde mit etwas Versiegelungswachs (MAGV, Rabenau-Londorf) abgedichtet. Kapillaren mit Luftblasen wurden sofort

verworfen. Nach Entfernung der Kapillaren aus dem Gel wurde so viel Versiegelungswachs am verschlossenen Ende einer Kapillare nachgegeben, bis das Gel am offenen Ende etwa 1 Millimeter hervortrat.

Nach Befüllung und Verschluss der Eppendorf-Gefäße mit dem Samen wurden jeweils zwei Kapillaren der gleichen Gelkonzentration durch die vorbereiteten Löcher im Deckel aufrecht im Spermienreservoir platziert (Abb. 8).

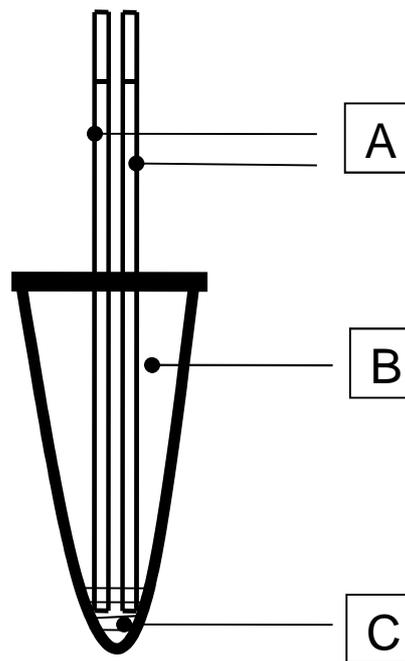


Abb. 8: Schematische Darstellung der Vorbereitung der Kapillare zur Inkubation
A = mit Polyacrylamid-Gel bzw. Agarose-Gel gefüllte Kapillaren; B = Eppendorf Gefäß; C = Spermienreservoir von 50 μ l

Der Versuch mit einer Samenprobe erfolgte stets mit allen Gelkonzentrationen gleichzeitig. Demzufolge wurden pro Versuchsdurchgang sechs Eppendorf-Gefäße vorbereitet und mit jeweils zwei gefüllten Kapillaren bestückt. Die Inkubation erfolgte sofort im Wärmeschrank (Fa. Memmert, Schwabach) bei 37,5 °C für 30 Minuten.

Nach Entfernung des Metallblockes aus dem Wärmeschrank wurden die Kapillaren der lichtmikroskopischen Auswertung zugeführt.

3.4.3 Durchführung des Migrationstests mittels Agarose-Gel

Die Vorbereitung der Hämatokritkapillaren erfolgte auf zwei Arten.

Bei 50 % der Versuche wurde das feste Agarose-Gel im Becherglas zunächst durch Erhitzen in der Mikrowelle bei 800 Watt für ca. 30 Sekunden verflüssigt und in dieser Form mithilfe einer 10-ml-Einwegspritze mit Zitzenhütchen-Aufsatz in die Kapillaren aufgezogen. Die Kapillaren wurden am offenen Ende mit Versiegelungswachs verschlossen und verblieben bis zum erneuten Erstarren bei Raumtemperatur in dem mit Agarose-Gel gefüllten Becherglas (Abb. 9), um schließlich dem Penetrationstest (Punkt 3.4.2) zugeführt zu werden.

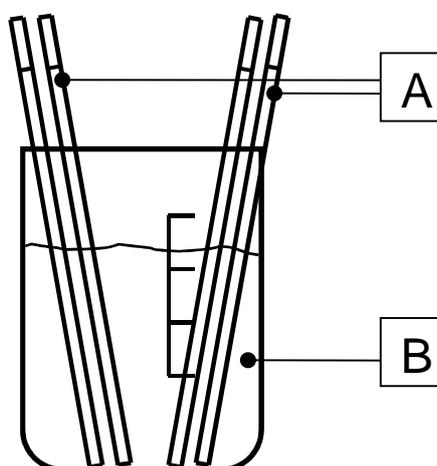


Abb. 9: Schematische Darstellung der im Becherglas stehenden Agarose-Gel-gefüllten Kapillaren; A = Hämatokrit-Kapillaren; B = Becherglas mit Agarose-Gel

Bei den verbleibenden 50 % der Versuche wurde das bereits erstarrte Gel in die Kapillare verbracht, indem die Kapillare solange an verschiedenen Stellen in das Gel geschoben wurde, bis sie nahezu vollständig gefüllt war. Anschließend wurde das obere Ende mit Versiegelungswachs verschlossen. Dies erfolgte jeweils unmittelbar vor Testbeginn, die Kapillaren wurden dementsprechend nach Verschluss sofort wie unter Punkt 3.4.2 beschrieben in die vorbereiteten Eppendorf-Gefäße verbracht und inkubiert.

3.4.4 Auswertung des Migrationstests

Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde der Metallblock mit den Eppendorf-Gefäßen aus dem Wärmeschrank entfernt. Die erste Kapillare wurde vorsichtig aus dem Gel entnommen und nach Entfernung von Spermaresten an der Außenwand mittels Papiertuch so auf einem mit einer Millimeterskala versehenen Objektträger (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Baunschweig) platziert, dass sich die Kapillare parallel zur Skala und das Ende, das Kontakt zum Spermienreservoir hatte, auf Höhe der Nullmarke der Skala befand (Abb. 10).

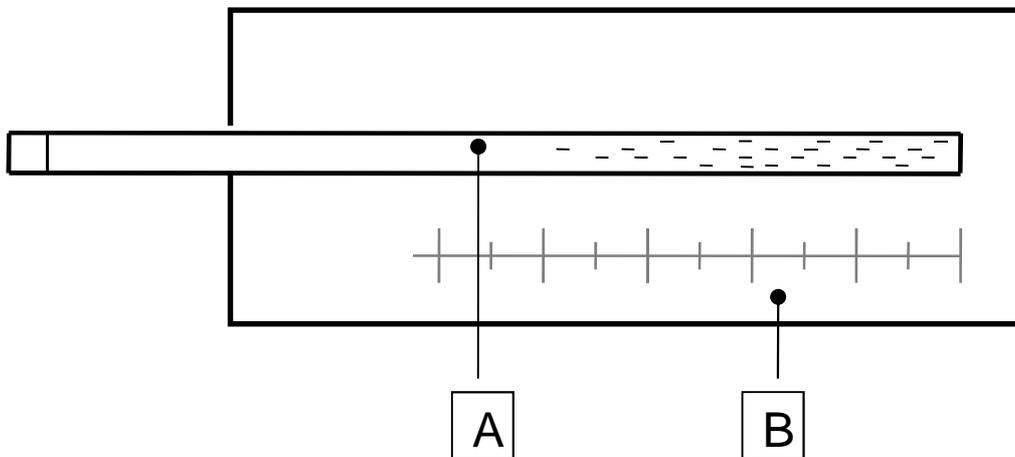


Abb. 10: Schematische Darstellung der Vorbereitung der Kapillare zur Auswertung:
A = mit Polyacrylamid-Gel gefüllte Kapillare nach Migration der Spermien;
B = Objektträger mit aufgetragener Millimeterskala.

Unter Zuhilfenahme eines Phasenkontrastmikroskopes (Leica DMR, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) erfolgte die Durchmusterung jeder Kapillare zunächst bei 100-facher (Abb. 11) und für detailliertere Betrachtung bei 200-facher Vergrößerung (Abb. 12; Beleuchtungseinstellungen siehe, Spalte „Mikroskop“), ausgehend vom an der Nullmarke befindlichen Ende.

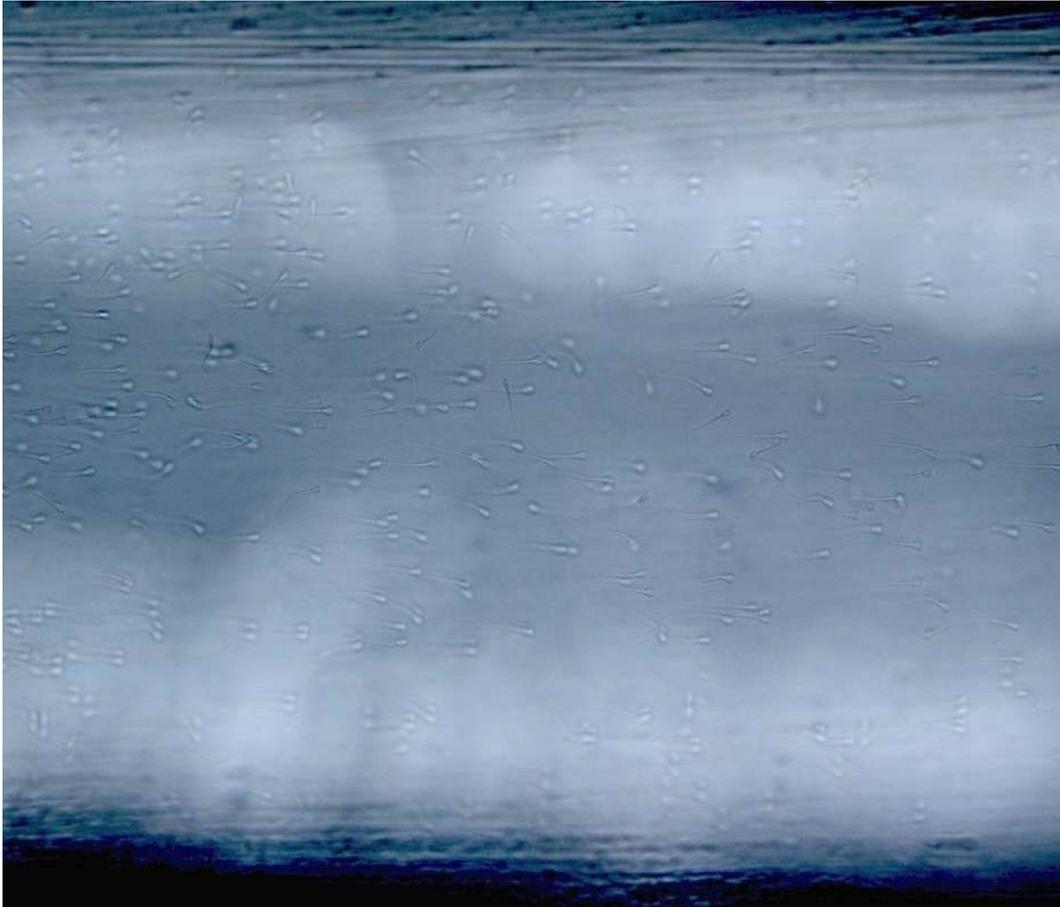


Abb. 11: Mikroskopische Darstellung der Spermien in der Kapillare bei 100-facher Vergrößerung



Abb. 12: Mikroskopische Darstellung der Spermien in der Kapillare bei 200-facher Vergrößerung

Tab. 5: Beleuchtungseinstellungen des Mikroskops Leica DMR zur Darstellung im Gel befindlicher Spermien im Mikroskop sowie auf dem PC-Monitor

*Anm: N= Graufilter, 4 = Schwächungswert: Reduktion auf $1/4 = 25\%$ Transmission

	Mikroskop	Monitor
Kondensator	ohne	ohne
Graufilter	N4*	ohne
Beleuchtungsintensität	7	6
Aperturblende	PH	1-2
Leuchtfeldblende	anpassen bis Spermien deutlich im Mikroskop zu sehen sind	anpassen bis Spermien deutlich auf dem Monitor zu sehen sind

Die visuelle Durchmusterung jeder Kapillare erfolgte bis zu dem Punkt, an dem das vorderste Spermium unabhängig von seiner Vitalität aufgefunden werden konnte. Die zurückgelegte Entfernung wurde anhand der Skalierung – gerundet auf den nächsten Millimeter - abgelesen und notiert. Ausgehend vom vordersten Spermium erfolgte eine retrograde Durchmusterung der Kapillare, um das erste Lebende (sofern nicht identisch mit dem vordersten) sowie die ersten fünf sich zusammen in einem Lichtfeld befindlichen noch vitalen Spermien zu suchen und deren zurückgelegte Distanz zu notieren.

Des Weiteren wurde die Kapillare an der 1-, 2- und 3-cm-Marke in der gesamten Tiefe, also von der dem Objektiv nahen bis zu der dem Objektträger zugewandten Seite, bei 100-facher Vergrößerung durchmustert und die sich dort befindliche Spermienanzahl erfasst und klassifiziert (Tab. 6).

Tab. 6: Klassifikationssystem zur Erfassung der Spermienanzahl

Anzahl der Spermien	Nummer
Keine	0
1-50	1
51-100	2
101-200	3
> 200	4
so hohe Dichte, dass einzelne Spermien nicht mehr voneinander unterschieden werden können	5

Die Auswertung begann stets mit Kapillare 1 aus Eppendorf-Gefäß 1, wurde mit Kapillare 1 aus Eppendorf-Gefäß 2 fortgesetzt, gefolgt von Kapillare 1 aus Eppendorf-Gefäß 3 usw., und nach Durchmusterung von Kapillare 1 aus Eppendorf-Gefäß 6 startete die Auswertung aller Zweitkapillaren, erneut beginnend mit Eppendorf-Gefäß 1. Alle erfassten Daten wurden in einer Excel-Tabelle zusammengetragen.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte elektronisch unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 7.0 und des Programmpaketes IBM® SPSS® Statistics, Release 19.0.0.1. Die grafischen Abbildungen wurden auf einem Personalcomputer mit dem Programm GraphPad Prism, Version 5.04, erzeugt. Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden arithmetische Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD) und Minimal- & Maximalwert (Min/Max) berechnet und tabellarisch wiedergegeben.

Die Überprüfung auf Normalverteilung wurde mit dem Test nach Kolmogorov-Smirnow durchgeführt. Bezüglich der Fragestellung nach dem Zusammenhang zwischen dem Penetrationstest und der spermatologischen Untersuchung, für die Korrelationen der sechs Auswertmethoden untereinander sowie für den Vergleich der Ergebnisse vor und nach Kryokonservierung wurden für die Penetrationsdistanzen der vordersten Spermien, die einer Normalverteilung unterlagen, Korrelationsanalysen unter Angabe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson durchgeführt. Bei den gleichen Auswertungen bezüglich der Spermienanzahl an den drei festgelegten Distanzen im Gel wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman herangezogen, da hier keine Normalverteilung vorlag. Mittels Wilcoxon-Test für Paardifferenzen wurde überprüft, ob ein Unterschied zwischen Ansatz 1 und Ansatz 2 existiert. Um den Einfluss der Stressfaktoren auf die Penetrationsvariablen zu prüfen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt.

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d. h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuche

4.1.1 Schwierigkeiten bei der Herstellung der synthetischen Medien

Nach Ansetzen der Polyacrylamid-Gele fiel zunächst beim Umfüllen in den Dialyseschlauch auf, dass sich das Medium bei zwei von zwei Ansätzen des 1,9 %-igen sowie zwei von zwei Ansätzen des 2 %-igen Polyacrylamid-Gels in zwei Phasen getrennt hatte: eine flüssige und eine Phase hoher Viskosität. Zu diesem Zeitpunkt ließen sich beide Phasen durch Schwenken des Reaktionsgefäßes nicht mehr miteinander vermischen, und das Schütteln des Gefäßes führte in allen vier Ansätzen sofort zur irreversiblen Bildung großer und kleiner Luftblasen. Diese Zwei-Phasen-Bildung wurde durch den Einsatz eines Taumelschüttlers zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Verteilung aller Reagenzien während der weiteren Gelherstellung verhindert. Die Reaktionsgefäße mit dem Gelansatz wurden insgesamt für ca. 30 Minuten während und nach der Herstellung bei mittlerer Geschwindigkeit geschwenkt. Nach der Inkubationszeit hatte sich in allen folgenden Ansätzen ein homogenes Gel von gleichmäßiger Viskosität gebildet, das sich leicht in den Dialyseschlauch überführen ließ.

4.1.2 Bildung von Luftblasen

Die ersten mit Polyacrylamid-Gel befüllten Kapillaren mussten sofort nach Aufziehen aufgrund massiver Bläschenbildung verworfen werden. Von 64 Kapillaren konnten lediglich 13 beim ersten Versuch blasenfrei aufgezogen werden (20,3 %), 25 Stück beim zweiten Versuch (39,1 %), 20 beim dritten (31,2 %) und 6 beim vierten Versuch (9,4 %). Nach erfolgreicher Befüllung waren von den 64 Kapillaren 47 (73,4 %) nicht auswertbar, da sich während der Inkubationszeit im Wärmeschrank Bläschen gebildet hatten, die die ungehinderte Passage der Spermien durch das Gel beeinträchtigen. Aufgrund dessen wurden einige Modifikationen in der Herstellung und Lagerung der Gele vorgenommen: bis dato wurden zum einen alle Reaktionsgefäße lediglich mit Aluminiumfolie verschlossen, zum anderen erfolgte die Aufbewahrung von je 20 ml fertigem Gel in Bechergläsern, die ein Volumen von 50 ml fassen – ebenfalls unter Verschluss mit Aluminiumfolie.

Ergebnisse

Zunächst wurden im Herstellungsprozess die Bechergläser durch 20-ml-Flaschen mit festem Schraubverschluss ersetzt. In der Testdurchführung diente nach der Befüllung der Kapillaren anfangs jeweils ein Gummistopfen als Verschluss derselben. Dieses System wurde durch ein Verschluss-Kitt für Mikrohämatokrit-Kapillaren abgelöst, das in das offene Ende jeder Kapillare geschoben werden konnte und selbige luftdicht verschloss. Dies reduzierte die Bläschenbildung deutlich. Von 64 Kapillaren konnten 55 (85,9 %) blasenfrei im ersten Aufziehversuch bestückt werden und 9 (14,1 %) im zweiten Versuch. Nach Inkubation mussten noch immer aufgrund von Blasenentwicklung 16 Kapillaren von 64 (25 %) verworfen werden, dies beschränkte sich jedoch auf nur zwei der vier untersuchten Kapillararten (Tab. 7). Diese Entwicklung wirkte sich im weiteren Prozess auf die Auswahl der Kapillaren aus, der Herstellungsprozess wurde nicht weiter modifiziert.

4.1.3 Auswahl der geeigneten Pailletten/Kapillaren

Die Clinitubes-Pipetten sowie die Wiretrol® II - Mikropipetten waren mittels einer Pipettierhilfe (WITEG Labortechnik GmbH, Wertheim) problemlos mit dem synthetischen Mukus befüllbar. Jedoch bildeten sich in den Kunststoffpailletten auch nach Umsetzung aller unter Punkt 4.1.2. aufgeführten Schritte bei 7 von 16 (Wiretrol® II; 43,8 %) bzw. 9 von 16 Pailletten (Clinitubes; 56,3 %) spätestens im Anschluss an die Inkubationszeit im Wärmeschrank Luftblasen (Tab. 7, $p < 0,001$). Des Weiteren erwiesen sie sich aufgrund ihrer Tiefe als ungeeignet für die Durchmusterung im Phasenkontrastmikroskop, da Spermien auf der dem Objektträger zugewandten Seite in der 200- und 400-fachen Vergrößerung in 9 von 9 Fällen (Wiretrol® II) bzw. 7 von 7 Fällen (Clinitube) nicht erkennbar waren. Aus den genannten Gründen wurde vom Einsatz dieser beiden Paillettenarten abgesehen.

Mit einem Durchmesser von 1,0 mm bzw. 0,8 mm kamen die Hämatokrit-Kapillaren und die Ringmarken-Pipetten für den Migrationstest in Frage, da beide Arten im Phasenkontrastmikroskop eine vollständige Durchmusterung des Gels erlaubten. Die Sichtbarkeit der einzelnen Spermien war bei den Hämatokrit-Kapillaren besser als bei den Ringmarken-Pipetten. Beide Kapillararten waren aufgrund ihres geringen Durchmessers allerdings deutlich schwerer zu befüllen als die vorhergenannten Produkte. Die Ringmarken-Pipetten schnitten aufgrund ihres um 0,2 mm kleineren

Ergebnisse

Durchmessers hierbei schlechter als die Hämatokrit-Kapillaren ab. Im Hinblick darauf machte sich auch ein Unterschied in den Gelkonzentrationen bemerkbar, das 1,9 %-ige Polyacrylamid-Gel ließ sich etwas schneller aufziehen als das 2 %-ige Gel. Aufgrund der besseren mikroskopischen Beurteilbarkeit in Verbindung mit der leichteren Befüllung fiel die Entscheidung zugunsten der Hämatokrit-Kapillaren.

Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse der Vorversuche aller verwendeten Kapillar- bzw. Paillettenarten, VV2 = Vorversuch 2

Kapillare	Volumen	nach Inkubation verworfen/ Vorversuch 1 (%)	nach Inkubation verworfen / Vorversuch 2 (%)	Nicht auswertbar nach erfolgreicher Inkubation / VV2 (%)
Wiretrol®II	200 µl	87,5	43,8	100
Clinitubes	125 µl	87,5	56,3	100
Hämatokrit- Kapillaren	75 µl	56,3	0	0
Ringmarken Pipetten	50 µl	62,5	0	0

4.2 Hauptversuche

4.2.1 Versuchsaufbau I - Tiefgefrier-Samen

4.2.1.1 Spermatologische Parameter

Von den 52 untersuchten TG-Portionen wiesen 42,3 % (n = 22) eine Gesamtmotilität von > 50 % auf. Von den übrigen 30 Portionen hatten 9,6 % (n = 5) eine Gesamtmotilität zwischen 40 und 50 %, 15,4 % (n = 8) zwischen 30 und 40 %, 17,3 % (n = 9) zwischen 20 und 30 %, 11,5 % (n = 6) zwischen 10 und 20 % und 3,9 % (n = 2) hatten eine Gesamtmotilität von unter 10 %. Die Vorwärtsbeweglichkeit teilte sich hierbei wie folgt auf: 23,1 % (n = 12) zeigten > 50 % progressiv motile Spermien, 17,3 % (n = 9) zwischen 40 und 50 %, 11,5 % (n = 6) zwischen 30 und

Ergebnisse

40 %, jeweils 17,3 % (n = 9) zwischen 20 und 30 % sowie zwischen 10 und 20 % und 13,5 % (n = 7) wiesen weniger als 10 % vorwärtsbewegliche Spermien auf.

In 38,5 % (n = 20) der Samenportionen lag das Verhältnis der lebenden Spermien im Vergleich zu den toten zwischen 60 und 80 %. In 36,5 % (n = 19) der Fälle waren 40-60 % der Spermien lebendig, bei 23,1 % (n = 12) zwischen 20 und 40 % und bei 1,9 % (n = 1) lagen weniger als 20 % lebende Spermien vor.

Die morphologische Untersuchung ergab bei 15,4 % (n = 8) abweichende Spermien zwischen 10 und 20 %, die übrigen 84,6 % (n = 44) hatten <10 % morphologisch abweichende Samenzellen (Tab. 8).

Tab. 8: Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) sowie Minima (Min) und Maxima (Max) der klassischen spermatologischen Parameter in bovinen kryokonservierten Samenproben nach dem Auftauen (Anzahl Samenproben = 52)

Parameter	MW	SD	Min / Max
Gesamtmotilität (%)	42,7	20,5	6,8 / 78,8
Vorwärtsbeweglichkeit (%)	33,0	19,6	0,46 / 68,7
Anteil lebender Spermien (%)	53,2	16,5	13,0 / 78,5
Pathomorphologische Abweichungen (%)	6,0	3,4	2,0 / 18,0

4.2.1.2 Penetrationstest in Agarose-Gel

Von 22 Versuchen mit in flüssiger Form aufgezogenen 0,1 %-igem Agarose-Gel waren 5 nicht auswertbar (22,7 %). Die Penetrationsstrecken der vordersten sowie der vordersten lebenden Samenzelle lagen jeweils zwischen 1 und 9 mm, die der vordersten 5 lebenden Spermien zwischen 1 und 7 mm. Bei der Durchführung des Penetrationstests mit 0,1 %-igem Agarose-Gel, das in fester Form in die Kapillaren gefüllt wurde, waren von 22 Versuchen 13 nicht auswertbar (59,1 %). Die zurückgelegte Distanz des vordersten lebenden und des vordersten Spermiums lag jeweils zwischen 5 und 12 mm, die der vorderen 5 lebenden Spermien zwischen 5

Ergebnisse

und 11 mm. Flüssig aufgezogenes 0,2 %-iges Agarose-Gel war bei 20 Versuchen 3x nicht auswertbar (15 %). Die vom ersten, vom ersten vitalen sowie von den ersten 5 vitalen Samenzellen zurückgelegten Distanzen betragen jeweils zwischen 0,5 und 3 mm. Bei in fester Form aufgezogenen 0,2 %-igem Agarose-Gel waren mit 17 von 20 Kapillaren 85 % nicht auswertbar. Bezüglich der übrigen 15 % lagen die Penetrationsdistanzen des ersten sowie des ersten vitalen Spermiums zwischen 2 und 5 mm, die der ersten 5 vitalen Spermien zwischen 1 und 4 mm. Von 30 Versuchen mit in flüssiger Form aufgezogenen 0,3 %-igem Agarose-Gel waren 4 nicht auswertbar (13,3 %). Die Penetrationsstrecken des vordersten lebenden sowie der vordersten 5 lebenden Samenzellen lagen jeweils zwischen 0,5 und 7 mm, die des ersten Spermiums zwischen 0,5 und 8 mm. Bei der Durchführung des Penetrationstests mit 0,3 %-igem Agarose-Gel, das in fester Form in die Kapillaren gefüllt wurde, waren von 30 Versuchen 17 nicht auswertbar (56,7 %). Die zurückgelegte Distanz des vordersten lebenden und des vordersten Spermiums lag jeweils zwischen 2 und 10 mm, die der vordersten 5 vitalen Spermien betrug zwischen 2 und 9 mm.

Flüssig aufgezogenes 0,4 %-iges Agarose-Gel war bei 30 Versuchen 4x nicht auswertbar (13,3 %). Die Penetrationsdistanzen betragen in allen drei gemessenen Variationen jeweils zwischen 0,5 und 2 mm. Bei in fester Form aufgezogenen 0,4 %-igem Agarose-Gel waren mit 5 von 30 Kapillaren 16,7 % nicht auswertbar. Die gemessenen Penetrationsdistanzen lagen bei allen drei Messvariationen zwischen 1 und 7 mm.

Bezüglich 0,5 %-igem, flüssig aufgezogenem Agarose-Gel waren 2 von 30 Kapillaren nicht auswertbar (6,7 %). Die zurückgelegten Distanzen der jeweils ersten lebenden bzw. der ersten Samenzellen lagen zwischen 0,5 und 7 mm, die der ersten 5 lebenden Spermien zwischen 0,5 und 4 mm. Bei in fester Form aufgezogenen 0,5 %-igem Agarose-Gel waren mit 5 von 30 Kapillaren 16,7 % nicht auswertbar. Die Penetrationsdistanzen des ersten sowie des ersten vitalen Spermiums lagen zwischen 0,5 und 9 mm, die der ersten 5 vitalen Spermien zwischen 0,5 und 7 mm. Eine Übersicht der Penetrationsdistanzen in Agarose-Gel zeigt Tab. 9, signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen sind den Abb. 13 - Abb. 15 zu entnehmen.

Ergebnisse

Tab. 9: Übersichten der Penetrationsdistanzen boviner Samenzellen in Agarose-Gel, SD = Standardabweichung,

Min = Minimum, Max = Maximum

	Erste lebende Samenzelle (mm)		Erstes Spermium (mm)		Vorderste 5 lebende Spermien (mm)	
	Mittelwert ± SD	Min/Max	Mittelwert ± SD	Min/Max	Mittelwert ± SD	Min/Max
Agarosegel-Konzentration						
0,1% flüssig	3,2 ± 2,1	1/9	3,2 ± 2,1	1/9	2,9 ± 1,6	1/7
0,1% fest	8,1 ± 2,6	5/12	8,3 ± 2,5	5/12	7,4 ± 2,4	5/11
0,2% flüssig	1,4 ± 1,4	0,5/3	1,5 ± 1,7	0,5/3	1,4 ± 1,5	0,5/3
0,2% fest	4,8 ± 2,2	2/5	5,1 ± 2,3	2/5	4,3 ± 2,1	1/4
0,3% flüssig	1,1 ± 0,5	0,5/7	1,1 ± 0,5	0,5/8	1,0 ± 0,6	0,5/7
0,3% fest	3,4 ± 1,5	2/10	3,6 ± 1,8	2/10	3,2 ± 1,4	2/9
0,4% flüssig	1,4 ± 1,3	0,5/2	1,8 ± 1,3	0,5/2	1,3 ± 0,9	0,5/2
0,4% fest	3,0 ± 1,9	1/7	3,1 ± 1,9	1/7	2,7 ± 1,7	1/7
0,5% flüssig	1,0 ± 0,8	0,5/7	1,0 ± 0,8	0,5/7	1,0 ± 0,8	0,5/4
0,5% fest	3,3 ± 1,5	0,5/9	3,3 ± 1,5	0,5/9	2,3 ± 1,5	0,5/7

Ergebnisse

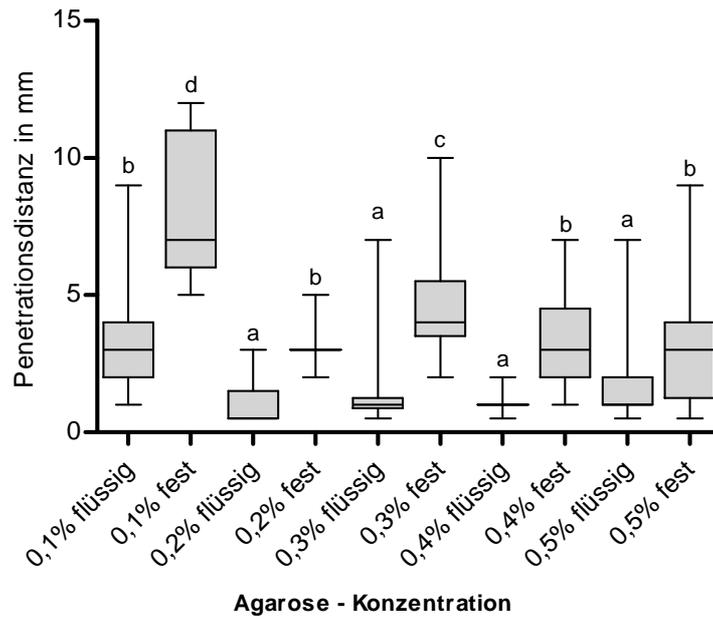


Abb. 13: Darstellung der Penetrationsdistanzen (MW, mm) des ersten lebenden bovinen Spermiums nach Kryokonservierung in den zehn verschiedenen Agarose-Medien; ^{a,b,c,d} Plots mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

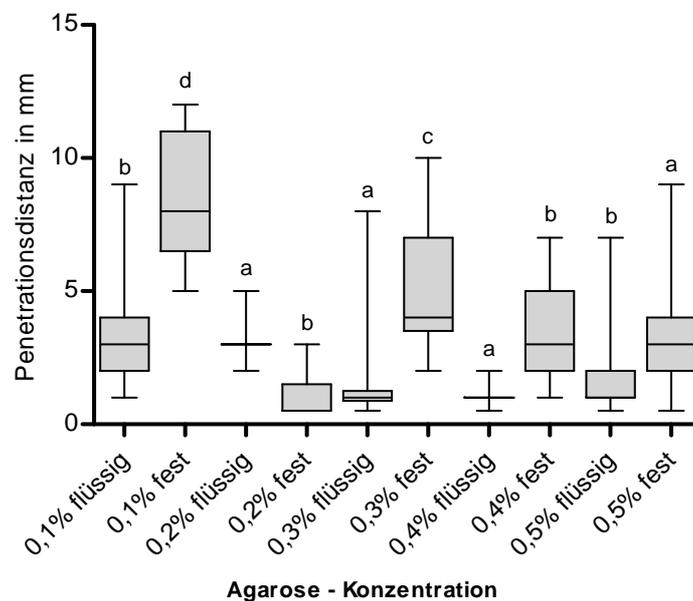


Abb. 14: Darstellung der Penetrationsdistanzen (MW, mm) des ersten bovinen Spermiums nach Kryokonservierung in den zehn verschiedenen Agarose-Medien; ^{a,b,c,d} Plots mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

Ergebnisse

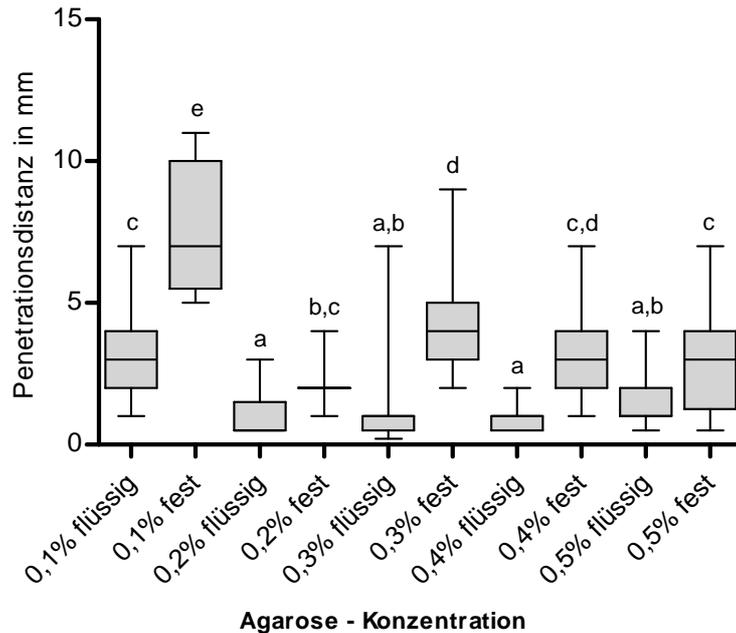


Abb. 15: Darstellung der Penetrationsdistanzen (MW, mm) der ersten fünf bovinen Spermien nach Kryokonservierung in den zehn verschiedenen Agarose-Medien; ^{a,b,c,d,e} Plots mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

4.2.1.3 Penetrationstest in Polyacrylamid-Gel

4.2.1.3.1 Unterschied zwischen Ansatz 1 und Ansatz 2

Weder in Bezug auf das erste lebende Spermium noch bezüglich des ersten Spermiums, der ersten 5 lebenden Spermien oder der Anzahl der Samenzellen in einem Gesichtsfeld bei der 1-cm-Markierung, der 2-cm-Markierung und der 3-cm-Markierung liegt ein signifikanter Unterschied der Penetrationsdistanzen zwischen Ansatz 1 und Ansatz 2 vor ($p > 0,05$).

4.2.1.3.2 Ergebnisse des Penetrationstests in Bezug auf die einzelnen Medien

Insgesamt wurden 480 Penetrationstests bovinen kryokonservierten Samens mit Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Von 80 Versuchen mit 1,9 %igem Polyacrylamid-Gel unter Zusatz von Puffer I (PAG 1,9-I) waren 4 Tests nicht auswertbar (5,0 %). Von 80 Versuchen mit 1,9 %igem Polyacrylamid-Gel + Puffer II (PAG 1,9-II) waren mit 7

Ergebnisse

Kapillaren 8,8 % nicht auswertbar. 1,9 %iges Gel in Verbindung mit Puffer III (PAG 1,9-III) war bei 80 Tests 5x nicht auswertbar (6,3 %). 2 %iges Polyacrylamid-Gel unter Verwendung von Puffer I (PAG 2-I) und Puffer II (PAG 2-II) war mit jeweils 6 von 80 Kapillaren 7,5 % nicht auswertbar. Von 80 Test 2 %igen Polyacrylamid-Gels mit Puffer III (PAG 2-III) waren 9 (11,3 %) nicht auswertbar. Eine Übersicht über Mittelwerte, Minima und Maxima der Penetrationsdistanzen in Bezug auf das erste, das erste lebende und die ersten fünf lebenden Samenzellen können Tabelle 10 entnommen werden, vergleichende graphische Darstellungen zeigen die Abbildungen 17 bis 19.

Tab. 10: Übersichten der Penetrationsdistanzen von kryokonserviertem bovinem Samen in Polyacrylamid-Gel, SD = Standardabweichung, Min = Minimum, Max = Maximum

	Erste lebende Samenzelle (mm)		Erstes Spermium (mm)		Vorderste 5 lebende Spermien (mm)	
	MW ± SD	Min/Max	MW ± SD	Min/Max	MW ± SD	Min/Max
Medium						
PAG1,9-I	14,8 ± 13,2	0,05/60	16,6 ± 13,7	0,5/60	11,8 ± 12,4	0,05/60
PAG1,9-II	22,6 ± 16,1	0,05/65	24,5 ± 16,7	0,5/65	20 ± 16,1	0,05/65
PAG1,9-III	35,6 ± 22,8	0,05/65	37 ± 22,5	0,5/65	32 ± 23,1	0,05/65
PAG2-I	10,5 ± 10,1	0,05/48	12,4 ± 10,3	0,5/48	8,5 ± 9	0,05/47
PAG2-II	13,6 ± 10,7	0,05/55	15,3 ± 11	0,5/55	10,9 ± 9,8	0,05/55
PAG2-III	28 ± 19,3	0,05/65	28,9 ± 19,1	0,5/65	24 ± 18,8	0,05/59

Ergebnisse

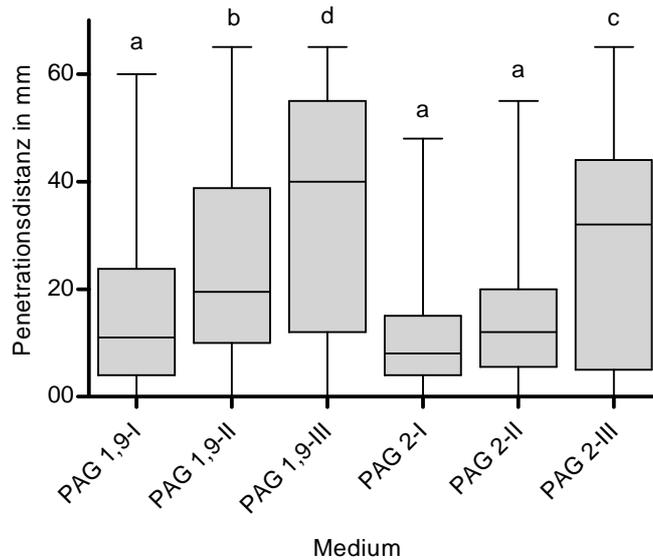


Abb. 16: Verteilung der Penetrationsdistanzen des ersten lebenden bovinen Spermiums nach Kryokonservierung in den sechs verschiedenen Polyacrylamid-Medien (PAG; I = TRIS 18, II = TRIS 23, III = PBS); ^{a,b,c,d} Plots mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

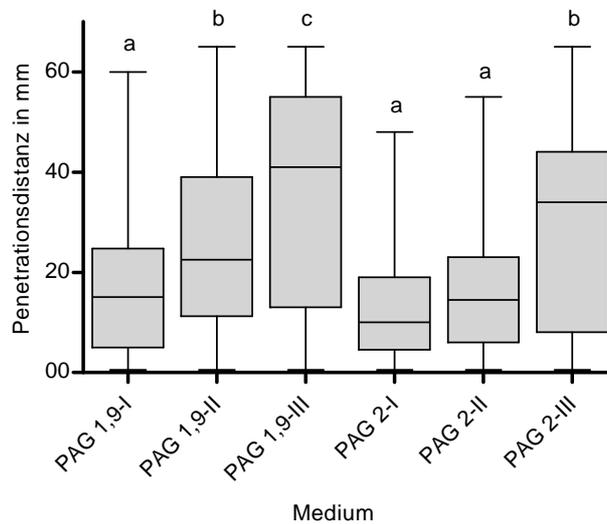


Abb. 17: Verteilung der Penetrationsdistanzen des ersten bovinen Spermiums nach Kryokonservierung in den sechs verschiedenen Polyacrylamid-Medien (PAG; I = TRIS 18, II = TRIS 23, III = PBS); ^{a,b,c} Plots mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

Ergebnisse

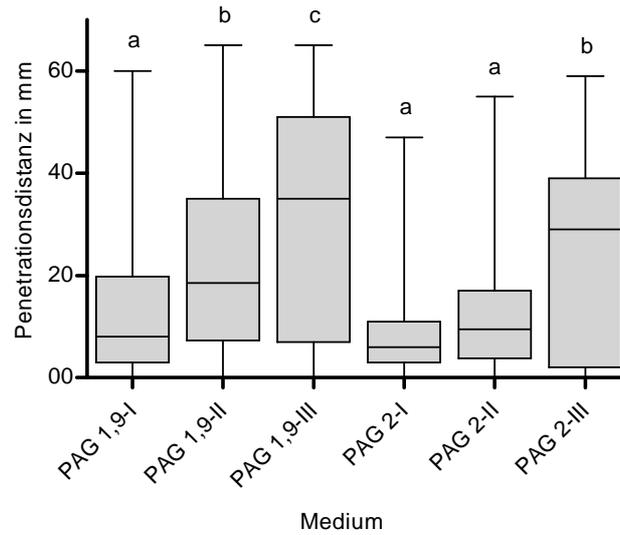


Abb. 18: Verteilung der Penetrationsdistanzen der ersten 5 bovinen Spermien nach Kryokonservierung in den sechs verschiedenen Polyacrylamid-Medien (PAG; I = TRIS 18, II = TRIS 23, III = PBS); ^{a,b,c} Plots mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

Die Häufigkeitsverteilungen der Spermienanzahl bei der 1-cm-, 2-cm- und 3-cm-Markierung in den sechs verschiedenen Medien können den Tabellen 11 bis 16 entnommen werden.

Ergebnisse

Tab. 11: Häufigkeitsverteilung der Spermienanzahl an der 1-cm-, 2-cm- und 3-cm-Markierung; Medium: PAG 1,9-I

Anzahl der Spermien	Häufigkeit					
	1-cm-Markierung		2-cm-Markierung		3-cm-Markierung	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0	30	39,5	50	65,8	64	84,2
0 - 50	18	23,7	14	18,4	7	9,2
50 - 100	5	6,6	3	3,9	0	0
100 - 200	12	15,8	4	5,3	3	3,9
> 200	6	7,9	3	3,9	0	0
Nicht zählbar/zu dicht	5	6,6	2	2,6	2	2,6
Gesamt	76	100	76	100	76	100

Tab. 12: Häufigkeitsverteilung der Spermienanzahl an der 1-cm-, 2-cm- und 3-cm-Markierung; Medium: PAG 1,9-II

Anzahl der Spermien	Häufigkeit					
	1-cm-Markierung		2-cm-Markierung		3-cm-Markierung	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0	16	22,2	34	47,2	45	62,5
0 - 50	18	25	12	16,7	9	12,5
50 - 100	5	6,9	2	2,8	3	4,2
100 - 200	12	16,7	12	16,7	10	13,9
> 200	12	16,7	10	13,9	3	4,2

Ergebnisse

Nicht zählbar/zu dicht	9	12,5	2	2,8	2	2,8
Gesamt	72	100	72	100	72	100

Tab. 13: Häufigkeitsverteilung der Spermienanzahl an der 1-cm-, 2-cm- und 3-cm-Markierung; Medium: PAG 1,9-III

Anzahl der Spermien	Häufigkeit					
	1-cm-Markierung		2-cm-Markierung		3-cm-Markierung	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0	20	26,7	22	29,3	26	34,7
0 - 50	6	8	12	16	17	22,7
50 - 100	8	10,7	5	6,7	7	9,3
100 - 200	12	16	15	20	13	17,3
> 200	19	25,3	10	13,3	7	9,3
Nicht zählbar/zu dicht	10	13,3	11	14,7	5	6,7
Gesamt	75	100	75	100	75	100

Ergebnisse

Tab. 14: Häufigkeitsverteilung der Spermienanzahl an der 1-cm-, 2-cm- und 3-cm-Markierung; Medium: PAG 2-I

Anzahl der Spermien	Häufigkeit					
	1-cm-Markierung		2-cm-Markierung		3-cm-Markierung	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0	33	45,2	60	82,2	68	93,2
0 - 50	13	17,8	6	8,2	2	2,7
50 - 100	9	12,3	1	1,4	1	1,4
100 - 200	10	13,7	3	4,1	0	0
> 200	4	5,5	1	1,4	0	0
Nicht zählbar/zu dicht	4	5,5	2	2,7	2	2,7
Gesamt	73	100	73	100	73	100

Tab. 15: Häufigkeitsverteilung der Spermienanzahl an der 1-cm-, 2-cm- und 3-cm-Markierung; Medium: PAG 2-II

Anzahl der Spermien	Häufigkeit					
	1-cm-Markierung		2-cm-Markierung		3-cm-Markierung	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0	24	32,4	49	66,2	69	93,2
0 - 50	14	18,9	13	17,6	3	4,1
50 - 100	5	6,8	5	6,8	0	0
100 - 200	17	23	3	4,1	0	0

Ergebnisse

> 200	6	8,1	2	2,7	0	0
Nicht zählbar/zu dicht	8	10,8	2	2,7	2	2,7
Gesamt	74	100	74	100	74	100

Tab. 16: Häufigkeitsverteilung der Spermienanzahl an der 1-cm-, 2-cm- und 3-cm-Markierung; Medium: PAG 2-III

Anzahl der Spermien	Häufigkeit					
	1-cm-Markierung		2-cm-Markierung		3-cm-Markierung	
	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%	Häufigkeit	%
0	19	26,8	26	36,6	30	42,3
0 - 50	8	11,3	10	14,1	21	29,6
50 - 100	9	12,7	7	9,9	5	7
100 - 200	6	8,5	11	15,5	7	9,9
> 200	14	19,7	13	18,3	3	4,2
Nicht zählbar/zu dicht	15	21,1	4	5,6	5	7
Gesamt	71	100	71	100	71	100

Es konnten signifikante Unterschiede innerhalb den einzelnen Medien in Bezug auf die an den drei Markierungen erfassten Spermienzahlen nachgewiesen werden (Abbildungen 20 bis 22).

Ergebnisse

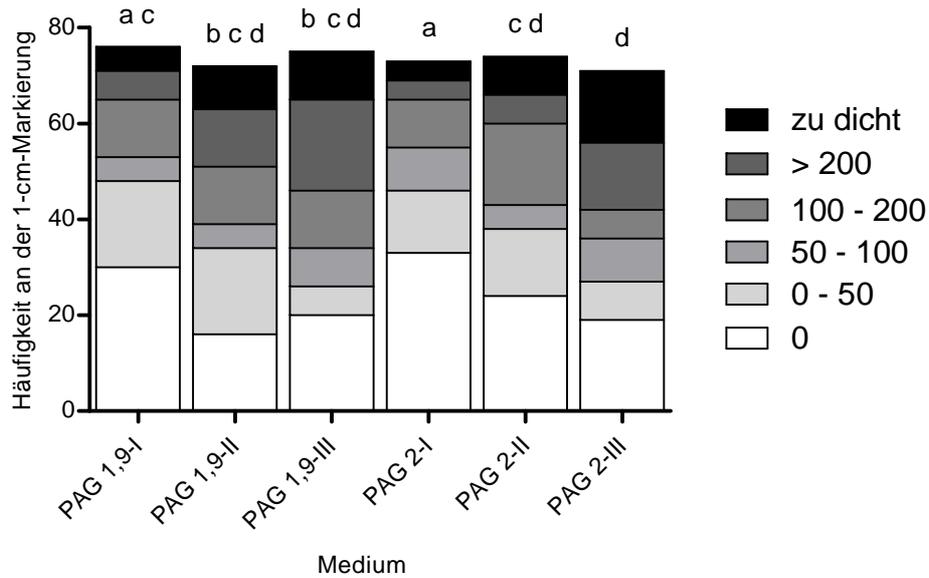


Abb. 19: Grafische Darstellung der Häufigkeitsverteilung an der 1-cm-Markierung im Vergleich zwischen den Medien; ^{a,b,c,d} Balken mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

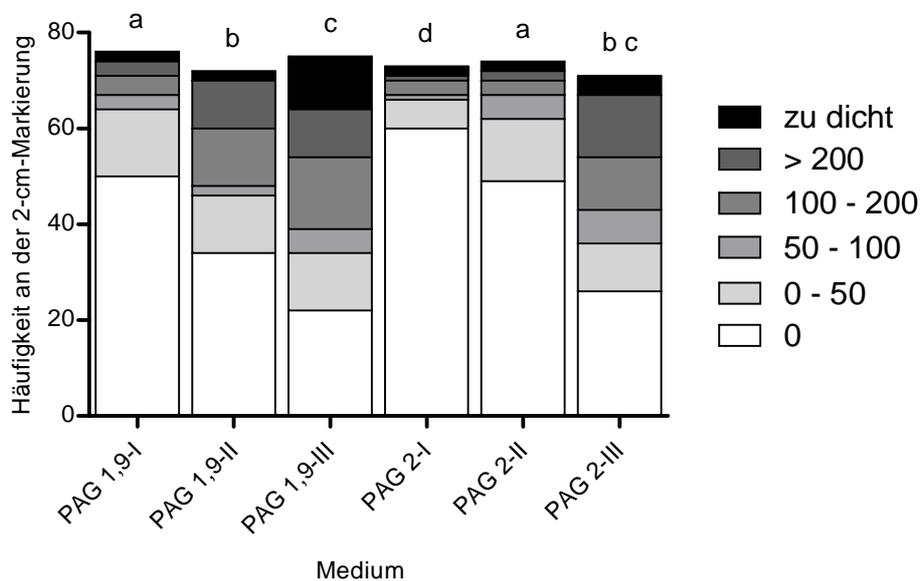


Abb. 20: Grafische Darstellung der Häufigkeitsverteilung an der 2-cm-Markierung im Vergleich zwischen den Medien; ^{a,b,c,d} Balken mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

Ergebnisse

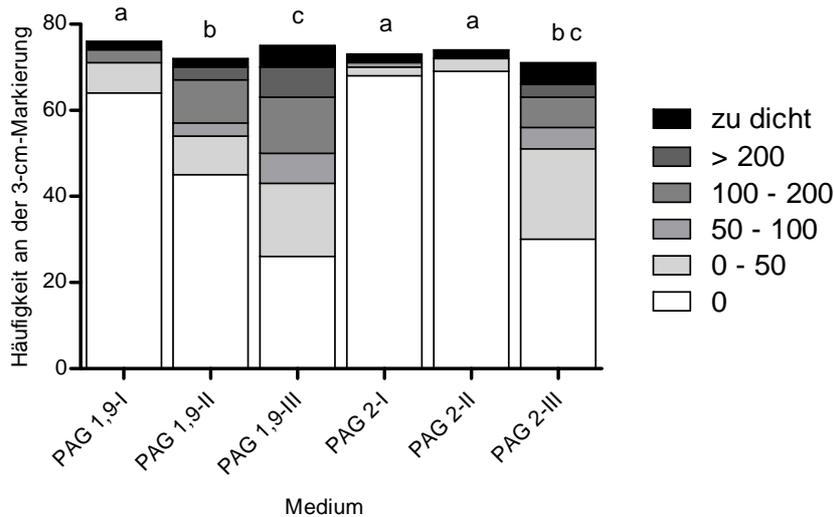


Abb. 21: Grafische Darstellung der Häufigkeitsverteilung an der 3-cm-Markierung im Vergleich zwischen den Medien; ^{a,b,c} Balken mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$)

4.2.1.3.3 Korrelationen zwischen den Auswertmethoden

Zwischen allen Auswertmethoden konnten hochsignifikante Korrelationen nachgewiesen werden. Die Korrelationskoeffizienten in Abhängigkeit der verschiedenen Polyacrylamid-Gele sind den Tabellen 17 bis 22 zu entnehmen.

Tab. 17: Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Auswertmethoden untereinander, Medium: PAG 1,9-I, SZ = Samenzelle; *** $p < 0,001$

Parameter	Erste SZ	Erste 5 lebende SZ	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
Erste lebende SZ	0,984***	0,943***	0,858***	0,820***	0,612***
Erste SZ		0,932***	0,870***	0,825***	0,620***
Erste 5 lebende SZ			0,869***	0,784***	0,546***
Anzahl bei 1 cm				0,736***	0,546***
Anzahl bei 2 cm					0,700***

Ergebnisse

Tab. 18: Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Auswertmethoden untereinander, Medium: PAG 1,9-II, SZ = Samenzelle; ***p<0.001

Parameter	Erste SZ	Erste 5 lebende SZ	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
Erste lebende SZ	0,989***	0,987***	0,928***	0,907***	0,836***
Erste SZ		0,975***	0,919***	0,907***	0,847***
Erste 5 lebende SZ			0,919***	0,902***	0,836***
Anzahl bei 1 cm				0,899***	0,767***
Anzahl bei 2 cm					0,859***

Tab. 19: Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Auswertmethoden untereinander, Medium: PAG 1,9-III, SZ = Samenzelle; ***p<0.001

Parameter	Erste SZ	Erste 5 lebende SZ	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
Erste lebende SZ	0,977***	0,980***	0,778***	0,833***	0,882***
Erste SZ		0,952***	0,829***	0,867***	0,870***
Erste 5 lebende SZ			0,773***	0,834***	0,889***
Anzahl bei 1 cm				0,907***	0,847***
Anzahl bei 2 cm					0,904***

Tab. 20: Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Auswertmethoden untereinander, Medium: PAG 2-I, SZ = Samenzelle; ***p<0.001

Parameter	Erste SZ	Erste 5 lebende SZ	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
Erste lebende SZ	0,983***	0,934***	0,888***	0,661***	0,433***
Erste SZ		0,918***	0,884***	0,664***	0,425***
Erste 5 lebende SZ			0,898***	0,602***	0,439***
Anzahl bei 1 cm				0,592***	0,415***
Anzahl bei 2 cm					0,625***

Ergebnisse

Tab. 21: Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Auswertmethoden untereinander, Medium: PAG 2-II, SZ = Samenzelle; ***p<0.001

Parameter	Erste SZ	Erste 5 lebende SZ	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
Erste lebende SZ	0,982***	0,950***	0,860***	0,813***	0,432***
Erste SZ		0,943***	0,897***	0,817	0,432***
Erste 5 lebende SZ			0,883***	0,834***	0,384***
Anzahl bei 1 cm				0,729***	0,392***
Anzahl bei 2 cm					0,432***

Tab. 22: Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Auswertmethoden untereinander, Medium: PAG 2-III, SZ = Samenzelle; ***p<0.001

Parameter	Erste SZ	Erste 5 lebende SZ	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
Erste lebende SZ	0,996***	0,978***	= 0,837***	0,829***	0,886***
Erste SZ		0,972***	0,858***	0,843***	0,900***
Erste 5 lebende SZ			0,828***	0,825***	0,880***
Anzahl bei 1 cm				0,948***	0,888***
Anzahl bei 2 cm					0,902***

4.2.1.3.4 Korrelationen zwischen den Auswertmethoden und Parametern der spermatologischen Untersuchung

Zwischen den sechs Auswertungsvarianten und den Parametern Gesamtmotilität, Vorwärtsbeweglichkeit und Anteil lebender Spermien sowie den kinetischen Parametern der computerassoziierten Spermaanalsebestanden ebenfalls jeweils hochsignifikante Korrelationen. Übersichten der Korrelationskoeffizienten in Bezug auf das jeweilige Medium finden sich in den Tabellen 23 bis 28.

Tab. 23: Korrelationskoeffizienten zwischen den sechs Auswertmethoden sowie Parametern der spermatologischen Untersuchung, Medium: PAG 1,9-I; GM=Gesamtmotilität, VB=Vorwärtsbeweglichkeit, AIS=Anzahl lebender Spermien, Morph=Prozentsatz morphologischer Veränderungen

Parameter	Erstes lebendes Spermium	Erstes Spermium	Erste 5 lebende Spermien	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
GM	0,644***	0,670***	0,675***	0,763***	0,550***	0,402***
VB	0,665***	0,684***	0,687***	0,780***	0,558***	0,408***
AIS	0,397***	0,395***	0,422***	0,403***	0,360***	0,278*
Morph	-0,070	-0,077	-0,102	-0,155	-0,145	-0,210
DAP	0,649***	0,659***	0,618***	0,712***	0,555***	0,372***
DCL	0,653***	0,659***	0,622***	0,658***	0,523***	0,349**
DSL	0,603***	0,628***	0,578***	0,728***	0,588***	0,362***
VAP	0,664***	0,677***	0,638***	0,729***	0,571***	0,380***
VCL	0,666***	0,675***	0,640***	0,689***	0,552***	0,380***
VSL	0,687***	0,703***	0,641***	0,764***	0,594***	0,382***
STR	0,430***	0,456***	0,351**	0,416***	0,286*	0,120
LIN	0,188	0,215	0,139	0,309	0,191	0,045
WOB	-0,310**	-0,307**	-0,278*	-0,130	-0,113	-0,144
ALH	0,446***	0,476***	0,469***	0,601***	0,431***	0,341**
BCF	0,558***	0,575***	0,500***	0,616***	0,473***	0,358**

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Ergebnisse

Tab. 24: Korrelationskoeffizienten zwischen den sechs Auswertmethoden sowie Parametern der spermatologischen Untersuchung, Medium: PAG 1,9-II; GM=Gesamtmotilität, VB=Vorwärtsbeweglichkeit, AIS=Anzahl lebender Spermien, Morph=Prozentsatz morphologischer Veränderungen

Parameter	Erstes lebendes Spermium	Erstes Spermium	Erste 5 lebende Spermien	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
GM	0,708***	0,732***	0,734***	0,794***	0,783***	0,662***
VB	0,709***	0,732***	0,731***	0,795***	,773***	0,655***
AIS	0,373***	0,391***	0,368***	0,430***	0,458***	0,413***
Morph	-0,061	-0,076	-0,108	-0,084	-0,120	-0,214
DAP	0,633***	0,668***	0,636***	0,680***	0,638***	0,612***
DCL	0,607***	0,642***	0,610***	0,612***	0,575***	0,549***
DSL	0,648***	0,681***	0,642***	0,680***	0,648***	0,649***
VAP	0,677***	0,711***	0,679***	0,713***	0,675***	0,646***
VCL	0,645***	0,680***	0,648***	0,664***	0,625***	0,585***
VSL	0,708***	0,743***	0,698***	0,746***	0,700***	0,681***
STR	0,454***	0,472***	0,405***	0,331**	0,183	0,206
LIN	0,290*	0,296*	0,247*	0,333**	0,162	0,156
WOB	-0,157	-0,170	-0,154	0,008	-0,032	-0,028
ALH	0,563***	0,594***	0,585***	0,693***	0,666***	0,570***
BCF	0,538***	0,557***	0,538***	0,492***	0,471***	0,449***

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Ergebnisse

Tab. 25: Korrelationskoeffizienten zwischen den sechs Auswertmethoden sowie Parametern der spermatologischen Untersuchung, Medium: PAG 1,9-III; GM=Gesamtmotilität, VB=Vorwärtsbeweglichkeit, AIS=Anzahl lebender Spermien, Morph=Prozentsatz morphologischer Veränderungen

Para-meter	Erstes lebendes Spermium	Erstes Spermium	Erste 5 lebende Spermien	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
GM	0,672***	0,719***	0,692***	0,850***	0,833***	0,805***
VB	0,668***	0,709***	0,685***	0,847***	,834***	0,806***
AIS	0,268*	0,302**	0,241*	0,503***	0,435***	0,350**
Morph	0,166	0,137	0,113	0,003	0,055	0,054
DAP	0,754***	0,760***	0,754***	0,792***	0,751***	0,760***
DCL	0,725***	0,729***	0,719***	0,752***	0,709***	0,711***
DSL	0,757***	0,757***	0,756***	0,780***	0,743***	0,754***
VAP	0,766***	0,776***	0,771***	0,802***	0,769***	0,782***
VCL	0,738***	0,746***	0,736***	0,774***	0,733***	0,743***
VSL	0,804***	0,813***	0,794***	0,812***	0,787***	0,788***
STR	0,568***	0,571***	0,504***	0,322**	0,317**	0,274*
LIN	0,284*	0,286*	0,258*	0,259*	0,262*	0,236*
WOB	-0,324**	-0,320**	-0,273*	-0,156	-0,124	-0,117
ALH	0,633***	0,661***	0,673***	0,760***	0,731***	0,739***
BCF	0,625***	0,646***	0,571***	0,548***	0,523***	0,419***

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Ergebnisse

Tab. 26: Korrelationskoeffizienten zwischen den sechs Auswertmethoden sowie Parametern der spermatologischen Untersuchung, Medium: PAG 2-I; GM=Gesamtmotilität, VB=Vorwärtsbeweglichkeit, AIS=Anzahl lebender Spermien, Morph=Prozentsatz morphologischer Veränderungen

Para-meter	Erstes lebendes Spermium	Erstes Spermium	Erste 5 lebende Spermien	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
GM	0,601***	0,624***	0,652***	0,733***	0,342**	0,282*
VB	0,604***	0,632***	0,652***	0,722***	,320**	0,247*
AIS	0,390***	0,399***	0,379***	0,464***	0,254*	0,129
Morph	0,057	0,041	0,034	-0,004	0,024	0,165
DAP	0,588***	0,633***	0,581***	0,640***	0,255*	0,138
DCL	0,595***	0,635***	0,591***	0,603***	0,235*	0,136
DSL	0,561***	0,599***	0,562***	0,652***	0,201**	0,115
VAP	0,602***	0,648***	0,604***	0,652***	0,280*	0,141
VCL	0,608***	0,649***	0,612***	0,631***	0,265*	0,143
VSL	0,608***	0,660***	0,695***	0,677***	0,288*	0,146
STR	0,342**	0,393***	0,297*	0,214	0,093	-0,056
LIN	0,123	0,165	0,093	0,173	0,112	-0,066
WOB	-0,293*	-0,297*	-0,277*	-0,127	-0,016	-0,101
ALH	0,446***	0,488***	0,502***	0,673***	0,286*	0,186
BCF	0,507***	0,548***	0,469***	0,469***	0,300**	0,187

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Ergebnisse

Tab. 27: Korrelationskoeffizienten zwischen den sechs Auswertmethoden sowie Parametern der spermatologischen Untersuchung, Medium: PAG 2-II; GM=Gesamtmotilität, VB=Vorwärtsbeweglichkeit, AIS=Anzahl lebender Spermien, Morph=Prozentsatz morphologischer Veränderungen

Parameter	Erstes lebendes Spermium	Erstes Spermium	Erste 5 lebende Spermien	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
GM	0,567***	0,636***	0,612***	0,726***	0,463***	0,262*
VB	0,577***	0,646***	0,619***	0,718***	,452***	0,248*
AIS	0,360**	0,366***	0,330**	0,387***	0,221	0,180
Morph	0,011	-0,040	0,007	-0,075	-0,076	0,088
DAP	0,611***	0,658***	0,604***	0,637***	0,447***	0,238*
DCL	0,612***	0,648***	0,602***	0,584***	0,408***	0,240*
DSL	0,581***	0,623***	0,568***	0,646***	0,487***	0,235*
VAP	0,616***	0,666***	0,621***	0,653***	0,461***	0,216
VCL	0,618***	0,656***	0,618***	0,613***	0,428***	0,230*
VSL	0,637***	0,690***	0,627***	0,683***	0,490***	0,240*
STR	0,377***	0,409***	0,316**	0,268*	0,185	0,040
LIN	0,110	0,148	0,100	0,275*	0,188	-0,064
WOB	-0,265*	-0,243*	-0,215	0,010	0,019	-0,160
ALH	0,386***	0,437***	0,433***	0,583***	0,387***	0,131
BCF	0,543***	0,585***	0,487***	0,529***	0,352**	0,276*

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Ergebnisse

Tab. 28: Korrelationskoeffizienten zwischen den sechs Auswertmethoden sowie Parametern der spermatologischen Untersuchung, Medium: PAG 2-III; GM=Gesamtmotilität, VB=Vorwärtsbeweglichkeit, AIS=Anzahl lebender Spermien, Morph=Prozentsatz morphologischer Veränderungen

Para-meter	Erstes lebendes Spermium	Erstes Spermium	Erste 5 lebende Spermien	Anzahl bei 1 cm	Anzahl bei 2 cm	Anzahl bei 3 cm
GM	0,711***	0,742***	0,685***	0,834***	0,793***	0,740***
VB	0,697***	0,727***	0,669***	0,815***	0,773***	0,712***
AIS	0,329**	0,341**	0,301*	0,515***	0,409***	0,364**
Morph	0,108	0,082	0,127	0,037	0,074	0,142
DAP	0,719***	0,729***	0,696***	0,697***	0,642***	0,597***
DCL	0,691***	0,697***	0,670***	0,654***	0,596***	0,554***
DSL	0,677***	0,682***	0,660***	0,681***	0,622***	0,579***
VAP	0,741***	0,754***	0,718***	0,720***	0,667***	0,616***
VCL	0,712***	0,720***	0,693***	0,687***	0,634***	0,582***
VSL	0,748***	0,761***	0,721***	0,722***	0,669***	0,622***
STR	0,420***	0,428***	0,371***	0,145	0,074	0,048
LIN	0,188	0,201	0,158	0,167	0,114	0,106
WOB	-0,272*	-0,262*	-0,250	-0,141	-0,104	-0,098
ALH	0,712***	0,725***	0,709***	0,750***	0,742***	0,714***
BCF	0,522***	0,540***	0,478***	0,431***	0,353**	0,288*

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

4.2.2 Versuchsaufbau II - Nativsperma

4.2.2.1 Einfluss der Behandlung der Ejakulate

In Bezug auf die Behandlungsart, also das Maß an thermischem Stress, dem jedes Ejakulat ausgesetzt wurde, wurden die in den Tabellen 29 bis 34 dargestellten Penetrationsdistanzen (Mittelwerte, Minima und Maxima) bzw. die in Tabelle 35 erfassten Häufigkeiten erzielt werden. Die Varianzanalyse zeigte einen signifikanten Einfluss der thermischen Behandlung auf die Resultate der Routineanalyse (für alle Medien: Motilität: $p < 0.05$, Vorwärtsbeweglichkeit: $p < 0.05$, Anteil lebender Spermien: $p < 0.05$, Prozentsatz pathomorphologischer Veränderungen: $p < 0.05$), eine Aufstellung der Mittelwerte, Minima und Maxima sind in Tab. 36 dargestellt. Der Einfluss auf die drei Distanzparametern des Penetrationstestes für PAG 1,9-I, PAG 1,9-III und PAG 2-II hochsignifikant ($p < 0,01$), und für PAG 2-III signifikant ($p < 0,05$). Für PAG 1,9-II und PAG 2-I konnte in Bezug auf die ersten 5 lebenden Samenzellen kein signifikanter Zusammenhang zur thermischen Schädigung nachgewiesen werden, für die Parameter erstes und erstes lebendes Spermium betrug das Signifikanzniveau jeweils $p < 0,05$. Im Hinblick auf die erfasste Spermienanzahl an der 1-, 2- und 3-cm-Markierung stellte sich für die sechs verschiedenen Medien jeweils ein signifikanter Zusammenhang zur Behandlungsart heraus mit Ausnahme von PAG 1,9-III (Anzahl bei 1 cm nicht signifikant), PAG 2-I (bei 2 cm und 3 cm nicht signifikant), PAG 2-II (bei 3 cm nicht signifikant) und PAG 2-III (bei 1 cm und 2 cm nicht signifikant).

Ergebnisse

Tab. 29: Übersicht über Mittelwerte, Minima und Maxima (MW, Min, Max) der Penetrationsdistanzen boviner Samenzellen in Bezug auf die Behandlungsart vor Durchführung des Penetrationstestes (PAG 1,9-I)

Behandlung	Erstes lebendes Spermium		Erstes Spermium		Erste 5 lebende Spermien	
	MW	Min/Max	MW	Min/Max	MW	Min/Max
30 min Raumtemperatur	30,9	23,0/48,0	32,0	24,0/48,0	24,2	13,0/40,0
3 Std. Wärmeplatte bei 37°C	8,2	3,0/19,0	8,6	3,0/19,0	4,7	2,0/9,0
5 Std. Kühlschrank + 12 Std. Raumtemperatur	9,5	3,0/24,0	11,3	4,0/24,0	5,9	1,0/15,0
24 Std. Kühlschrank	27,8	13,0/41,0	30,0	16,0/43,0	18,7	6,0/30,0
24 Std. Kühlschrank + 1,5 Std. 41°C	4,8	2,0/8,0	5,6	3,0/10,0	4,0	1,0/8,0

Tab. 30: Übersicht über Mittelwerte, Minima und Maxima (MW, Min, Max) der Penetrationsdistanzen boviner Samenzellen in Bezug auf die Behandlungsart vor Durchführung des Penetrationstestes (PAG 1,9-II)

Behandlung	Erstes lebendes Spermium		Erstes Spermium		Erste 5 lebende Spermien	
	MW	Min/Max	MW	Min/Max	MW	Min/Max
30 min Raumtemperatur	29,7	17,0/45,0	32,8	18,0/45,0	24,9	10,0/41,0
3 Std. Wärmeplatte bei 37°C	15,1	6,0/25,0	15,5	7,0/25,0	11,1	5,0/20,0
5 Std. Kühlschrank + 12 Std. Raumtemperatur	15,5	7,0/41,0	18,1	9,0/41,0	11,0	3,0/31,0
24 Std. Kühlschrank	32,9	12,0/65,0	34,5	14,0/65,0	25,2	8,0/65,0
24 Std. Kühlschrank + 1,5 Std. 41°C	10,0	4,0/17,0	10,9	5,0/18,0	8,4	4,0/17,0

Ergebnisse

Tab. 31: Übersicht über Mittelwerte, Minima und Maxima (MW, Min, Max) der Penetrationsdistanzen boviner Samenzellen in Bezug auf die Behandlungsart vor Durchführung des Penetrationstestes (PAG 1,9-III)

Behandlung	Erstes lebendes Spermium		Erstes Spermium		Erste 5 lebende Spermien	
	MW	Min/Max	MW	Min/Max	MW	Min/Max
30 min Raumtemperatur	57,0	35,0/65,0	57,1	35,0/65,0	53,5	33,0/65,0
3 Std. Wärmeplatte bei 37°C	33,0	16,0/49,0	33,1	16,0/49,0	22,1	4,0/40,0
5 Std. Kühlschrank + 12 Std. Raumtemperatur	35,3	0/53,0	35,4	0,5/53,0	30,4	0/51,0
24 Std. Kühlschrank	44,1	19,0/60,0	44,2	20,0/60,0	39,1	9,0/54,0
24 Std. Kühlschrank + 1,5 Std. 41°C	19,3	19,0/60,0	20,1	5,0/43,0	14,7	1,0/35,0

Tab. 32: Übersicht über Mittelwerte, Minima und Maxima (MW, Min, Max) der Penetrationsdistanzen boviner Samenzellen in Bezug auf die Behandlungsart vor Durchführung des Penetrationstestes (PAG 2-I)

Behandlung	Erstes lebendes Spermium		Erstes Spermium		Erste 5 lebende Spermien	
	MW	Min/Max	MW	Min/Max	MW	Min/Max
30 min Raumtemperatur	18,8	10,0/36,0	21,2	10,0/37,0	13,0	8,0/23,0
3 Std. Wärmeplatte bei 37°C	10,2	3,0/34,0	11,6	4,0/34,0	8,7	1,0/28,0
5 Std. Kühlschrank + 12 Std. Raumtemperatur	3,9	1,0/5,0	6,0	1,0/10,0	3,4	0,5/5,0
24 Std. Kühlschrank	17,3	4,0/41,0	19,6	6,0/41,0	10,1	4,0/21,0
24 Std. Kühlschrank + 1,5 Std. 41°C	3,7	2,0/7,0	4,6	2,0/8,0	3,0	0,5/5,0

Ergebnisse

Tab. 33: Übersicht über Mittelwerte, Minima und Maxima (MW, Min, Max) der Penetrationsdistanzen boviner Samenzellen in Bezug auf die Behandlungsart vor Durchführung des Penetrationstestes (PAG 2-II)

Behandlung	Erstes lebendes Spermium		Erstes Spermium		Erste 5 lebende Spermien	
	MW	Min/Max	MW	Min/Max	MW	Min/Max
30 min Raumtemperatur	26,6	20,0/35,0	28,6	21,0/35,0	20,4	17,0/28,0
3 Std. Wärmeplatte bei 37°C	9,1	4,0/17,0	10,5	4,0/17,0	7,2	1,0/14,0
5 Std. Kühlschrank + 12 Std. Raumtemperatur	7,3	0,5/15,0	9,2	0,5/15,0	5,3	0,5/12,0
24 Std. Kühlschrank	19,4	12,0/34,0	20,5	14,0/34,0	14,0	9,0/25,0
24 Std. Kühlschrank + 1,5 Std. 41°C	5,1	3,0/10,0	5,4	3,0/11,0	4,1	1,0/9,0

Tab. 34: Übersicht über Mittelwerte, Minima und Maxima (MW, Min, Max) der Penetrationsdistanzen boviner Samenzellen in Bezug auf die Behandlungsart vor Durchführung des Penetrationstestes (PAG 2-III)

Behandlung	Erstes lebendes Spermium		Erstes Spermium		Erste 5 lebende Spermien	
	MW	Min/Max	MW	Min/Max	MW	Min/Max
30 min Raumtemperatur	43,0	17,0/58,0	43,2	17,0/58,0	37,8	7,0/55,0
3 Std. Wärmeplatte bei 37°C	25,0	0,5/49,0	25,7	0,5/49,0	20,9	0/46,0
5 Std. Kühlschrank + 12 Std. Raumtemperatur	20,0	1,0/40,0	21,0	3,0/40,0	16,8	0,5/35,0
24 Std. Kühlschrank	32,8	4,0/44,0	34,0	8,0/44,0	30,0	4,0/42,0
24 Std. Kühlschrank + 1,5 Std. 41°C	9,9	1,0/38,0	9,9	1,0/38,0	7,0	0,5/35,0

Ergebnisse

Tab. 35. Vergleich der Spermienanzahl an der 1-, 2- und 3-cm-Markierung in Bezug auf die Behandlungsart; SZ = Samenzellen, Anzahlcodierung: [0] keine Spermien, [1] 0-50 SZ, [2] 50-100 SZ, [3] 100-200 SZ, [4] >200 SZ, [5] Dichte zu hoch

Behandlung	Medium Anzahl der SZ	Häufigkeit (%)																		
		1cm					2cm					3cm								
		[0]	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[0]	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[0]	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	
30 min Raum- temperatur	PAG 1,9-I	41,7	25,0	25,0	33,3	33,3	33,3	91,7	8,3	8,3	25	8,3	8,3	50,0	50,0	50,0	8,3	8,3	8,3	
	PAG 1,9-II	25,0	25,0	16,7	33,3	33,3	33,3	8,3	58,3	25	8,3	8,3	8,3	33,3	50,0	25,0	33,3	16,7	25,0	
	PAG 1,9-III	8,3	41,7	50,0	50,0	50,0	50,0	16,7	33,3	33,3	50,0	50,0	50,0	25,0	33,3	16,7	25,0	25,0	25,0	25,0
	PAG 2-I	25,0	25,0	16,7	33,3	33,3	33,3	58,3	33,3	8,3	8,3	8,3	8,3	91,7	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
	PAG 2-II	16,7	8,3	66,7	8,3	8,3	8,3	66,6	16,7	16,7	16,7	16,7	16,7	58,3	25,0	25,0	16,7	16,7	16,7	16,7
	PAG 2-III	8,3	8,3	33,3	50,0	50,0	50,0	8,3	8,3	16,7	41,7	25,0	25,0	8,3	33,3	25	16,7	16,7	16,7	16,7
3 Std. Wärmeplatt e bei 37°C	PAG 1,9-I	72,7	27,3	27,3	27,3	27,3	27,3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	PAG 1,9-II	27,3	63,6	9,1	9,1	9,1	9,1	72,7	27,3	27,3	27,3	27,3	27,3	100	100	100	100	100	100	100
	PAG 1,9-III	25,0	25,0	8,3	25,0	16,7	16,7	33,3	41,7	8,3	8,3	16,7	16,7	33,3	41,7	16,7	16,7	16,7	16,7	8,3
	PAG 2-I	66,7	16,7	8,3	8,3	8,3	8,3	75,0	16,7	8,3	8,3	8,3	8,3	91,7	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3	8,3
	PAG 2-II	50,0	25,0	8,3	8,3	8,3	8,3	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	PAG 2-III	7,3	18,2	9,1	9,1	36,4	36,4	45,5	18,1	9,1	9,1	27,3	27,3	54,5	36,4	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1

Ergebnisse

5 Std. Kühlschrank + 12 Std. Raum- temperatur	PAG 1,9-I	50,0	33,3	8,3	91,7	8,3	100
	PAG 1,9-II	16,7	66,7	8,3	83,3	16,7	91,7 8,3
	PAG 1,9-III	16,7	16,7	16,7	25,0	25,0	33,3 66,7
	PAG 2-I	91,7	8,3		100		100
	PAG 2-II	41,7	50,0	8,3	100		100
	PAG 2-III	16,7	41,7	41,7	50,0	25,0	25,0 33,3
24 Std. Kühlschrank	PAG 1,9-I	41,7	33,3	8,3	16,7	83,3	41,7 58,3
	PAG 1,9-II	27,3	9,1	9,1	54,5	18,2	54,5 27,3 9,1
	PAG 1,9-III	16,7	8,3	16,7	33,3	25,0	8,3 50,0 8,3 33,3
	PAG 2-I	16,7	33,3	25,0	8,3	16,7	83,3 16,7
	PAG 2-II	33,3	16,7	50,0	50,0	41,7	8,3 8,3
	PAG 2-III	8,3	25,0	8,3	8,3	33,3	16,7 8,3 8,3 33,3
24 Std. Kühlschrank + 1,5 Std. 41°C	PAG 1,9-I	91,7	8,3		100		100
	PAG 1,9-II	54,5	27,3	9,1	9,1		100
	PAG 1,9-III	41,7	33,3	8,3	16,7	8,3	75,0 25,0
	PAG 2-I	100			100		100
	PAG 2-II	81,8	18,2		100		100
	PAG 2-III	66,7	16,7	8,3	8,3	8,3	83,3 8,3 8,3

Ergebnisse

Tab. 36: Mittelwerte, Minima und Maxima (MW, Min, Max, in mm) der Parameter Gesamtmotilität, Vorwärtsbeweglichkeit, Anteil lebender Spermien und Pathomorphologie in Abhängigkeit von der Behandlungsart

Behandlung	Motilität		Vorwärtsbeweglichkeit		Anteil Lebender SZ		Pathomorphologie	
	MW	Min/Max	MW	Min/Max	MW	Min/Max	MW	Min/Max
30 min Raumtemperatur	53,3	27,1/78,5	44,7	20,6/71,7	66,8	56,5/75,5	6,3	2,5/15,0
3 Std. Wärmeplatte bei 37°C	42,2	12,2/70,8	33,6	4,5/63,4	66,9	31,5/78,5	10,1	3,0/18,0
5 Std. Kühlschrank + 12 Std. Raumtemperatur	39,8	6,8/70,6	31,3	0,5/60,1	64,9	39,5/83,0	4,8	3,0/8,0
24 Std. Kühlschrank	51,7	21,1/85,1	43,8	16,5/78,8	62,1	35,0/83,0	4,8	1,0/8,0
24 Std. Kühlschrank + 1,5 Std. 41°C	39,2	12,3/76,7	28,4	4,7/66,6	53,1	37,0/72,5	6,1	2,5/11,0

4.2.2.2 Ergebnisse des Penetrationstests vor und nach Kryokonservierung

Im direkten Vergleich der Penetrationstest-Ergebnisse wiesen alle Medien mit Ausnahme von PAG 1,9-II in Bezug auf die Penetrationsdistanzen des ersten und des ersten lebenden einen signifikanten Zusammenhang der Ergebnisse vor und nach Kryokonservierung auf (für PAG 1,9-III jeweils: $p < 0,05$; alle anderen: $p < 0,001$). Bei PAG 1,9-II war bezüglich des ersten und des ersten lebenden Spermiums die gleiche Tendenz erkennbar, der Zusammenhang erreichte jedoch knapp keine statistische Signifikanz. Der Zusammenhang zwischen den Penetrationsdistanzen der ersten fünf lebenden Spermien vor und nach Kryokonservierung war bei allen sechs Medium statistisch signifikant. Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Parameter können Tabelle 37 entnommen werden, Signifikanzniveaus und Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 38 zusammengefasst. Vergleichende grafische Übersichten der Penetrationsdistanzen in Form von Boxplots zeigen die Abbildungen 23 bis 25.

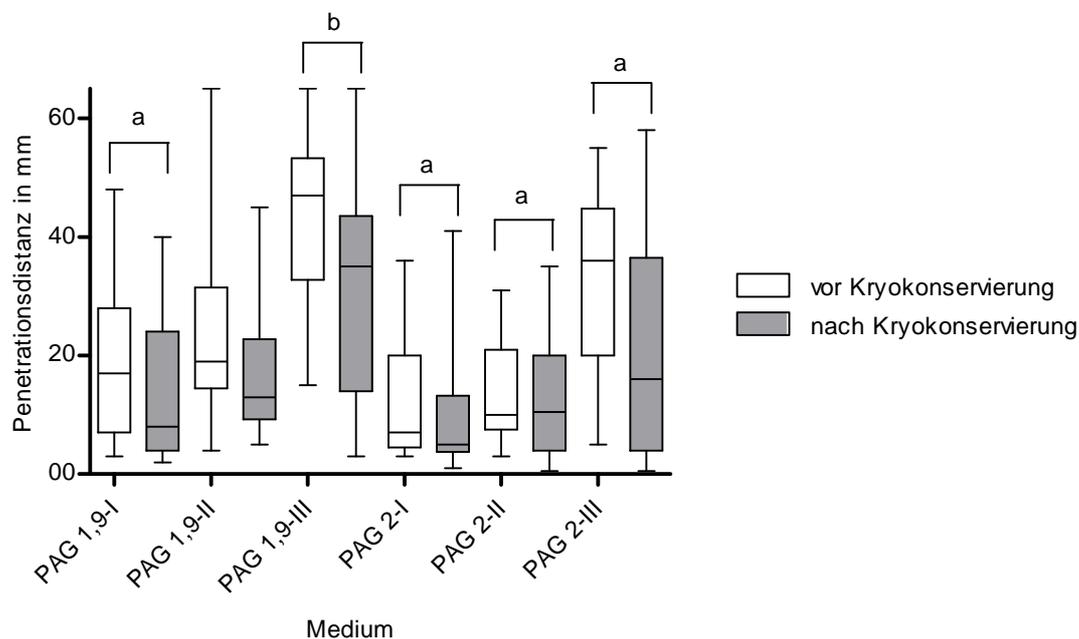


Abb. 22: Übersicht über Penetrationsdistanzen des ersten lebenden bovines Spermiums sowie Signifikanzniveau jeweils vor und nach Kryokonservierung in den sechs verschiedenen Polyacrylamid-Medien; ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,05$

Ergebnisse

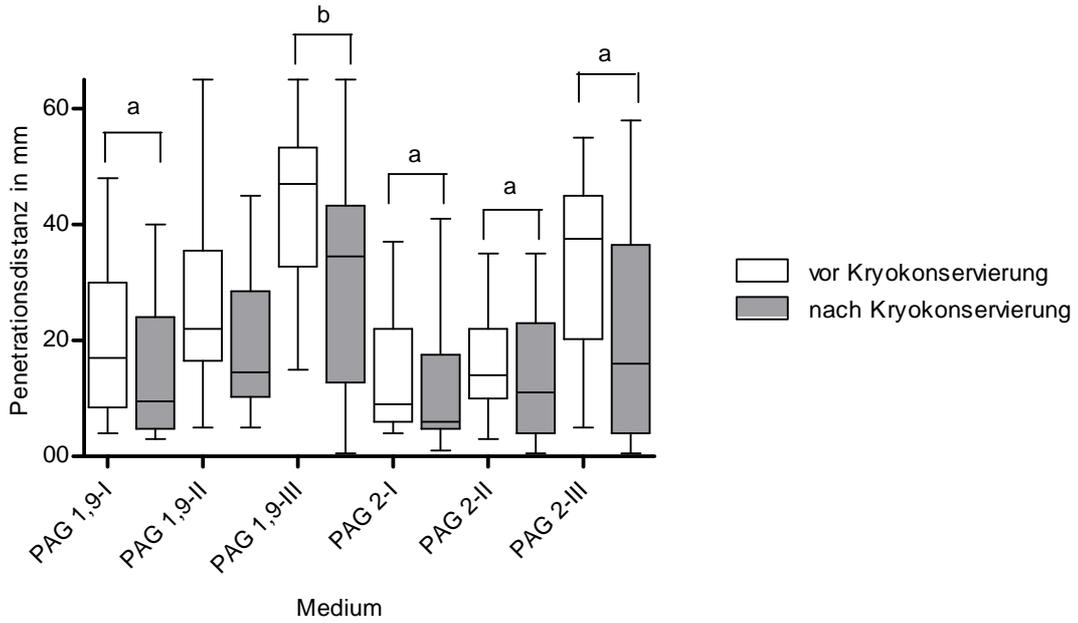


Abb. 23: Übersicht über Penetrationsdistanzen des ersten bovinen Spermiums sowie Signifikanzniveau jeweils vor und nach Kryokonservierung in den sechs verschiedenen Polyacrylamid-Medien; ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,05$

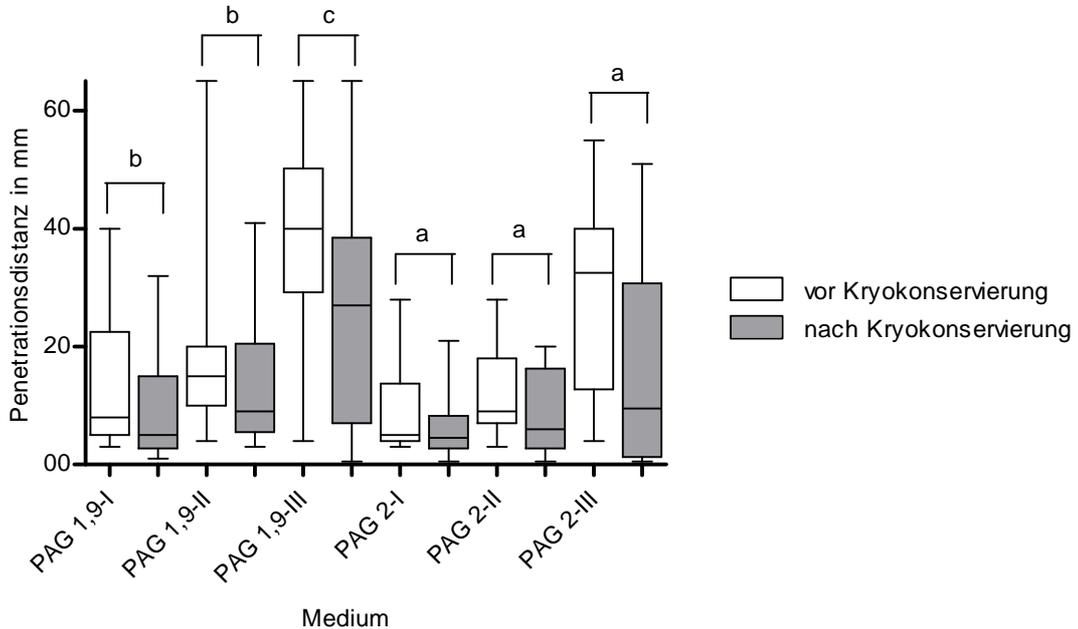


Abb. 24: Übersicht über Penetrationsdistanzen der ersten 5 lebenden bovinen Samenzellen sowie Signifikanzniveau jeweils vor und nach Kryokonservierung in den sechs verschiedenen Polyacrylamid-Medien; ^a $p < 0,001$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,05$

Ergebnisse

Tab. 37: Übersicht über die Penetrationsdistanzen (MW \pm SD) des ersten, des ersten lebenden und der ersten 5 lebenden Samenzellen vor und nach Kryokonservierung im Vergleich aller Medien; TG = Tiefgefrierung, ^{a,b}: verschiedene Indizes pro Zeile und Spaltenpaar vor/nach TG kennzeichnen signifikante Unterschiede

Medium	Erstes lebendes Spermium (mm)		Erstes Spermium (mm)		Vorderste 5 lebende Spermien (mm)	
	vor TG	nach TG	vor TG	nach TG	vor TG	nach TG
PAG 1,9-I	18,9 \pm 13,2 ^a	13,6 \pm 11,6 ^b	20,1 \pm 13,1 ^a	14,9 \pm 11,9 ^b	13,8 \pm 10,7 ^a	9,3 \pm 8,2 ^b
PAG 1,9-II	23,5 \pm 14,2	17,2 \pm 10,4	25,3 \pm 14,0	18,8 \pm 11,0	18,5 \pm 11,7 ^a	13,4 \pm 9,5 ^b
PAG 1,9-III	45,0 \pm 12,8 ^a	30,5 \pm 18,9 ^b	45,1 \pm 12,7 ^a	30,8 \pm 18,5 ^b	39,4 \pm 15,6 ^a	24,5 \pm 18,8 ^b
PAG 2-I	12,1 \pm 10,1 ^a	9,5 \pm 8,5 ^b	14,0 \pm 10,4 ^a	11,2 \pm 9,2 ^b	9,2 \pm 6,9 ^a	6,1 \pm 4,5 ^b
PAG 2-II	14,5 \pm 8,7 ^a	12,7 \pm 9,3 ^b	16,5 \pm 8,9 ^a	13,4 \pm 10,0 ^b	12,0 \pm 6,6 ^a	8,5 \pm 6,7 ^b
PAG 2-III	32,2 \pm 14,8 ^a	19,8 \pm 15,9 ^b	33,0 \pm 14,6 ^a	20,2 \pm 15,7 ^b	29,0 \pm 14,6 ^a	15,3 \pm 15,2 ^b

Ergebnisse

Tab. 38: Übersicht Korrelationskoeffizienten der drei Distanzparameter sowie der Spermienzahlerfassung bei 1-, 2- und 3-cm im Vergleich vor und nach Kryokonservierung in Bezug auf die sechs eingesetzten Medien

	PAG 1,9-I	PAG 1,9-II	PAG 1,9-III	PAG 2-I	PAG 2-II	PAG 2-III
Erste lebende SZ	0,809***	0,498	0,623*	0,946***	0,880***	0,779***
Erste SZ	0,879***	0,498	0,618*	0,940***	0,880***	0,795***
Erste 5 lebende SZ	0,693**	0,690**	0,634*	0,934***	0,925***	0,801***
Anzahl bei 1 cm	0,661**	0,556*	0,370	0,881***	0,872***	0,551*
Anzahl bei 2 cm	0,929***	0,541*	0,588*	0,976***	0,916***	0,617*
Anzahl bei 3 cm	0,595*	0,413	0,650**	0,535*	0,358	0,663**

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

Der Zusammenhang der jeweils vor und nach Kryokonservierung an der 1-, 2- und 3-cm-Markierung erfassten Anzahl von Samenzellen war in Bezug auf PAG 1,9-I, PAG 2-I und PAG 2-III statistisch signifikant. In PAG 1,9-II und PAG 2-II erreichten die Resultate in Bezug auf die 3-cm-Markierung keine statistische Signifikanz, bei PAG 1,9-III traf dies auf die 1-cm-Markierung zu. Eine Aufstellung der Korrelationskoeffizienten kann Tab. 38 entnommen werden, eine Übersicht über die einzelnen Ergebnisse zeigt Tab. 39.

Ergebnisse

Tab. 39: Häufigkeitsverteilung der Spermienanzahl an der 1-cm-, 2-cm- und 3-cm-Markierung vor und nach Kryokonservierung im Vergleich aller Medien; SZ = Samenzellen, TG = Tiefgefrierung

Medium	Häufigkeit (%)																	
	1cm					2cm					3cm							
	[0]	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[0]	[1]	[2]	[0]	[1]	[2]	[0]	[1]	[2]			
PAG 1,9-I vor TG	34,5	24,1	17,2	6,9	13,8	3,4	55,2	41,4	3,4				65,5	34,5				
nach TG	50	36,7	6,7	6,7			66,7	33,3					90,0	10,0				
PAG 1,9-II vor TG	13,8	34,5	13,8	6,9	31,0		48,3	37,9	3,4	10,3			72,4	13,8	6,9			
nach TG	25,0	50,0	10,7	7,1	7,1		67,9	25,0	7,1				78,6	21,4				
PAG 1,9-III vor TG	20,0		6,7	26,7	36,7		6,7	23,3	16,7	16,7	36,7		13,3	46,7	10,0	6,7	20,0	3,3
nach TG	33,3	16,7	10,0	20,0	20,0		36,7	30,0	10,0	10,0	13,3		46,7	36,7	10,0	3,3	3,3	
PAG 2-I vor TG	51,7	13,8	3,4	13,8	17,2		75,9	17,2	6,9				89,7	10,3				
nach TG	56,7	20,0	20,0	3,3			83,3	16,7					96,7	3,3				
PAG 2-II vor TG	17,2	31,0	10,3	6,9	31,2	3,4	75,9	17,2	6,9				89,7	10,3				
nach TG	50,0	20,0	10,0	20,0			83,3	16,7					96,7	3,3				
PAG 2-III vor TG	20,0	6,7	26,7	36,7	10,0		6,7	23,3	16,7	16,7	36,7		13,3	46,7	10,0	6,7	20,0	3,3
nach TG	33,3	16,7	10,0	20,0	20,0		36,7	30,0	10,0	10,0	13,3		46,7	36,7	10,0	3,3	3,3	

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

In der Literatur wurde bereits mehrfach der Einsatz eines Spermienpenetrationstests beschrieben und auch als durchaus geeignete Ergänzung der klassischen Samenanalyse bewertet. Einigen Studien zufolge gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Penetrationsdistanz und der Fertilität von Wiederkäuern (MURASE et al., 1990, SUTTIYOTIN et al., 1992), bei caprinem Samen wurden signifikant mehr Spermien aus Ejakulaten mit hohen Migrationsdistanzen in der uterotuberalen Verbindung besamter Ziegen gefunden als solche mit niedrigen Migrationsergebnissen (COX et al., 2002). Es wurde verschiedentlich statuiert, dass der SPT zusätzliche Informationen liefert, die durch eine spermatologische Untersuchung nicht erfasst werden (BALS-PRATSCH et al., 1988, EGGERT-KRUSE et al., 1993). Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen SPT und Fertilität fanden andere Autoren keine signifikanten Korrelationen (KUMMERFELD et al., 1981, GALLI et al., 1991, VERBERCKMOES et al., 2002), jedoch wurde keine dieser Studien unter Einsatz von Polyacrylamid-Gel als Medium durchgeführt. Obwohl empfohlen wurde, den Penetrationstest aufgrund seiner auf Bullen überdurchschnittlicher Fertilität hinweisenden Ergebnisse innerhalb von Rinderbesamungsstationen als Routinetest einzusetzen (GILLAN et al., 2008) und auch PAG als geeignetes Medium bewertet wurde (URRY et al., 1986), steht bisher kein in die spermatologischen Routinediagnostik integrierter In-vitro-Funktionstest für Bullen zur Verfügung. Daher war das Ziel dieser Untersuchungen, basierend auf den Informationen in der Literatur, einen technisch einfachen und kostengünstigen Penetrationstest für bovine Samenzellen zu etablieren. Da die instrumentelle Besamung bei dieser Spezies nahezu ausschließlich durch kryokonserviertes Sperma erfolgt, wurde der Test an flüssig- und kryokonservierten Samenzellen durchgeführt. Zudem wurde die Aussagekraft des Penetrationstestes im Hinblick auf Samenqualität vor dem Tiefgefrieren und seinen prognostischen Wert in Bezug auf die Motilität nach Kryokonservierung überprüft.

5.2 Diskussion der Methode

Die vorliegende Studie gliedert sich in zwei Teilabschnitte. Zunächst sollte ein Penetrationstest unter Zuhilfenahme eines synthetischen Mediums in seiner grundsätzlichen Durchführbarkeit unter den Aspekten der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie der möglichst einfachen Handhabung etabliert werden. Dies bedingte zum einen die Herstellung eines adäquaten Mediums, zum anderen das Auffinden einer geeigneten Kapillarart. Auf dieser Grundlage basierend war das Ziel des zweiten Abschnittes, aus einer Vielzahl in der Literatur beschriebenen Methoden der Testauswertung eine einfach anwendbare zu ermitteln, die zudem eine hohe Aussagekraft in Bezug auf die Samenqualität hat. Als Qualitätsmaß galten hierbei Parameter der spermatologischen Untersuchung, die mittels computerassoziierter Analyse bestimmt wurden.

In der vorliegenden Studie wurde zunächst ein Vorversuch mit Agarose-Gel als Penetrationsmedium durchgeführt, da dies schnell und preiswert auch in größeren Mengen hergestellt werden kann. Das Agarose-Gel erwies sich jedoch in keiner der getesteten Konzentrationen als geeignet. Selbst bei Samenproben guter Qualität mit einer Gesamtmotilität von > 70 % konnte unabhängig von der Agarose-Konzentration keine über 12 mm hinausgehende Penetrationsdistanz erreicht werden, in Polyacrylamid-Gel dagegen erstreckte sich die Spannweite bei Einsatz der gleichen Ejakulate unabhängig vom Medium bis zu 34 mm. Qualitätsunterschiede kristallisierten sich folglich im Agarosemedium deutlich schlechter heraus. Die besten Ergebnisse im Sinne von größten Penetrationsdistanzen konnten bei in fester Form aufgezogenen 0,1 %-igem Agarose-Gel erzielt werden. Auf einer Strecke von nur 7 mm (minimale Penetrationsdistanz = 5 mm, maximale Distanz 12 mm) spiegelten sich hier Unterschiede in der Gesamtmotilität von 35 % bis 71 % wider. Die Penetration in Agarose-Gel ließ demzufolge lediglich deutliche und bereits offensichtliche Qualitätsunterschiede erkennen und erwies sich als zu wenig sensitiv für den praktischen Einsatz.

In bisherigen Arbeiten mit Polyacrylamid-Gel korrelierte eine gute Penetrationsfähigkeit in 1,8 %-igem Gel im Vergleich zu Gel mit niedrigeren Konzentrationen signifikant höher mit der Fertilität des jeweiligen Spenders (LORTON et al., 1981; EGGERT-KRUSE et al., 1993). 2 %-iges Polyacrylamid-Gel

wurde bisher bezüglich seiner physikalischen Eigenschaften als bovinem Zervikalmukus am ähnlichsten bewertet, während 3 %-iges Gel sich als zu dicht erwies, um es in Kapillaren zu füllen (LORTON et al., 1981). In der vorliegenden Studie wurde Polyacrylamid-Gel zum einen in 2 %-iger Konzentration eingesetzt, um die physikalische Entsprechung zum bovinen Zervikalmukus zu bewahren, zum anderen in 1,9 %-iger Konzentration, um durch eine etwas geringere Viskosität das Eindringen der Spermien zu erleichtern und eventuell deutlichere Ergebnisse in den Penetrationsdistanzen zu erhalten.

Als Pufferlösung bei der Herstellung des Polyacrylamid-Gels wurden bis dato entweder TRIS-Puffer (LORTON et al., 1981) oder phosphatgepufferte Salzlösung (LORTON et al., 1981; ANILKUMAR et al., 2001; TAS et al., 2007b) eingesetzt. Um in den eigenen Untersuchungen die optimale Zusammensetzung des Mediums zu finden, wurde jedes Gel aliquotiert und mit drei verschiedenen Puffern versetzt.

In bisherigen Studien wurde der Penetrationstest zum Teil mit flachen, eckigen (KATZ et al., 1980; ALEXANDER, 1981; GILLAN et al., 2008) und zum Teil mit runden (KREMER, 1965; DAVID et al., 1979; VERBERCKMOES et al., 2002) Kapillaren durchgeführt. Der Vorteile flacher Kapillaren sahen die Autoren vor allem in der besseren Beurteilbarkeit im Lichtmikroskop aufgrund der fehlenden Rundung (MILLS und KATZ, 1978), die zum Teil zu einer schlechteren Identifizierbarkeit der Spermienzellen in der Mitte des Röhrchens führten (KREMER, 1965). In der vorliegenden Arbeit wurden runde Kapillaren zur Durchführung gewählt, da sie unter Zuhilfenahme eines guten Mikroskops den flachen Röhrchen durchaus gleichwertig sind, zur Standardausrüstung der meisten Labore gehören und zudem eine kleinere Samenprobe zur Durchführung erfordern als eckige Kapillaren (GOLDSTEIN et al., 1982).

Als Inkubationstemperatur wurden 37,5 °C festgelegt, da bereits andere Autoren (STUMPF et al., 1984; GALLI et al., 1991; MURASE et al., 1999) deutlich geringere Penetrationsdistanzen bei Temperaturen unter 37 °C nachgewiesen haben. In Bezug auf die Inkubationsdauer unterscheiden sich die Literaturangaben zum Teil stark. Einige Autoren wählten eine Inkubationszeit von zehn (KUMMERFELD et al., 1981a; MURASE et al., 1990) bzw. fünfzehn Minuten (LORTON et al., 1981; TAS et al., 2007b), andere 30 (AITKEN et al., 1992; ANILKUMAR et al., 2001), 60 (GILLAN et al., 2008) oder 120 Minuten (VON STERN, 2001; WHO, 2010). CORREA et al. (1997) wiesen im Vergleich von Bullen hoher mit solchen niedrigerer Fertilität nach,

dass sich die Penetrationsdistanzen nach einer Inkubation für 30 Minuten signifikant zwischen beiden Gruppen unterschieden, während diese Unterschiede nach 60 Minuten Inkubationszeit nicht mehr nachweisbar waren. Dies zeigt, wie wichtig die Inkubationszeit für die Testauswertung ist. Darauf basierend wurde in der vorliegenden Studie die Inkubationszeit auf 30 Minuten festgelegt; dies ermöglicht die Erfassung der Parameter der spermatologischen Untersuchung in der Zeit zwischen Ansetzen und Auslesen des Penetrationstests und damit die Integration des Testes in den Arbeitsablauf einer Besamungsstation. Die Inkubation wurde sowohl mit horizontal (DAVID et al., 1979; LORTON et al., 1981; MURASE et al., 1990) als auch mit vertikal (URRY et al., 1986; ANILKUMAR et al., 2001; TAS et al., 2007a) gelagerten Kapillaren beschrieben. URRY et al. (1986) wählten die Inkubation in aufrechter Position, um ein Fließen des Mukus in der Kapillare zu verhindern. MURASE et al. (1999) stellten fest, dass die Ausrichtung der Kapillare während der Inkubationszeit keinen Einfluss auf die Penetrationsdistanz hat. Um den optimalen Kontakt zwischen gelgefüllter Kapillare und Samenreservoir zu gewährleisten und ein Auslaufen des Samens aus dem Inkubationsgefäß zu verhindern, wurde die vorliegende Studie mit vertikal inkubierten Kapillaren durchgeführt. Dieses Vorgehen wird für die Routinediagnostik als einfacher angesehen, da die Kapillaren in die Reaktionsgefäße gestellt werden können und danach keine weitere Manipulation erforderlich ist.

Um deutliche Qualitätsunterschiede der Frischsamenproben zu induzieren und die prognostische Aussagekraft des Penetrationstest im Vergleich vor und nach Tiefgefrierung im Hinblick auf Vorschädigungen des Samens zu eruieren, wurde jedes Ejakulat vor der Kryokonservierung aliquotiert und unterschiedlichen thermischen und temporären Stresssituationen ausgesetzt, da thermaler Stress nachweislich schädigend auf Spermatozoen wirkt (BAMBA und CRAN, 1988).

Die Motilitätsanalyse mittels CASA ist derzeit das Standardverfahren in der Evaluierung boviner Samenqualität (FARRELL et al., 1998; CONTRI et al., 2010) und wurde deshalb zur Erfassung der Motilitätsparameter im Rahmen der spermatologischen Untersuchung herangezogen.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Penetrationsmedium

In der vorliegenden Studie zeigten sich bezüglich der verwendeten Gelkonzentrationen jeweils signifikante Unterschiede in der Penetrationsdistanz des vordersten lebenden Spermiums zwischen PAG 1,9-II und PAG 2-II ($p < 0,001$) sowie PAG 1,9-III und PAG 2-III ($p = 0,023$). Der Unterschied zwischen PAG 1,9-I und PAG 2-I war nur knapp nicht signifikant ($p = 0,051$), zeigte also die gleiche Tendenz (siehe auch Abb. 16). Ähnliches beobachteten EGGERT-KRUSE et al. (1993), die Polyacrylamid-Gel in den Konzentrationen 1,5 %, 1,6 %, 1,7 %, und 1,8 % herstellten und in der Untersuchung humaner Samenzellen einsetzten. Die Autoren stellten ein mit steigender Gelkonzentration sinkendes Penetrationsvermögen der Samenzellen im Gel fest. Sowohl die mittlere Penetrationsdistanz des jeweils vordersten Spermiums als auch die Spermiedichte bei 1-, 2-, 3-, 4- und 5 cm waren im 1,8 %-igem Gel signifikant niedriger als in den geringer konzentrierten Varianten. Mittlere Penetrationsdistanzen lagen hierbei zwischen 10 mm in 1,5 %-igem Gel und 5 mm in 1,8 %-igem Gel. Die in der vorliegenden Arbeit signifikant höchste Penetrationsdistanz des jeweils vordersten, des vordersten motilen Spermiums sowie der vordersten fünf motilen Spermien wurde im Vergleich aller sechs Medien bei Einsatz des 1,9 %-igen Polyacrylamid-Gels mit PBS-Puffer-Zusatz erreicht. Die mittleren Penetrationsdistanzen des vordersten Spermiums in PAG 1,9-III erreichten mit 37 mm deutlich höhere Werte als die von EGGERT-KRUSE et al. (1993) beschriebenen Distanzen der menschlichen Spermien in Polyacrylamid-Gel, deren Mittelwert bei 10 mm lag. Die erzielten Werte liegen eher im Bereich der von LORTON et al. (1981) in 1,8 %-igem Polyacrylamid-Gel erzielten Penetrationsstrecken, wobei jene Arbeitsgruppe mit 15 Minuten nur die Hälfte der hier verwendeten Inkubationszeit ansetzte. Eine Erklärung hierfür ist mit großer Wahrscheinlichkeit in der höheren Konzentration des in der vorliegenden Arbeit verwendeten 1,9 %-igen Polyacrylamid-Gels zu finden, die die Penetrationsfähigkeit der Samenzellen im Vergleich zu 1,8 %-igem Gel mindert. ANILKUMAR et al. (2001) inkubierten bovine Spermien nach Kryokonservierung für 30 Minuten in 2 %-igem Polyacrylamid-Gel und erzielten im Mittel eine Penetrationsdistanz des vordersten Spermiums von 21 mm. Ähnliche Ergebnisse erhielten LORTON et al. (1981) in ihrem Versuch mit 2 %-igem Polyacrylamid-Gel,

hier erreichten sie nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten eine Penetrationsdistanz von bis zu 25 mm. Diese im Vergleich zur vorliegenden Studie kürzeren mittleren Distanzen sind durch die wiederum höhere Konzentration der von den Autoren eingesetzten Gele erklärbar. Prinzipiell ist das Ablesen des Tests bei Samenproben mit größerer Penetrationsdistanz deutlich einfacher, da sich das Feld der migrierten Spermien tendenziell weiter auseinanderzieht. Zudem werden hier Qualitätsunterschiede eher deutlich, da sie auf größerem Raum sichtbar und somit leichter erkennbar werden. Stellt sich der Unterschied zwischen einem Ejakulat guter gegenüber einem Ejakulat minderer Qualität mit einer größeren Differenz in der Penetrationsdistanz dar, werden einerseits vorhandene Unterschiede deutlicher, andererseits werden auch kleinere Qualitätsunterschiede, die bei insgesamt kürzeren Distanzen nicht erkennbar wären, erst sichtbar.

5.3.2 Auswertung des Penetrationstests

In bisher durchgeführten Studien variierte die Auswertung des Penetrationstests unter den unterschiedlichen Arbeitsgruppen regelmäßig in Bezug auf das Ablesen der Penetrationsdistanz. Einige Autoren definierten die Penetrationsstrecke als jene Distanz, die das sich zuvorderst befindliche Spermium zurückgelegt hat (URRY et al., 1986; MATOUSEK et al., 1989; MURASE et al., 1990; NIEDERBERGER et al., 1993), andere werteten die zurückgelegte Strecke zwischen der Mukus-Samen-Kontaktzone und dem vordersten noch motilen Spermium (GALLI et al., 1991) oder den ersten fünf noch lebenden Spermien (KUMMERFELD et al., 1981a; LORTON et al., 1981; GOLDSTEIN et al., 1982; VERBERCKMOES et al., 2002). Auch die Messung der Spermiedichte in verschiedenen definierten Abständen von 5 bzw. 10 mm im Bereich zwischen 10 mm und 50 mm fand Anwendung als Parameter (DAVID et al., 1979; JONSSON et al., 1986; URRY et al., 1986; DE GEYTER et al., 1988; AITKEN et al., 1992; EGGERT-KRUSE et al., 1993; GILLAN et al., 2008; WHO, 2010). In der vorliegenden Studie wurden die gängigsten Methoden der Auswertung des Penetrationstests miteinander verglichen. Sie lieferten statistisch signifikant positiv zusammenhängende Resultate. Beim Ablesen der Penetrationsergebnisse stellte sich die Erfassung der Spermienanzahl pro Gesichtsfeld bei 1 cm, 2 cm und 3 cm als deutlich schwieriger und somit auch fehleranfälliger als die Messung der Penetrationsdistanzen des ersten, des ersten lebenden oder der ersten fünf lebenden Spermien heraus. Der Schwierigkeitsgrad

erhöhte sich mit steigender Spermienanzahl pro Gesichtsfeld. TAS et al. (2007b) umgingen dieses Problem, indem sie zwei verschiedene Distanzbereiche einer Länge von jeweils 0,25 cm festlegten, die sie nach Testdurchführung jeweils aus der zuvor tiefgefrorenen Kapillare ausschnitten und auf einem Objektträger ausbreiteten, um dort alle im Gel befindlichen Spermienzellen zu zählen. In jüngeren Studien wurde diese Methode zur weiteren Objektivierung unter Verwendung einer Fluoreszenzfärbung und nachfolgend automatisierter Auswertung mittels Computer modifiziert (MARTINEZ-RODRIGUEZ et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde im Hinblick auf eine einfache und rasche Testdurchführung auf eine Färbung verzichtet, das Gel wurde zur Auswertung in der Kapillare belassen und ein Klassifikationssystem zur Erfassung der Spermienanzahl festgelegt.

In einer retrospektiven Auswertung von 18 Studien zum Penetrationstest mit insgesamt 2580 Proben (OLA et al., 2003) wurde ermittelt, dass die Erfassung der Samenzellkonzentration im Gel der Messung der Distanz des vordersten Spermiums überlegen ist. Dem gegenüber ergab der Vergleich der sechs verschiedenen Methoden der Auswertung in der vorliegenden Studie hochsignifikante Korrelationen ($p < 0,001$) zwischen allen Varianten, unabhängig vom eingesetzten Medium. Die höchsten Korrelationskoeffizienten ergaben sich unabhängig vom Penetrationsmedium zwischen der Penetrationsdistanz des ersten, des ersten lebenden und der ersten fünf lebenden Samenzellen ($r = 0,918$ bis $r = 0,996$). Übereinstimmend mit Ergebnissen früherer Studien (GALLI et al., 1991) erscheint in der vorliegenden Arbeit die Erfassung der Penetrationsdistanz der ersten lebenden Samenzelle am wenigsten fehleranfällig, da die motilen Spermien leicht im künstlichen Gel zu identifizieren sind.

5.3.3 Auswertmethoden und spermatologische Untersuchung

Im Vergleich dieser sechs Auswertvarianten mit den Parametern Gesamtmotilität und Vorwärtsbeweglichkeit konnten bei allen drei PAG 1,9-Variationen hochsignifikante Korrelationen ($p < 0,001$) nachgewiesen werden, alle drei PAG 2-Variationen zeigten signifikante Korrelationen mit $p < 0,05$ bezüglich dieser zwei Motilitätsparameter. Dies stimmt mit Studien überein, die entsprechende Korrelationen bei humanem (SCHUTTE, 1987) und bovinem (GALLI et al., 1991) Samen fanden. Im Gegensatz zu Ergebnissen von SCHUTTE et al. (1987) und EGGERT-KRUSE et al. (1993) standen die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen der Samenzellen bei

keinem der sechs eingesetzten Medien in statistischem Zusammenhang mit einer der Auswertmethoden des Penetrationstests. Die Korrelation zwischen allen Parametern des Penetrationstests und dem Anteil lebender Spermien war in allen Medien mit 1,9%igem Polyacrylamid-Gel sowie in PAG 2-III signifikant, in PAG 2-I bestätigte sich dieser Zusammenhang jedoch nicht für die Spermienanzahl an der 3-cm-Markierung, in PAG 2-II konnte kein Zusammenhang zwischen dem Anteil lebender Spermien und der Spermienanzahl an der 2- und der 3-cm-Markierung gefunden werden. EGGERT-KRUSE et al. (1993) fanden im Gegensatz dazu in niedriger konzentrierten Polyacrylamid-Gel-Formulierungen (1,5 bis 1,8 %) sowohl für die Penetrationsdistanzen der vorderen Spermien als auch für die Spermienanzahl bei 1-, 2-, 3-, 4- und 5-cm signifikante Korrelationen zum Anteil lebender Spermien. In der vorliegenden Studie sind PAG 2-I und PAG 2-II im Vergleich unter den Medien die beiden, in denen insgesamt die geringsten Penetrationsdistanzen erreicht werden konnten. Der Unterschied zu den anderen Medien in Bezug auf den Anteil lebender Spermien könnte folglich damit zusammenhängen, dass ein Großteil der Spermien die 2- und 3-cm-Markierung gar nicht erreicht hat. Auch in Bezug auf die kinetischen Parameter der computerassoziierten Spermaanlyse bildeten PAG 2-I und PAG 2-II Ausnahmen im Gesamtbild. Bei allen anderen Medien standen sämtliche Distanz- und Geschwindigkeitsparameter (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL) in hochsignifikantem Zusammenhang ($p < 0,001$; in PAG 1,9-I für den Zusammenhang zwischen der Spermienanzahl bei 3 cm und DCL $p < 0,01$) zu den sechs Variationen der Penetrationstestauswertung.

Im Vergleich zwischen den kinetischen Parametern der computerassoziierten Samenanalyse fanden auch ROBAYO et al. (2008) signifikante Korrelationen zwischen der Migration von ovinen Samenzellen in homologem Zervikalmukus und den Geschwindigkeitsparametern VCL, VAP und VSL. Die Bedeutung der kinetischen Parameter im Rahmen der computer-assoziierten Samenanalyse ist derzeit nicht vollständig geklärt. In der Humanmedizin war die VSL zwischen Patienten niedriger und hoher Fertilität signifikant verschieden (CHECK et al., 1990, HIRANO et al., 2001) und der einzige Parameter, der einen signifikanten Zusammenhang zur Schwangerschaftsrate bei subfertilen Paaren aufwies (GARRETT et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse wurden bei murinem (MOORE und AKHONDI, 1996), porzinem (HOLT et al., 1997) und bovinem Samen erzielt (CSEH et al., 2004, GILLAN et al., 2008, KATHIRAVAN et al., 2008). Bei Untersuchungen

von Katern ergaben sich signifikant höhere Messwerte für VSL und VCL bei normozoospermen Ejakulaten im Vergleich zu teratozoospermen Proben (STACHECKI et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte VSL als derjenige Parameter identifiziert werden, der von allen sechs kinetischen Kenngrößen innerhalb der signifikanten Korrelationen ausnahmslos die höchsten Korrelationskoeffizienten zu den Parametern des Penetrationstests aufwies. Eine solche enge Korrelation zwischen der VSL und dem Penetrationstest ließe entsprechend indirekt auch einen positiven Rückschluss auf die Aussage des Penetrationstests in Bezug auf bovine Fertilität zu. Die Werte der ALH zeigten in der vorliegenden Studie ebenfalls hochsignifikante Korrelationen zu den Ergebnissen des Penetrationstests. Ein Zusammenhang zwischen niedriger ALH und ungenügender Penetrationsfähigkeit (FENEUX et al., 1985) sowie niedrigen Fertilitätsraten (AITKEN et al., 1982, JEULIN et al., 1986, HIRANO et al., 2001) konnte bei Männern nachgewiesen werden. Auch in Bezug auf den Parameter Linearität wurden in der humanmedizinischen Forschung signifikante Korrelationen zur Fertilität gefunden (CHECK et al., 1990, LIU et al., 1991). In dieser Studie wurde eine signifikante, aber nur schwache Korrelation zwischen LIN und den Resultaten des Penetrationstests festgestellt. Die herausgestellten Resultate lassen vermuten, dass die Geschwindigkeit boviner Spermien wichtiger für ein gutes Penetrationsvermögen ist als die Geradlinigkeit ihrer Bewegungen.

5.3.4 Puffer

LORTON et al. (1981) konnten in ihren Studien keinen Unterschied zwischen mit PBS bzw. TRIS versetztem Polyacrylamid-Gel nachweisen. Einige Autoren (GOLDSTEIN et al., 1982, URRY et al., 1986, PARRISH et al., 1987, EGGERT-KRUSE et al., 1993) beziehen sich in ihren Arbeiten auf die Polyacrylamid-Gel-Herstellung nach LORTON et al. (1981), erwähnen jedoch den verwendeten Puffer nicht. TAS et al. (2007b) verglichen bei der Erzeugung eines Hydrogels nach zuvor hergestelltem Polyacrylamidpulver den Einfluss von phosphatgepufferter Salzlösung unter Zusatz von Glucose mit dem von Natriumchloridlösung als Puffer. Signifikante Unterschiede zwischen der Fertilität der getesteten Bullen und den Resultaten des Penetrationstestes erbrachte lediglich das Polyacrylamid-Gel, das unter Verwendung von Natriumchlorid hergestellt wurde. In der vorliegenden Arbeit erwies sich sowohl bei 1,9 %-igem als auch bei 2 %-igem Gel der PBS-Puffer (PAG 1,9-III bzw. PAG 2-

III) insofern als überlegen, als dass jeweils im Vergleich mit den beiden TRIS-Puffer-Konzentrationen hiermit die signifikant höchsten Penetrationsdistanzen erreicht wurden ($p < 0,001$, siehe Abbildungen 17 bis 19). Bezüglich der Auswertung mittels Spermienzahlerfassung an definierten Punkten im Gel zeigte sich der gleiche signifikante Unterschied zwischen den mit PBS versetzten Medien und denen, die mit TRIS-Puffer hergestellt worden waren: in beiden PBS-Medien wurden signifikant mehr Samenzellen gefunden als in den TRIS-Medien ($p < 0,05$, siehe Abbildungen 20 bis 22).

5.3.5 Thermische Behandlung der Samenzellen

Der Penetrationstest wurde mit Samenproben entwickelt, die in der großen Mehrheit die Mindestanforderungen erfüllen, die für die Tierart Rind festgelegt sind. Um zu überprüfen, ob der Penetrationstest schlechtere Ergebnisse liefert, wenn Samenzellen minderer Qualität eingesetzt werden, wurden Proben verwendet, die unterschiedlich thermisch belastet worden sind. Die zunehmende Schädigung der Spermien durch den thermischen Stress spiegelte sich in den signifikanten Korrelationen zwischen der jeweiligen Behandlung und den Ergebnissen der spermatologischen Untersuchung im Hinblick auf Gesamtmotilität, Vorwärtsbeweglichkeit, Anteil an lebenden Samenzellen und die morphologische Untersuchung wider. Bei vier der sechs eingesetzten Medien zeigte sich, dass mit zunehmender Belastung der Samenzellen vor der Testdurchführung die durchschnittliche Penetrationsstrecke des ersten, des ersten lebenden und der ersten 5 lebenden Samenzellen signifikant reduziert wurde. Bei PAG 1,9-II und PAG 2-I traf dies nicht auf die Penetrationsstrecken der ersten 5 lebenden Samenzellen zu, hier wurde kein signifikanter Unterschied gefunden, bezüglich der Penetrationsstrecken des ersten sowie des ersten lebenden Spermiums war der Einfluss jedoch signifikant. Eine vergleichbares Verfahren der thermischen Belastung haben SUTTIYOTIN et al. (1995) angewendet, indem sie Samenproben mehrerer Schafböcke für 0, 1, 2, 3 und 4 Stunden bei 37 °C inkubierten, um sie danach dem Penetrationstest zuzuführen. Die Autoren ermittelten eine signifikante Reduktion der Penetrationsdistanz bei zunehmender Inkubationsdauer und beobachteten einen ähnlichen Trend in Bezug auf die Ergebnisse der gleichen Ejakulate in der spermatologischen Untersuchung. Auch bei thermischer Schädigung in gegensätzlicher Richtung, nämlich nach Abkühlung im Eisbad für 1 Minute

($p < 0,005$), für 2 und 5 Minuten (jeweils $p < 0,001$) deckten sich die Resultate von SUTTIYOTIN et al. (1995) mit denen der vorliegenden Arbeit im Sinne einer Reduktion der Penetrationsfähigkeit. Zu gegenteiligen Resultaten kamen STUMPF et al. (1984), die humane Spermien durch Abkühlung im Eiswasserbad bei 0 °C für 15, 30 und 45 Minuten vor Durchführung des Penetrationstests bei 37 °C stressten und in keinem Fall eine signifikante Reduktion der Penetrationsdistanz feststellen konnten.

Ausgehend von den Resultaten der eigenen Untersuchungen lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass sich der Penetrationstest zur Erkennung von Samenproben minderer Qualität eignet, da die Belastung der Samenzellen zu der erwarteten Veränderung in der Penetrationsfähigkeit führt. Aufgrund der erarbeiteten Signifikanzniveaus bezüglich der Korrelation zwischen Medium und Behandlung eignen sich besonders PAG 1,9-I, PAG 1,9-III und PAG 2-II zur Widerspiegelung qualitativer Unterschiede. Unter Einbeziehung der Ergebnisse bezüglich der Pufferauswahl eignet sich folglich das 1,9%-ige Polyacrylamid-Gel unter Verwendung von Puffer III besonders zur Durchführung des Penetrationstestes.

5.3.6 Ergebnisse des Penetrationstests vor und nach Kryokonservierung

Erstmals wurde in der vorliegenden Studie die Beziehung der Penetrationstest-Ergebnisse bovinen Samens vor dem Einfrieren mit denen nach dem Auftauen verglichen. In der Humanmedizin ermittelten GOLDSTEIN et al. (1982) unter Verwendung 1,8 %-igen Polyacrylamid-Gels einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,6$ für die Migrationsdistanz nativen humanen Samens und seines tiefgefrorenen und wiederaufgetauten Pendant. Das entsprechende Signifikanzniveau wurde von den Autoren nicht angegeben. URRY et al. (1986) führten den Penetrationstest ebenfalls mit 1,8 %-igem Polyacrylamid-Gel und sowohl frischen als auch tiefgefrorenen humanen Spermien durch, statuierten jedoch lediglich eine durch den Einfrier- und Wiederauftauvorgang massiv reduzierte Fähigkeit der Samenzellen, sowohl in Zervikalmucus als auch in Polyacrylamid-Gel zu migrieren, ohne einen Vergleich gleicher Samenproben vor und nach dem Tiefgefrieren zu beschreiben. In der vorliegenden Studie erreichte die Korrelation der Penetration des ersten sowie des ersten lebenden Spermiums vor und nach Kryokonservierung in PAG 1,9-II knapp keine Signifikanz, lediglich in Bezug auf die Distanz der ersten 5 lebenden Samenzellen ergab sich ein signifikanter Zusammenhang vor und nach der

Tiefgefrierung. In allen anderen Medien bestand jeweils eine signifikante Korrelation der Penetrationsdistanz des ersten, des ersten lebenden und der ersten 5 lebenden Spermien im Vergleich vor und nach der Kryokonservierung (siehe auch Tabelle 38). Klar erkennbar war in allen Proben die deutliche Reduzierung der Penetrationsdistanz nach Kryokonservierung, unabhängig davon, ob das erste, das erste lebende oder die ersten 5 lebenden Samenzellen zum Ablesen des Tests herangezogen wurden (Tabelle 37). Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Autoren, die eine deutliche Reduktion des Penetrationsvermögens bei bovinen Spermien nach Kryokonservierung beobachteten (URRY et al., 1986, MATOUSEK et al., 1989). FJÄLLBRANT und ACKERMANN (1969) wiesen bei humanen Samenzellen Schäden durch Einfrieren nach, die die Penetrationsfähigkeit stark reduzierten. Die Dauer der Tiefgefrierlagerung hatte hierbei keinen Einfluss auf die Penetration in Zervikalmukus. GOLDSTEIN et al. (1982) führten signifikante Unterschiede in der Penetrationsdistanz zwischen frischen und tiefgefrorenen humanen Spermien ursächlich auf signifikante Unterschiede in der Motilität von frischem und tiefgefrorenem Samen zurück. Die reduzierte Qualität kryokonservierten Samens kann mehrere Ursachen haben. Schäden, die durch den Einfriervorgang an sich entstehen, sind abhängig vom eingesetzten Verdünner bzw. Kryoprotektivum, von der Abkühlgeschwindigkeit und von der Kälteschockempfindlichkeit der Samenzellen (WATSON, 2000; FORERO-GONZALEZ et al., 2012). Im Vergleichstest dreier Kryoprotektiva bei Tiefgefrierung boviner Samenzellen wurde festgestellt, dass auch bei Verwendung des Kryoprotektivums mit den besten Ergebnissen bezüglich Motilität, Zustand von Plasmamembran und Akrosom und Mitochondrienfunktion noch immer 85 % aller Spermien Membranschäden aufwiesen (FORERO-GONZALEZ et al., 2012). Die Qualität kryokonservierten Samens ist auch heutzutage noch nicht vergleichbar mit kurzzeitkonserviertem oder frischem Samen und bedarf weiterer Optimierung. Infolge der signifikanten Korrelation der Penetrationstestergebnisse vor und nach der Tiefgefrierung eignet sich der Penetrationstest zum einen zur Überprüfung sowohl frischen als auch tiefgefrorenen Samens, zum anderen kann der Test vor Kryokonservierung wertvolle Hinweise auf die Qualität nach dem Auftauen geben.

5.3.7 Empfehlung zur Durchführung des Kapillarpenetrationstestes

Auf Grundlage der erzielten Ergebnisse und unter Einbeziehung der geschilderten Probleme in der Testauswertung erscheint es empfehlenswert, 1,9 %-iges Polyacrylamid-Gel unter Zugabe eines PBS-Puffers zur Durchführung des Penetrationstests einzusetzen. Unabhängig vom eingesetzten Puffer zeigten sich in 1,9%-igem Gel signifikant größere Penetrationsdistanzen als in 2%-igem Gel. Diese Unterschiede verdeutlichten sich unter Verwendung von PBS-Puffer im Vergleich zum eingesetzten TRIS-Puffer. Die höheren Penetrationsdistanzen erleichtern das Ablesen des Testes und verdeutlichen vorhandene qualitative Unterschiede. PAG 1,9-III spiegelte zudem signifikant die Qualitätsminderung durch die verschiedenen thermischen Belastungen wider, und die Ergebnisse vor und nach Kryokonservierung standen in signifikantem Zusammenhang zueinander. Der Einsatz von Hämatokritkapillaren empfiehlt sich aufgrund der weiten Verbreitung und günstigen Anschaffung bei sehr guter Beurteilbarkeit. Zum Ablesen des Penetrationstests sollte das vorderste oder das vorderste lebende Spermium aufgesucht und dessen Distanz zur Mukus-Samen-Kontaktzone bestimmt werden, da dies schneller, praktikabler und weniger anfälliger für Fehler ist als die Auszählung sämtlicher Samenzellen pro Gesichtsfeld in bestimmten Abschnitten. Das Aufsuchen des vordersten motilen Spermiums erscheint nach eigenen Beobachtungen hierbei überlegen, da es durch seine Eigenbewegungen leichter identifiziert werden kann als bereits immotile Spermien, die ein ungeübter Testdurchführender leicht mit etwaigen Unreinheiten oder Unregelmäßigkeiten im Gel verwechseln könnte.

5.3.8 Weiterer Forschungsbedarf

Zukunftsblickend empfiehlt es sich, die Lagerungsfähigkeit des Polyacrylamid-Gels im Hinblick auf einen Einfluss auf die Ergebnisse zu testen. Insbesondere die in dieser Studie nicht überprüfte Möglichkeit, das Gel von vornherein in Kapillaren zu lagern, würde den Kapillarpenetrationstest unmittelbarer verfügbar und somit schneller einsetzbar machen. Auch der Einsatz in der Samenbeurteilung anderer Spezies ist vorstellbar angesichts der Ergebnisse dieser Arbeit.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Spermien-Penetrationstest (SPT) zu etablieren, der technisch einfach durchführbar und kostengünstig ist. Hierzu wurden Ejakulate von 20 Bullen 960 Penetrationstests unterzogen.

Folgende relevante Ergebnisse konnten erzielt werden:

- Agarose-Gel eignet sich im Gegensatz zu Polyacrylamid-Gel nicht für den Einsatz im SPT.
- In 1,9 %-igem Polyacrylamid-Gel wurden signifikant höhere Penetrationsdistanzen erreicht als in 2 %-igem Polyacrylamid-Gel.
- In den Gelkonzentrationen mit PBS-Puffer-Zusatz wurden signifikant höhere Penetrationsdistanzen erreicht als in den Konzentrationen mit TRIS-Puffer-Zusatz ($p < 0,001$).
- Hämatokritkapillaren eignen sich zur Durchführung des SPT.
- Alle getesteten Methoden der Testablesung wiesen hochsignifikante Korrelationen untereinander auf ($p < 0,001$).
- Es bestanden signifikante Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen des SPT und denen der spermatologischen Untersuchung. Insbesondere der nachweislich mit der Fertilitätsrate in Zusammenhang stehende kinetische Motilitätsparameter VSL zeigte hohe Korrelationskoeffizienten bei allen eingesetzten Medien.
- Thermische Schädigung der Spermien stand in signifikantem Zusammenhang mit dem Ergebnis des SPT ($p < 0,05$).
- Die Ergebnisse des SPT vor Kryokonservierung standen in signifikantem Zusammenhang mit den Ergebnissen nach Kryokonservierung ($p < 0,05$).

Zusammenfassend kann der Einsatz von 1,9 %-igem Polyacrylamid-Gel, dem in der Herstellung PBS als Puffer zugesetzt wird, als Medium für den SPT bei bovinen Ejakulaten empfohlen werden. Als Methode der Auswertung empfiehlt sich das

Zusammenfassung

Ablese der Penetrationsdistanz des vordersten noch motilen Spermatozoons. Der in dieser Arbeit entwickelte Penetrationstest stellt eine technisch einfache und kostengünstige Methode dar, die Penetrationsfähigkeit von Samenzellen zu erfassen und lässt bei Anwendung vor Kryokonservierung auf die Qualität der Spermien nach dem Auftauen schließen.

7 Summary

Aim of this study was the establishment of a simple and economic sperm penetration test (SPT). 960 penetration tests were performed in ejaculates of 20 bulls.

The following results could be achieved:

- In contrast to polyacrylamide-gel agarose gel cannot be recommended for the use in the SPT.
- Significantly higher penetration rates resulted from the use of polyacrylamide-gel 1.9% in contrast to polyacrylamide-gel 2%.
- In polyacrylamide-gel preparations using phosphate buffered saline higher penetration rates could be achieved than in preparations using tris(hydroxymethyl)aminomethane as a buffer ($p < 0.001$).
- Microhematocrit tubes can be recommended for use in the SPT
- The six different methods of reading the SPT showed significant correlations among themselves ($p < 0.001$).
- Between outcome of the SPT and results of sperm analysis significant correlations were found. Especially the kinetic parameter "straight line velocity" (VSL) which has been proven to be significantly correlated to fertility rate showed high coefficients of correlation with regard to all of tested gel concentrations.
- Thermal damage was proven to be significantly correlated to outcome of SPT ($p < 0.05$).
- Results of SPT before freezing and post-thawing were significantly correlated ($p < 0.05$).

In summary, in bovine semen analysis 1.9% polyacrylamide-gel prepared with phosphate-buffered saline can be recommended for the use in SPT. We suggest searching for the vanguard motile sperm cell to read the penetration distance. The SPT seems to be a simple and low-cost method to measure the ability of bovine

Summary

spermatozoa to penetrate artificial medium. Results before freezing semen reflect the post-thaw outcome.

8 Literaturverzeichnis

AITKEN, R., BEST, F. S., RICHARDSON, D. W., DJAHANBAKHCH, O., MORTIMER, D., TEMPLETON, A. A., LEES, M. M. (1982)

An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity.

Fertil Steril 38, S. 212-221.

AITKEN, R. J., BOWIE, H., BUCKINGHAM, D., HARKISS, D., RICHARDSON, D. W. & WEST, K. M. (1992)

Sperm penetration into a hyaluronic acid polymer as a means of monitoring functional competence

J Androl 13, S. 44-54

ALEXANDER, N. J. (1981)

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

Fertil Steril 36, S. 201-208

ANILKUMAR, R., DEVANATHAN, T. G., PATTABIRAMAN, S. R. & EDWIN, M. J. (2001)

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

Theriogenology 55, S. 685-691

BALS-PRATSCH, M., KNUTH, U. A. & NIESCHLAG, E. (1988)

Does sperm penetration in bovine mucus provide additional information to the "classical" spermogram and motility characteristics?

Zentralbl Gynäkol 110, S. 224-231

BAMBA, K. & CRAN, D. G. (1988)

Effect of rapid warming of bull and rabbit semen

J Reprod Fertil 82, S. 501-507

BARRATT, C. L., OSBORN, J. C., HARRISON, P. E., MONKS, N., DUNPHY, B. C.,
LENTON, E. A. & COOKE, I. D. (1989)

The hypo-osmotic swelling test and the sperm mucus penetration test in determining fertilization of the human oocyte

Hum Reprod 4, S. 430-434

BERGMAN, A., AMIT, A., DAVID, M. P., HOMONNAI, Z. T. & PAZ, G. F. (1981)

Penetration of human ejaculated spermatozoa into human and bovine cervical mucus. I. Correlation between penetration values

Fertil Steril 36, S. 363-367

BLANDAU, R. J., GADDUM-ROSSE, P. & LEE, W. I. (1978)

Letter to the editor

Fertil Steril 29, S. 707

CHECK, J.H., BOLLENDORF, A., LEE, M.A., NAZARI, A., NOWROOZI, K. (1990)

Correlation of computerized semen analysis with successful fertilization of oocytes in an in vitro fertilization program.

Arch Androl 24, S. 229-234.

CONTRI, A., VALORZ, C., FAUSTINI, M., WEGHER, L. & CARLUCCIO, A. (2010)

Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa

Theriogenology 74, S. 424-435

CORREA, J. R., PACE, M. M. & ZAVOS, P. M. (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

COX, J. F., ZAVALA, A., SARAIVIA, F., RIVAS, C., GALLARDO, P. & ALFARO, V. (2002)

Differences in sperm migration through cervical mucus in vitro relates to sperm colonization of the oviduct and fertilizing ability in goats

Theriogenology 58, S. 9-18

CSEH, S., POLICHRONOPOULOS, T. & SOLTI, L. (2004)

12 PREDICTION OF BULL FERTILITY BY COMPUTER ASSISTED SEMEN ANALYSIS

Reprod Fertil Dev 16, S. 128-129

DANEZIS, J., SUJAN, S. & SOBRERO, A. J. (1962)

Evaluation of the postcoital test

Fertil Steril 13, S. 559-574

DAVID, M. P., AMIT, A., BERGMAN, A., YEDWAB, G., PAZ, G. F. & HOMONNAI, Z. T. (1979)

Sperm penetration in vitro: correlations between parameters of sperm quality and the penetration capacity

Fertil Steril 32, S. 676-680

DE GEYTER, C., BALS-PRATSCH, M., DOEREN, M., YEUNG, C. H., GRUNERT, J. H., BORDT, J., SCHNEIDER, H. P. & NIESCHLAG, E. (1988)

Human and bovine cervical mucus penetration as a test of sperm function for in-vitro fertilization

Hum Reprod 3, S. 948-954

EGGERT-KRUSE, W., SCHWALBACH, B., ROHR, G., KLINGA, K., TILGEN, W. & RUNNEBAUM, B. (1993)

Evaluation of polyacrylamide gel as substitute for human cervical mucus in the sperm penetration test

Fertil Steril 60, S. 540-549

FARRELL, P. B., PRESICCE, G. A., BROCKETT, C. C. & FOOTE, R. H. (1998)

Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility

Theriogenology 49, S. 871-879

FENEUX, D., SERRES, C. & JOUANNET, P. (1985)

Sliding spermatozoa: a dyskinesia responsible for human infertility?

Fertil Steril 44, S. 508-511

FJÄLLBRANT, B. & ACKERMAN, D. R. (1969)

Cervical mucus penetration in vitro by fresh and frozen-preserved human semen specimens

J Reprod Fertil 20, S. 515-517

FORERO-GONZALEZ, R. A., CELEGHINI, E. C., RAPHAEL, C. F., ANDRADE, A. F., BRESSAN, F. F. & ARRUDA, R. P. (2012)

Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes

Andrologia 44 Suppl 1, S. 154-159

FREUNDL, G., GRIMM, H. J. & HOFMANN, N. (1988)

Selective filtration of abnormal spermatozoa by the cervical mucus

Hum Reprod 3, S. 277-280

GADDUM-ROSSE, P., BLANDAU, R. J. & LEE, W. I. (1980a)

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

Fertil Steril 33, S. 636-643

GADDUM-ROSSE, P., BLANDAU, R. J. & LEE, W. I. (1980b)

Sperm penetration into cervical mucus in vitro. II. Human spermatozoa in bovine mucus

Fertil Steril 33, S. 644-648

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

GARRETT, C., LIU, D. Y., CLARKE, G. N., RUSHFORD, D. D. & BAKER, H. W. (2003)

Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples

Hum Reprod 18, S. 1643-1649

GILLAN, L., KROETSCH, T., MAXWELL, W. M. & EVANS, G. (2008)

Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls

Anim Reprod Sci 103, S. 201-214

GOLDSTEIN, M. C., WIX, L. S., FOOTE, R. H., FELDSCHUH, R. & FELDSCHUH, J. (1982)

Migration of fresh and cryopreserved human spermatozoa in polyacrylamide gel

Fertil Steril 37, S. 668-674

HAYES, M. F., SEGAL, S., MOGHISSI, K. S., MAGYAR, D. M. & AGRONOW, S. (1984)

Comparison of the in vitro sperm penetration test using human cervical mucus and bovine estrus cervical mucus with the postcoital test

Int J Fertil 29, S. 133-135

HIRANO, Y., SHIBAHARA, H., OBARA, H., SUZUKI, T., TAKAMIZAWA, S., YAMAGUCHI, C., TSUNODA, H., SATO, I. (2001)

Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro.

J Assist Reprod Genet 18, S. 213-218.

HOLT, C., HOLT, W. V., MOORE, H. D., REED, H. C., CURNOCK, R. M. (1997)

Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials.

J Androl 18, S. 312-323.

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

Sperm factors related to failure of human in-vitro fertilization

J Reprod Fertil 76, S. 735-744.

JEULIN, C., SOUMAH, A. & JOUANNET, P. (1985)

Morphological factors influencing the penetration of human sperm into cervical mucus in vitro

Int J Androl 8, S. 215-223

JONSSON, B., ENEROTH, P., LANDGREN, B. M. & WIKBORN, C. (1986)

Evaluation of in vitro sperm penetration testing of 176 infertile couples with the use of ejaculates and cervical mucus from donors

Fertil Steril 45, S. 353-356

KATHIRAVAN, P., KALATHARAN, J., JOHN EDWIN, M. & VEERAPANDIAN, C.
(2008)

Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its
relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes

Anim Reprod Sci 104, S. 9-17

KATZ, D. F., OVERSTREET, J. W. & HANSON, F. W. (1980)

A new quantitative test for sperm penetration into cervical mucus

Fertil Steril 33, S. 179-186

KEEL, B. A., KELLY, W., WEBSTER, B. W., ZUMBACH, K. L. & ROBERTS, D. K.
(1987)

Application of a bovine cervical mucus penetration test

Arch Androl 19, S. 33-41

KREMER, J. (1965)

A simple sperm penetration test

Int J Fertil 10, S. 209-215

KUMMERFELD, H. L., LORTON, S. P. & FOOTE, R. H. (1981a)

Relationship of spermatozoal migration in cervical mucus to bovine fertility

J Androl 2, S. 103-107

KUMMERFELD, H. L., VOSBURGH, J. K., LORTON, S. P. & FOOTE, R. H. (1981b)

Influence of bovine cervical mucus samples and storage conditions on sperm
migration in vitro

Fertil Steril 35, S. 218-221

KURZROK, R. & MILLER, E. G. (1928)

Biochemical studies of human semen and its relation to mucus of the cervix uteri
Am J Obstet Gynecol 15, S. 56

LEE, W. I., GADDUM-ROSSE, P. & BLANDAU, R. J. (1981)

Sperm penetration into cervical mucus in vitro. III. Effect of freezing on estrous bovine cervical mucus
Fertil Steril 36, S. 209-213

LEE, W. I., VERDUGO, P., BLANDAU, R. J. & GADDUM-ROSSE, P. (1977)

Molecular arrangement of cervical mucus: a reevaluation based on laser light-scattering spectroscopy
Gynecol Invest 8, S. 154-166

LIU, D. Y., CLARKE, G. N., BAKER, H. W. (1991)

Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro
J Androl 12; S. 231-239.

LORTON, S. P., KUMMERFELD, H. L. & FOOTE, R. H. (1981)

Polyacrylamide as a substitute for cervical mucus in sperm migration tests
Fertil Steril 35, S. 222-225

MARTINEZ-RODRIGUEZ, C., ALVAREZ, M., ORDAS, L., CHAMORRO, C. A.,
MARTINEZ-PASTOR, F., ANEL, L., DE PAZ, P. (2012)

Evaluation of ram semen quality using polyacrylamide gel instead of cervical mucus in the sperm penetration test.
Theriogenology77, S.1575-86

MATOUSEK, J., RÍHA, J., SRSEN, V., VESELSKÝ, L. & LOUDA, F. (1989)
Penetration of cervical mucus and other body fluids by bull sperm in capillary tubes
Anim Reprod Sci 18, S. 161-166

MILLS, R. N. & KATZ, D. F. (1978)
A flat capillary tube system for assessment of sperm movement in cervical mucus
Fertil Steril 29, S. 43-47

MOGHISSI, K. S. (1972)
Current perspectives: the function of the cervix in infertility
Fertil Steril 23, S. 295

MOGHISSI, K. S., SEGAL, S., MEINHOLD, D. & AGRONOW, S. J. (1982)
In vitro sperm cervical mucus penetration: studies in human and bovine cervical
mucus
Fertil Steril 37, S. 823-827

MOLE, J. R. & FITZGERALD, J. A. (1990)
Comparison of ram sperm interaction with bovine cervical mucus
Theriogenology 33, S. 1031-1043

MOORE, H. D., AKHONDI, M. A. (1996)
Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line
velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: epididymal rat
spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than
those from the distal cauda or vas deferens.
J Androl 17, S. 50-60.

MORTIMER, D., MORTIMER, S. T., SHU, M. A. & 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, I. J. & SAWERS, R. S. (1986)

Human sperm morphology and the outcome of modified Kremer tests

Andrologia 18, S. 376-379

MURASE, T. & BRAUN, J. W. (1990)

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

Theriogenology 34, S. 73-80

MURASE, T., MUKOUJIMA, K., SAKAGUCHI, S.-I., TSUBOTA, T. & KITA, I. (1999)

A simplified technique to determine the ability of spermatozoa to penetrate the estrous cervical mucus in Japanese beef cattle

J Reprod Dev 45, S. 425-428

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

NEUWINGER, J., COOPER, T. G., KNUTH, U. A. & NIESCHLAG, E. (1991)

Hyaluronic acid as a medium for human sperm migration tests

Hum Reprod 6, S. 396-400

NIEDERBERGER, C. S., LAMB, D. J., GLINZ, M., LIPSHULTZ, L. I. & SCULLY, N. F. (1993)

Tests of sperm function for evaluation of the male: Penetrak and Tru-Trax

Fertil Steril 60, S. 319-323

ODEBLAD, E. (1968)

The functional structure of human cervical mucus

Acta Obstet Gynecol Scand 47, S. 57-79

ODEBLAD, E. (1977)

Physical properties of cervical mucus

Adv Exp Med Biol 89, S. 217-225

OLA, B., AFNAN, M., PAPAIOANNOU, S., SHARIF, K., BJORNDAHL, L. & COOMARASAMY, A. (2003)

Accuracy of sperm-cervical mucus penetration tests in evaluating sperm motility in semen: a systematic quantitative review

Hum Reprod 18, S. 1037-1046

PARRISH, J. J. & FOOTE, R. H. (1987)

Quantification of bovine sperm separation by a swim-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility

J Androl 8, S. 259-266

REICHMAN, J., INSLER, V. & SERR, D. M. (1973)

A modified in vitro spermatozoal penetration test. II. Application in fertility investigations

Int J Fertil 18, S. 241-245

ROBAYO, I., MONTENEGRO, V., VALDES, C. & COX, J. F. (2008)

CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus

Reprod Domest Anim 43, S. 393-399

SCHUTTE, B. (1987)

Penetration ability of human spermatozoa into standardized bovine cervical mucus (Penetrak) in patients with normal and pathological semen samples

Andrologia 19 Spec No, S. 217-224

SIMS, J. M. (1867)

Section VII. For conception, semen with living spermatozoa should be deposited in the vagina at the proper time

In: Sims, J.M. Clinical Notes on uterine surgery. William Wood & Co, New York. S. 351-353

STACHECKI, J. J., GINSBURG, K. A., LEACH, R. E., ARMANT, D. R. (1993)

Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat.

J Androl 14, S. 60-65.

STUMPF, P. G., GARRY, F. & LLOYD, T. (1984)

Effects of temperature on in vitro penetration of human sperm into bovine cervical mucus

J Reprod Med 29, S. 833-836

SUTTIYOTIN, P., SANCHEZ-PARTIDA, L. G., THWAITES, C. J. & SETCHELL, B. P. (1991)

Correlation of objective measurements of sperm motility by a swim-up technique and a modified sperm penetration test with results obtained with a Hamilton-Thorne Motility Analyser

Proc Aust Soc Reprod Biol 23, S. 36 abstr

SUTTIYOTIN, P., THWAITES, C. J. & BAILLIE, N. D. (1992)

Relationships between the results of a modified sperm penetration test and a swim-up technique and the fertility of ram semen

Theriogenology 37, S. 851-857

SUTTIYOTIN, P., THWAITES, C. J., SANCHEZ-PARTIDA, L. G. & SETCHELL, B. P. (1995)

Evaluation of a modified sperm penetration test in ram semen

Theriogenology 44, S. 29-40

TAS, M., BACINOGLU, S., CIRIT, Ü., OZDAS, O. B. & AK, K. (2007a)

Relationship between bovine fertility and the number of spermatozoa penetrating the cervical mucus within straws

Anim Reprod Sci 101, S. 18-27

TAS, M., BACINOGLU, S., CIRIT, Ü., ÖZGÜMÜS, S., KASGÖZ, H. & PABUCCUOGLU, S. (2007b)

Estimation of the potential fertility based upon non-return rates of bulls: Using polyacrylamide gel instead of cervical mucus in the sperm penetration test

Theriogenology 68, S. 981-987

TÖPFER-PETERSEN, E. & WABERSKI, D. (2001)

Spermienreifung und Befruchtung.

In: Busch, W., Holzmann, A. Veterinärmedizinische Andrologie. Schattauer Verlag, Stuttgart. S. 67-82

URRY, R. L., MIDDLETON, R. G. & MAYO, D. (1986)

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

Fertil Steril 45, S. 135-137

VERBERCKMOES, S., VAN SOOM, A., DE PAUW, I., DEWULF, J. & DE KRUIF, A. (2002)

Migration of bovine spermatozoa in a synthetic medium and its relation to in vivo bull fertility

Theriogenology 58, S. 1027-1037

VON STERN, K. (2001)

Prognose der Tiefgefriereignung von Hengstsperma mit Hilfe von Funktionstests

Dissertation

Tierklinik für Fortpflanzung Freie Universität Berlin

WATSON, P. F. (2000)

The causes of reduced fertility with cryopreserved semen

Anim Reprod Sci 60–61, S. 481-492

WHO (2010)

Optional Procedures - Capillary Tube Test.

In: WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen.

Fifth Edition

Geneva, WHO Press. S. 127-130

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.

Gießen, 17.02.2014

Anja Becher

Danksagung

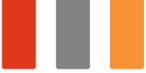
Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Axel Wehrend für die Überlassung des Themas und die geduldige Betreuung dieser Arbeit, auch über größere geographische Distanzen hinweg.

Für die Hilfestellung bei allen labortechnischen Fragen und bei der Herstellung des Gels sei besonders den guten Laborseelen Franzl Sechser und Julia Blad-Stahl gedankt!

Herrn Dr. Failing und seinen KollegInnen vom Institut für Biomathematik der JLU Gießen danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Dem Förderverein Biotechnologieforschung e.V., Bonn danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Nicht zuletzt danke ich von Herzen den Menschen, die auf den unterschiedlichsten Stationen meines Weges doch immer an mich geglaubt und mich moralisch und ab und zu auch tatkräftig unterstützt haben – sei es in statistischen Fragen, mit Korrekturlesen oder mit unverzichtbaren Motivationsversuchen: Jutta und Alfred, Susu, Cerstin und Uti, Nini, Maria und Basti, Marijke und allen ehemaligen und derzeitigen KollegInnen der Kliniken für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie in Gießen und Wien.



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: 978-3-8359-6137-1



9 783835 196137 1