

Journal für

# Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

– Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology –

Andrologie • Embryologie & Biologie • Endokrinologie • Ethik & Recht • Genetik  
Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Reproduktionsmedizin • Urologie



## Moderne Verfahren in der spermatologischen Diagnostik

Petrunkina AM, Töpfer-Petersen E, Waberski D

*J. Reproduktionsmed. Endokrinol* 2008; 5 (5), 262-271

[www.kup.at/repromedizin](http://www.kup.at/repromedizin)

Online-Datenbank mit Autoren- und Stichwortsuche

Offizielles Organ: AGRBM, BRZ, DVR, DGA, DGGEF, DGRM, DIR, EFA, OEGRM, SRBM/DGE

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica/Scopus

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

# Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere Rubrik

## [Medizintechnik-Produkte](#)



Neues CRTD Implantat  
Intica 7 HF-T QP von Biotronik



Artis pheno  
Siemens Healthcare Diagnostics GmbH



Philips Azurion:  
Innovative Bildgebungslösung

Aspirator 3  
Labotect GmbH



InControl 1050  
Labotect GmbH

## e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

## [Bestellung e-Journal-Abo](#)

### Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)

# Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

Andrologie • Embryologie und Biologie • Endokrinologie • Ethik und Recht •  
Genetik • Gynäkologie • Kontrazeption • Psychosomatik • Urologie

## Moderne Verfahren in der spermatologischen Diagnostik

Petrunkina AM, Töpfer-Petersen E  
Waberski D

*J. Reproduktionsmed. Endokrinol*

2008; 5 (5), 262-271

### Offizielles Organ

- des Dachverbands Reproduktionsbiologie und -medizin (DVR),
- der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin (DGRM),
- der Österreichischen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie (OEGRM),
- der Deutschen Gesellschaft für Andrologie (DGA),
- des Bundesverbandes Reproduktionsmedizinischer Zentren Deutschlands (BRZ),
- der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin (DGGEF),
- der Arbeitsgemeinschaft Reproduktionsbiologie des Menschen (AGRBM),
- der Sektion Reproduktionsbiologie und -medizin der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (SRBM/DGE)

Homepage:

[www.kup.at/  
reproduktionsmedizin](http://www.kup.at/reproduktionsmedizin)

Online-Datenbank mit  
Autoren- und Stichwortsuche

Krause & Pachernegg GmbH  
Verlag für Medizin und Wirtschaft, A-3003 Gablitz

[www.kup.at/reproduktionsmedizin](http://www.kup.at/reproduktionsmedizin)

Indexed in EMBASE/Excerpta Medica

# Moderne Verfahren in der spermatologischen Diagnostik

A. M. Petrunkina<sup>1</sup>, E. Töpfer-Petersen<sup>2</sup>, D. Waberski<sup>3</sup>

Standardspermatologische Parameter sind unzureichend zur Einschätzung der männlichen Fertilität. Computergestützte und zytometrische Verfahren gewinnen in der spermatologischen Diagnostik zunehmend an Bedeutung. Sie basieren auf Erkenntnissen aus der Spermienphysiologie über fertilitätsrelevante Eigenschaften auf dem Weg zur Befruchtung. Unter befruchtungsfördernden In-vivo-Bedingungen kommt einer Reihe funktioneller Spermiencharakteristika entscheidende Bedeutung zu: der Motilität, insbesondere Hyperaktivierung, der Bindungs- und Interaktionsfähigkeit der Spermatozoen mit dem weiblichen Genitaltrakt, ihrer Überlebens- und Kapazitationsfähigkeit sowie der Erkennung und Penetration der Eizelle. Eine wesentliche Bedeutung wird dabei der funktionellen Heterogenität der Spermien eines Ejakulates zugesprochen. Sie erlaubt die Adaptationsfähigkeit an individuelle Befruchtungssituationen und die Selektion der potenziell befruchtungsfähigen Population im weiblichen Genitaltrakt. Einzelzell-orientierte Verfahren, wie die computergestützte Motilitätsanalyse, die Durchflusszytometrie und die Fluoreszenzbildgebung ermöglichen in Zusammenhang mit multiparametrischen Analysen die Identifizierung diverser Spermien-subpopulationen mit unterschiedlichen für die Befruchtung relevanten funktionellen Eigenschaften. Die Charakterisierung der Heterogenität und Dynamik von Spermienpopulationen folgt den Merkmalen einer auf Einzelzellphänotypanalyse basierenden molekularen Zellsystemforschung (Zytomik). In diesem Review werden moderne, an dem Verständnis der Befruchtungskaskade orientierte spermatologische Verfahren, die die funktionellen Eigenschaften in den repräsentativen Populationen durch Einzelzell-basierte Methoden charakterisieren (Durchflusszytometrie, computergestützte Spermienanalyse, Fluoreszenz Imaging, volumetrische Analyse, Spermien-Eileiter-Bindungsassays, Kapazitationstests und Zonabindungs- bzw. -penetrationstests) speziesübergreifend für die andrologische Diagnostik und zur Bearbeitung experimenteller Fragestellungen dargestellt.

**Schlüsselwörter:** Spermatologie, männliche Fruchtbarkeit, Kapazitation, Akrosomreaktion, computergestützte Spermienanalyse, Durchflusszytometrie, Volumenregulation

**Modern Methods in Spermatology.** Routine spermatological parameters are insufficient to assess male fertility. Computer-assisted and cytometric methods are of growing importance in advanced semen assessment. Modern diagnostics are based on increasing knowledge on sperm physiology and relevant functional sperm properties on the route of fertilization. There is a combination of sperm functional parameters which is crucial for fertilization under fertilizing conditions in vivo: motility, especially hyperactivation, the ability to bind to and to interact with the female genital tract and the ability to survive, to capacitate and to penetrate the oocyte. The functional heterogeneity of sperm in a given ejaculate is of utmost importance. This heterogeneity represents a strategy for the adaptation to individual conditions of fertilization and the selection of the potentially fertilizing sperm population in the female tract. Single cell orientated methods, such as computer-assisted motility analysis, flow cytometry and fluorescence imaging enable in combination with the multiparametric analysis the identification of sperm subpopulations with different functional properties, relevant for fertilization. The characterization of sperm populations heterogeneity and dynamics instrumentalises tools of a molecular cell system research (cytomics) based on single cell phenotype analyse. The present review describes modern spermatological methods based on our current knowledge of fertilization and characterizing the functional properties of representative cell populations by means of single cell oriented technologies for their use in both andrological examination and research across species: flow cytometry, computer-assisted sperm analysis, fluorescence imaging, volumetric analysis, sperm-oviduct binding assays, capacitation tests and zona binding or penetration tests. **J Reproduktionsmed Endokrinol 2008; 5 (5): 262–71.**

**Key words:** capacitation, acrosome reaction, spermatology, male fertility, computer-assisted sperm analysis, flow cytometry, volume regulation

Die routinemäßig erfassten quantitativen und qualitativen spermatologischen Parameter (Ejakulatvolumen, Spermienkonzentration, Motilität und Morphologie) erlauben nur eine bedingte Aussage über die Befruchtungskompetenz eines Ejakulates. Die Anwendung spezieller, fortgeschrittener diagnostischer Verfahren ist für die Fertilitätsdiagnostik insbesondere dann wichtig, wenn bei nachweislich subfertilen Tieren Normospermie nach standardspermatologischen Kriterien vorliegt.

Nach der Ejakulation durchlaufen Säugetierspermatozoen auf dem Weg durch das weibliche Genitale eine Sequenz funktioneller Prozesse zur

Erlangung der Befruchtungsfähigkeit. Diese Vorgänge werden in ihrer Gesamtheit als „Kapazitation“ bezeichnet [1, 2]. Auf dem Weg zum Ort der Befruchtung kommt es zur drastischen Verminderung der Spermienzahl; während bei der Ejakulation einige Milliarden Spermatozoen in den weiblichen Genitaltrakt deponiert werden, passieren nur einige Tausend die uterotubale Verbindung und etablieren sich in dem bei Haussäugetieren als Spermienreservoir fungierenden unteren Eileitersthmus. Am Ende dieser Sequenz sind es nur wenige Spermatozoen, die mit der Eizelle interagieren, und nur ein einziges Spermatozoon vollendet den Befruchtungsvorgang [3]. Dieser Spermien-

gradient ist durch verschiedene anatomische Barrieren und funktionelle Selektionsmechanismen zu erklären. Dabei kommt einer Reihe von Spermieigenschaften entscheidende Bedeutung zu, u. a. der **Spermienmotilität, der Bindungs- und Interaktionsfähigkeit von Spermatozoen mit dem weiblichen Genitaltrakt, ihrer Überlebens- und Kapazitationsfähigkeit sowie der Erkennung und Penetration der Eizelle.** Die funktionelle Heterogenität der Spermatozoen eines Ejakulates erlaubt die Selektion der potenziell befruchtungsfähigen Population im weiblichen Genitaltrakt. Die Selektionskriterien können z. B. in Abhängigkeit des weiblichen hormonellen Status oder des Inter-

Eingegangen: 25.02.2008; akzeptiert nach Revision: 04.07.2008

Aus der <sup>1</sup>Reproduktionsmedizinischen Einheit der Kliniken/Klinik für Pferde und dem <sup>1</sup>Cambridge Institute for Medical Research, Cambridge, GB, dem <sup>2</sup>Institut für Reproduktionsbiologie und der <sup>3</sup>Reproduktionsmedizinischen Einheit der Kliniken/Klinik für kleine Klauentiere, Tierärztliche Hochschule Hannover.

**Korrespondenzadresse:** PD Dr. Anna Petrunkina, Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Welcome Trust/MRC Building, Hills Road, Addenbrooke's Hospital, CB20XY, Cambridge, GB; E-Mail: anna.petrunkina@gmx.de

valls zwischen Insemination und Ovulation variieren und damit Spermien aus unterschiedlichen Subpopulationen bevorzugen. Die moderne spermatoologische Diagnostik morphologischer und funktioneller Parameter sollte daher die Untersuchung der Spermienheterogenität beinhalten. Im Folgenden werden Beispiele einer modernen, an dem Verständnis der Befruchtungskaskade orientierten, spermatoologischen Diagnostik gegeben.

### Einzelzellbasierte Verfahren und zytomische Konzepte

Eine entscheidende Rolle in der modernen Zellbiologie und klinischen Medizin wird der molekularen Zellsystemforschung (Zytomik) zugeschrieben, die eine dreistufige Einzelzellphänotypanalyse ermöglicht: die Zellverhaltensanalyse innerhalb des Zellzyklus, die molekulare Analyse einzelner Zellen im System (Zytom) und ggf. die gewebeassoziierte Analyse [4, 5]. In diesem Kapitel werden spezielle spermatoologische Verfahren dargestellt, die die funktionellen Regulationsprozesse und einige molekulare Abläufe in spezifischen Populationen (z. B. Populationen osmotisch aktiver und membranintakter Zellen) auf Einzelzellbasis charakterisieren. Eine der wichtigen Eigenschaften vieler moderner einzelzellbasierter Verfahren ist darin begründet, dass die Charakteristiken einzelner Zellen im Gesamtkontext der repräsentativen Zellpopulationen oder – auf einer höheren Ebene – im Kontext der Zellsysteme (Zytome) erfasst werden, wie z. B. in der Durchflusszytometrie, der elektronischen Volumenanalyse oder in anderen computergestützten Verfahren bzw. Bildgebungsmethoden. Da von einer Vergleichbarkeit der repräsentativen Zellpopulationen auszugehen ist, können diese Methoden in bestimmtem Maß in der Diagnostik eingesetzt werden. Bei der Untersuchung von Zellen im Kontext komplexer heterogener biologischer Zellsysteme (Zytome: wie z. B. Blut, Knochenmark, Hodengewebebiopsien, Gesamtejakulat o. a.) postuliert die Zytomik, dass nicht nur eine Information über den gegenwärtigen Zustand der Organismen, sondern auch eine prädiktive Aussage über die weitere Entwicklung erhältlich ist [4, 5]. In der humanen und veterinärmedizinischen Andrologie befindet sich allerdings die Entwick-

lung der molekularen Zellsystemforschung noch in der Anfangsphase.

Spermatozoen eines Ejakulates stellen ein dynamisches System mit überaus heterogenen funktionellen Eigenschaften dar [6]. So enthält ein Ejakulat verschiedene Spermienpopulationen mit unterschiedlicher Befruchtungsfähigkeit. Die Heterogenität eines Ejakulates, insbesondere die Anpassungsfähigkeit der Zellen an ihre Umgebung, ist ein bestimmender Faktor für seine funktionelle Leistung. Die Untersuchung von Parametern des Gesamtejakulates (klassische Parameter, Enzymaktivität, Ionen-, Lipid- und Proteingehalt im Seminalplasma u. Ä.) berücksichtigt diese Heterogenität nicht. Bei am Gesamtejakulat durchgeführten Untersuchungen kann nicht unterschieden werden, ob sich die gemessenen Veränderungen auf die Prozesse in allen Zellen oder in spezifischen Subpopulationen beziehen. Vor allem die Fähigkeit der Spermatozoen zur Interaktion mit den Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und mit dem weiblichen Genitale ist erwartungsgemäß für die diversen Spermatozoenpopulationen je nach ihrem funktionellen Status unterschiedlich. Deshalb erscheint die Analyse spezifischer Populationen sinnvoll. Einzelzellorientierte Verfahren, wie die Durchflusszytometrie, computergestützte Spermienanalyse (CASA) und Fluoreszenzimagining, ermöglichen diese Analyse unter Vermeidung von Interpretationsversuchen anhand von Durchschnittswerten.

### Computergestützte Spermienanalyse (CASA)

Die computergestützte Motilitätsmessung ist ein wichtiges Instrument der modernen andrologischen Labordiagnostik. Neben der Ermittlung des prozentualen Anteils an progressiv beweglichen, orts- und unbeweglichen Zellen kann eine weitere Klassifizierung in lineare, kreisbewegliche und hyperaktivierte Zellen vorgenommen werden. Darüber hinaus werden die Einzelbahngeschwindigkeiten der linearen, mittleren und kurvilinearen Bewegung erfasst und Spermatozoen nach diesen Kriterien klassifiziert. Mehrere kinetische Parameter können gleichzeitig in multiparametrischen Analysen berücksichtigt werden; auf diese Weise lassen sich Subpopulationen von Sper-

mien mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften darstellen. Über 30 verschiedene kinetische Parameter stehen zu Verfügung. Darüber hinaus sind die Spermienkonzentration und ansatzweise auch die Spermienmorphologie unter standardisierten und objektiven Bedingungen erfassbar. Das Potenzial dieser Technologie zeigt sich besonders im experimentellen Bereich: Unter definierten Bedingungen lassen sich kinetische Reaktionen der Spermien auf unterschiedliche Behandlungsverfahren z. B. bei Konservierungstests oder nach motilitätsstimulierenden Einflüssen messen [7, 8]. Die computergestützte Motilitätsanalyse ermöglicht eine bessere Vorhersage der Fertilität im Vergleich zur herkömmlichen subjektiven Schätzung. In einer Feldstudie wurde beim Schwein nachgewiesen, dass sich die Variation in den Wurfgrößen bis zu 24 % durch die Variation in den Motilitätsparametern erklären lässt [9].

### Durchflusszytometrie

Bei diesem Untersuchungsverfahren werden die Spermatozoen, ähnlich wie für fluoressenzmikroskopische Verfahren, mit spezifischen Fluorochromen markiert. Nach einer hydrodynamischen Fokussierung der Probe und Anregung durch Laserlicht wird die von den Zellen ausgehende Fluoreszenz detektiert. Die Flussrate (Anzahl der gemessenen Partikel pro Sekunde) ist bei modernen Geräten variabel, sodass innerhalb weniger Sekunden Daten von mehr als 10.000 Zellen erfasst und analysiert werden können. Je nach der optischen Konfiguration des Gerätes und Lichtquelleneigenschaften (Anzahl und Spezifikationen der Laser) können in modernen Durchflusszytometern Streulichtparameter und Fluoreszenz von bis zu 18 Komponenten, die das Licht verschiedener Wellenlängen  $\lambda$  emittieren, erfasst werden. Diese Spannbreite ermöglicht eine gleichzeitige multiparametrische Analyse verschiedener Zelleigenschaften. Streulichtparameter charakterisieren die Größe und Komplexität der Zellen, während Fluoreszenzsignale weitere Auskunft über den funktionellen Zustand jeder einzelnen Zelle geben. Der Vorteil dieser Technik liegt darin begründet, dass jede Zelle einzeln charakterisiert wird; anstatt von Durchschnittswerten werden diese Einzeldaten ge-

speichert und weiter für eine Zellpopulation verarbeitet.

Die durchflusszytometrische Methodik gehört zu den effizientesten semi-quantitativen Verfahren und zeichnet sich durch ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit, Standardisierbarkeit und Objektivität aus. Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen stehen in der Routinediagnostik mittlerweile mehrere etablierte Verfahren zur Verfügung, die, in Abhängigkeit von den ausgewählten Fluoreszenzmarkern und ihren Lokalisierungsstellen, Aussagen über die Integrität und andere physiologische, biochemische und funktionelle Eigenschaften jedes einzelnen Spermatozoons erlauben.

Zu den weitestgehend akzeptierten Verfahren in der modernen spermatoologischen Diagnostik gehören der Spermienchromatinstruktur-Assay (SCSA), die Erhebung des Membranintegritätsstatus und des akrosomalen Zustandes zur primären Beurteilung der Spermienqualität und eine Fülle funktioneller Kapazitationstests wie der Merocyaninbindungstest, Kalziuminflux, Tyrosinphosphorylierung und die Auslösung der Akrosomreaktion. Diese Assays betreffen die funktionelle Kompetenz eines Spermatozoons in Bezug auf die unterschiedlichen Stadien des Befruchtungprozesses.

#### Spermienchromatinstruktur-Assay (SCSA)

Während der letzten Schritte der Spermatogenese kommt es zur Kondensation des Nukleus und zur Bildung der charakteristischen Form des Spermienkopfes. Während der Spermio-genese findet dann der Austausch der DNA-Histone gegen Protamine statt. Die Fähigkeit der reifen Zellen, ihre DNA zu reparieren und Apoptosis einzuleiten, ist stark reduziert [10]. Deshalb können DNA-Defekte, die vor der Bildung der stabilen Chromatinbündelung stattgefunden haben, auf die Oozyte übertragen werden. Ein stabiles Chromatin ist daher eine entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Befruchtung und ungestörte frühembryonale Entwicklung.

Die Untersuchung der Chromatinstruktur mittels SCSA [11] stellt ein wichtiges Diagnostikum zur Beurteilung der Fertilität dar. Bei diesem Verfahren wird die Stabilität der Sper-

mien-DNA nach saurer Denaturierung in situ mittels Durchflusszytometrie erfasst. Der SCSA macht sich die metachromatischen Eigenschaften des DNA-Farbstoffes Acridin Orange zunutze. Acridine Orange fluoresziert bei Bindung in doppelsträngigen Nukleinsäuren grün. In einsträngiger, denaturierter DNA bindet der Farbstoff an geladene Phosphatgruppen und fluoresziert rot. Der Prozentsatz roter Spermien relativ zur Gesamtpopulation wird als Defragmentationsindex (DFI) erfasst. Der SCSA hat eine breite Anwendung in der Diagnostik der humanen Reproduktion gefunden und wurde auch im Nutztierbereich etabliert [12, 13]. In einigen Studien wurde gezeigt, dass ein hoher Anteil an chromatin-instabilen Spermatozoen mit männlicher Sub- und Infertilität zusammenhängt [14, 15]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass chromatininstabile Eberspermien eine verminderte Fähigkeit zur Eileiterbindung besitzen und daher unter In-vivo-Bedingungen nur geringe Chancen haben, Eizellen zu erreichen und zu befruchten [16].

#### Membranintegrität

Die Befruchtungskompetenz einer Zelle ist wesentlich von der morphologischen und funktionellen Integrität der Plasmamembran und den darunter liegenden akrosomalen Membranen (äußere und innere akrosomale Membran) abhängig. Die Membranen reagieren sehr empfindlich auf Milieuveränderungen und Konservierungseinflüsse. So wurde beispielsweise festgestellt, dass die Spermienviabilität (Beurteilung des Membranintegritätsstatus anhand der DNA-Farbstoffe) in einem engeren Zusammenhang mit der Fertilität (Wurfgröße) von Ebern steht als die konventionelle Motilität [17]. Daher kommt der Diagnostik der Membranintegrität ein besonderer Stellenwert zu. Im Vergleich zur konventionellen lichtmikroskopischen Diagnostik bietet die Durchflusszytometrie die Vorteile der simultanen Darstellung der Integrität von Plasma- und Akrosommembranen und eine höhere Sensitivität zur frühzeitigen Entdeckung von Membranschäden.

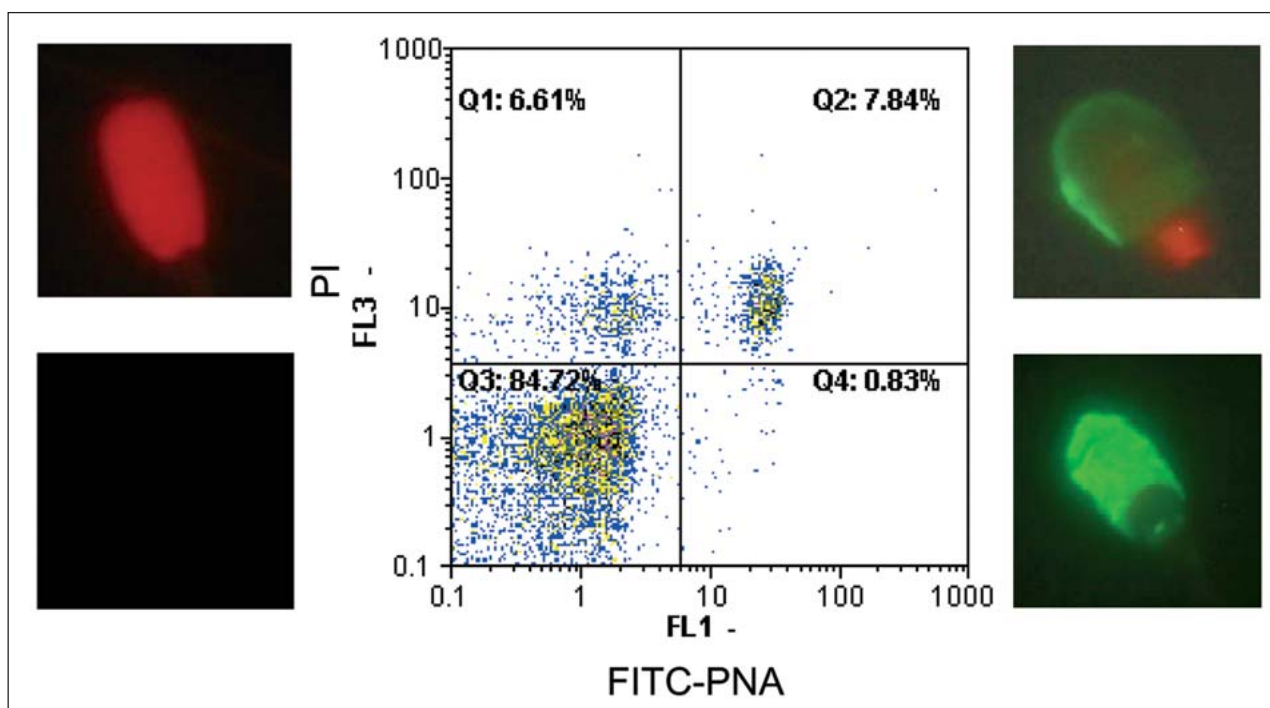
Die morphologische **Integrität der Plasmamembran** kann durch direkte Fluoreszenzmarkierung der Zellkomponenten evaluiert werden. Zu diesem Zweck werden entweder perme-

able oder impermeable Fluorochrome verwendet. Meistens kommen membranimpermeable Farbstoffe zum Einsatz; dabei werden nur „tote“ Spermien mit defekter und daher für den Farbstoff durchlässiger Plasmamembran markiert. Die am öftesten verwendeten Farbstoffe dieser Gruppe sind Propidium und Ethidium, die zwischen den Basen in doppelsträngiger DNA interkalieren. Sie können in Kombination mit anderen Farbstoffen für die gleichzeitige Messung von Antikörper-Bindung und DNA-Gehalt verwendet werden. Die **Integrität der akrosomalen Membranen** wird über die Bindungsfähigkeit von Lektinen (kohlenhydratbindende Proteine) an bestimmte Kompartimente des Akrosoms bestimmt. Die Lektine sind zur Detektion der Bindung an das fluoreszierende FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelt. Die Lektine Peanut Agglutinin, Pisum Sativum Agglutinin und Phaseolus Vulgaris Agglutinin (PNA, PSA, PHA) binden je nach Tierart an die äußere oder innere akrosomale Membran oder den Inhalt der akrosomalen Matrix und zeigen auf diese Weise Schäden an der akrosomalen Membran an. In der erweiterten Labordiagnostik hat insbesondere die kombinierte Erfassung des Zustandes von Plasma- und Akrosommembranen unter Einsatz des DNA-Farbstoffes Propidiumiodid und FITC-konjugierten Lektinen Eingang gefunden. Dabei lassen sich je nach Färbезustand und Kombination 4 Spermienpopulationen unterscheiden (Abb. 1). Nur ungefärbte Spermien mit intakter Plasmamembran und akrosomaler Membran sind intakt; die grüne, rote oder Doppelfärbung bedeutet, dass die Integrität zumindest einer der Zellmembranen beeinträchtigt ist.

#### **Volumetrische Analyse**

##### Anpassung an die Umgebung

Nach der Ejakulation durchlaufen Säugetierspermatozoen auf dem Weg durch das weibliche Genitale eine Sequenz funktioneller Prozesse zur Erlangung der Befruchtungsfähigkeit. Zwei funktionelle Voraussetzungen sind dafür entscheidend, ob die Spermazellen nach der Ejakulation und Deponierung in den weiblichen Genitaltrakt (vor und nach der Bindung am Eileiterepithel) prinzipiell zu weiteren Schritten befähigt sind. Dabei handelt es sich um die Fähigkeit der Spermatozoen zur Regulation des



**Abbildung 1:** Fluoreszenzoptische und durchflusszytometrische Darstellung von 4 Spermisubpopulationen: Integrität von Spermienplasma- (PM) und Akrosommembran (AM) nach Doppelfärbung mit Propidiumjodid (PI) und FITC-PNA.

**Q1:** PI-positive und FITC-PNA-negative Zellen: PM defekt, AM intakt; **Q2:** PI-positive und FITC-PNA-positive Zellen: PM und AM defekt; **Q3:** PI-negative und FITC-PNA-negative Zellen: PM und AM intakt; **Q4:** PI-negative und FITC-PNA-positive Zellen: PM intakt, AM defekt.

Zellvolumens und zum zeitgerechten Durchlaufen der Kapazitationssequenz.

Die funktionelle Integrität der Plasmamembran versetzt die Zelle in die Lage, auf die Veränderungen des externen Milieus zu reagieren und sich ohne Funktionseinschränkungen anzupassen. Das trifft insbesondere für die Samenzelle zu, da sie im Verlauf der Reifungsprozesse im männlichen und weiblichen Genitaltrakt viele komplexe funktionelle Veränderungen erfahren muss und damit besonders sensibel auf äußere Bedingungen reagiert. Obligatorisch für die Anpassung an die Umgebung ist die Fähigkeit zur Volumenregulation, die in vielen Zellsystemen entwickelt ist [18]. Spermatozoen werden schon bei der Ejakulation und nach Deponierung in den weiblichen Genitaltrakt mit hypotonen Bedingungen konfrontiert, da Seminalplasma und uterine Flüssigkeit eine niedrigere Osmolalität aufweisen als die epididymale Flüssigkeit. Der osmotische Gradient variiert speziesspezifisch und kann bis zu 100 mOsmol/kg betragen [19]. In Spermatozoenpopulationen, die nicht inmunde sind, ihr Zellvolumen langfristig zu regulieren, kommt es zu gravierenden funktionellen Einschränkungen wie Ver-

lust der Motilität, Unfähigkeit der Zervixpenetration und Verminderung der Spermien-Eileiter-Bindung [20–22]. Auch für die Kryokonservierung spielt die Fähigkeit zur Volumenregulation eine große Rolle. Während des Einfrierens werden Spermien dehydriert; während des Auftauvorganges findet die Re-Äquilibration von Wasser statt und die Zellen schwellen in Folge eines hypoosmotischen Schocks, was zu schwerwiegenden Schäden führen kann. Funktionierende Mechanismen der Volumenregulation im Frischsamen deuten daher darauf hin, dass die Spermatozoen den mit der Kryokonservierung assoziierten Stress besser vertragen können [23].

#### Regulation des isotonen Volumens

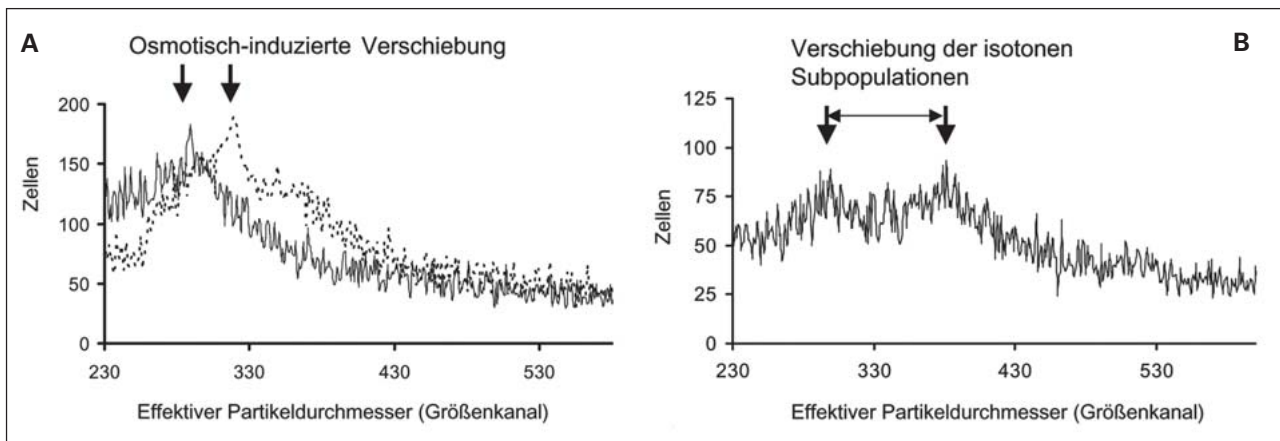
Die Größe des Zellvolumens unter isotonen Bedingungen ist ein potenziell wichtiger diagnostischer Parameter. Die Fähigkeit der Samenzellen, ihr Zellvolumen unter isotonen Bedingungen zu regulieren, ist sehr individuell ausgeprägt [24–26]. Individuelle zellvolumetrische Unterschiede (Abb. 2) stehen im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Befruchtungsleistung der Vatiertiere [27]. Die Grundlage dafür ist die hohe individuelle Variation in der Funktionalität der Ionentransportmechanismen im intra- und extrazellu-

lären Ionengehalt und die damit einhergehende Variation des elektrochemischen Gradienten durch die Zellmembran. Diese Variabilität hat Differenzen in der isotonen Volumenregulation zur Folge. So konnte gezeigt werden, dass erhöhte Natriumionen-Konzentrationen im Seminalplasma und erhöhte isotonen Zellvolumina mit niedrigen Befruchtungsraten einhergehen [27].

Die Fähigkeit der Samenzelle, ihr Volumen unter isotonen Bedingungen zu regulieren und aufrechtzuerhalten, ist somit eine entscheidende Voraussetzung für die funktionelle Integrität der Zellmembran und für die funktionelle Kompetenz (Befruchtungsfähigkeit) eines Spermatozoons. Die Messung des isotonen Volumens kann entweder unter Einsatz eines Partikelzählers (elektronische Volumenmessung) oder eines Durchflusszytometers (Streulichtcharakteristika) erfolgen [28, 29].

#### Hypoosmotischer Schwelltest

Im Normalfall bleibt das Zellvolumen unter physiologischen, isotonen Bedingungen konstant; nach einem hypotonen Stress kommt es dagegen physiologischerweise bei membranintakten Spermatozoen zu einer primären Anschwellung [30].



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Volumenverteilungen bei Bullspermien unter isotonen und hypotonen Bedingungen im modifizierten hypoosmotischen Schwelltest

**A:** Eingipflige Zellvolumenverteilungen unter iso- und hypotonen Bedingungen. **B:** Zweigipflige Zellvolumenverteilung eines subfertilen Bullen. Der zweite Gipfel (Pfeil) repräsentiert eine Spermienpopulation mit veränderter Volumenregulationsfähigkeit. Die Zellen mit instabiler Volumenregulation zeigen eine progressive Verschiebung (Schwellung) unter isotonen Bedingungen.

Diese Eigenschaft wurde zur Entwicklung praktischer **osmotischer Resistenz- und hypoosmotischer Schwelltests (ORT und HOST)** für verschiedene Tierarten verwendet [30–32]. Nach einer Inkubation im hypotonen Puffer wird mikroskopisch der Prozentsatz plasmamembranintakter Spermien anhand von Schwellung und charakteristischem Aufrollen des Schwanzes oder Schleifenbildung bestimmt [30]. Allerdings liegen sowohl in der Human- als auch in der Nutztierreproduktion widersprüchliche Ergebnisse über die Befruchtungsrelevanz dieses mikroskopischen Tests vor [33–35]. Wegen der ausgeprägten Subjektivität der Aussage, der geringen Anzahl ausgezählter Spermien und dem Unvermögen, den Grad der Schwellung zu charakterisieren, bleibt der Wert dieses Parameters fraglich.

#### Modifizierter hypoosmotischer Schwelltest

Durch Einsatz des Partikelzählers ist es möglich, eine exakte Verteilung des Zellvolumens von Spermatozoenpopulation zu erfassen. Aufgrund der technischen Entwicklung (hochfrequente Pulsflächenanalyse und Widerstandsmessprinzip) können die Messungen sehr präzise durchgeführt werden [23].

Spermatozoen vieler Spezies funktionieren als sogenannte perfekte Osmometer, d. h. dass ihr Zellvolumen sich umgekehrt proportional der Osmolarität verändert [36–38]. Der Grad der Volumenveränderungen  $V$  wird durch die Boyle-Van't-Hoff'sche Gleichung beschrieben und

entspricht der sogenannten Reaktion des perfekten Osmometers [39]:

$$V = (\pi_o/\pi_e)(V_o - V_b) + V_b$$

wo  $\pi_o$  und  $\pi_e$  die isotope und anisotope (extrazelluläre) Osmolarität darstellen,  $V_o$  dem isotonen Zellvolumen entspricht und  $V_b$  das osmotisch inaktive Zellvolumen beschreibt.

Die relative Verschiebung des Zellvolumens beim Übergang von isotonen zu hypotonen Bedingungen

$$V_r = V_{\text{hypo}}/V_{\text{iso}}$$

wird als Gradmesser für die relative Schwellung von Spermatozoen definiert. Ist dieser Quotient größer als 1 (progressive Schwellung), sind die meisten Zellen in der Zellpopulation intakt. Ist dieser Quotient geringer als 1, bedeutet dies, dass die Schwellung nicht stattfindet und die Zellen eine defekte Plasmamembran haben. Die Spermatozoen eines Ejakulates, die dabei starke Abweichungen zeigen oder in der Verteilung des Zellvolumina mehrere Subpopulationen aufweisen, gelten als „membrandestabilisiert“ [28, 38].

Die primäre Schwellung, die durch eine hypotone Belastung verursacht ist, geht bei weiterer Inkubation unter hypotonen Bedingungen durch die Aktivierung von Ionenkanälen und den Efflux von intrazellulären Ionen (z. B. Kalium- und Chloridionen) zurück [22, 40]. Dieser Prozess wird als „**Regulatory Volume Decrease (RVD)**“ bezeichnet. Die Aktivierung der Kanäle erfolgt durch noch nicht komplett charakterisierte Signalüber-

tragungswege, die beispielsweise Veränderungen in der Proteinphosphorylierung und dem Zytoskelett betreffen [28, 41].

Volumenregulatorische Tests wurden in der Spermatologie für verschiedene Spezies etabliert. Für Schwein und Rind bestehen Hinweise, dass diese Verfahren relevant für eine Fertilitätsprognose sind. So wurde es für Ebersperma gezeigt, dass die besseren Regulatoren auch höhere Abferkelraten haben [42]. Es ist ein hoher Variationsgrad bezüglich der Zellvolumenregulation nach hypotonem Stress zwischen Individuen und Ejakulaten zu erwarten. Diese Variabilität manifestiert sich zum einen in unterschiedlichen Zellvolumina zum anderen treten mehrere Subpopulationen innerhalb eines Ejakulates in Erscheinung.

#### **Spermien-Eileiter-Bindungsassays**

Nach dem Eintritt der Spermien in das weibliche Genital und Passage der uterotubalen Verbindung etabliert sich bei Haussäugetieren präovulatorisch im unteren Eileiteristhmus die potenziell befruchtungsfähige Spermienpopulation. Sie wird hier durch Bindung an die meist zilientragenden Epithelzellen zurückgehalten und unter Erhalt ihrer Viabilität und Funktionalität gelagert [43].

Aus heutiger Sicht erfüllt das oviduktales Spermienreservoir mehrere Funktionen:

- Selektion einer intakten befruchtungskompetenten Spermienpopulation



- Erhalt der Lebensfähigkeit der gelagerten Spermatozoen
- Regulation der Spermienfunktionen wie Kapazitation und Hyperaktivierung
- Begrenzung der Spermienzahl am Ort der Befruchtung

Nur befruchtungskompetente, morphologisch normale, vitale Spermien binden an das Eileiterepithel [44–46]. Für die spermatologische Diagnostik ist die selektive Funktion von entscheidender Bedeutung. Um den Einfluss des Eileiters auf die Spermienvitalität und -funktion zu untersuchen, wurden bei einer Reihe von Spezies wie Kaninchen, Rind, Pferd, Schwein und Mensch In-vitro-Assays mit **oviduktalen Epithelzellkulturen (OEC)** oder mit sogenannten Ovidukt-Explanten entwickelt. Explante sind Zellhaufen, die durch „Strippen“ der Eileiter (Rind [47]) gewonnen oder wie beim Schwein in winzigen mm-großen Stückchen [45, 48] herausgeschnitten werden. Vorteil dieses Verfahrens ist die Untersuchung kurz nach der Gewinnung der Eileiter ohne Kultivierungsschritte an einem intakten Zellverband unter in-vivo-nahen Bedingungen. In quantitativen Studien kann im „**Ovidukt Explant Assay**“ (OEA) die Bindungsfähigkeit von Spermatozoen an das Eileiterepithel als Maß für die Spermienqualität ermittelt werden (Abb. 3). Dazu werden frisch gewonnene Oviduktexplante mit einer definierten Anzahl gewaschener Spermatozoen kurzzeitig kokubiert und gefilmt.

Die Fläche der Explantfragmente wird gemessen und die Anzahl der gebundenen Spermien gezählt. Der sogenannte Bindungsindex (BI: Spermienzahl/0,01 mm<sup>2</sup>) wird als arithmetisches Mittel der Bindungsindizes zweier (oder mehrerer) Explante aus unterschiedlichen Regionen des Eileiters definiert:

$$BI = (BI_{E1} + BI_{E2})/2$$

$$BI_{E1,2} = (NR_1 + NR_2 + NR_3) / (SR_1 + SR_2 + SR_3)$$

wobei NR<sub>1</sub>, NR<sub>2</sub>, NR<sub>3</sub> die Anzahl der Spermien, die an den Fragmenten R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> gebunden sind, und SR<sub>1</sub>, SR<sub>2</sub>, SR<sub>3</sub> die Fläche dieser Fragmente darstellen.

Obwohl systematische Studien über das Verhältnis zwischen den Ergebnissen des OEAs und der Fruchtbarkeit fehlen, gibt es Hinweise für die Nützlichkeit dieses Verfahrens in der spermatologischen Diagnostik. Untersuchungen an geringen Probandenzahlen bei Schwein und Rind zeigen individuenabhängig eine hohe Variation der Bindungsindizes, die nachweislich mit Fertilitätsunterschieden verbunden war [21, 49]. Die Sensitivität des Assays zeigt sich auch darin, dass flüssigkonservierte Eberspermien nach 72 Stunden Lagerung eine reduzierte Eileiterbindungskapazität aufwiesen, ohne dass der lagerungsbedingte Qualitätsverlust standard-spermatologisch diagnostizierbar war [50]. Die Resultate des OEA stehen zudem in einem wichtigen funktionellen Zu-

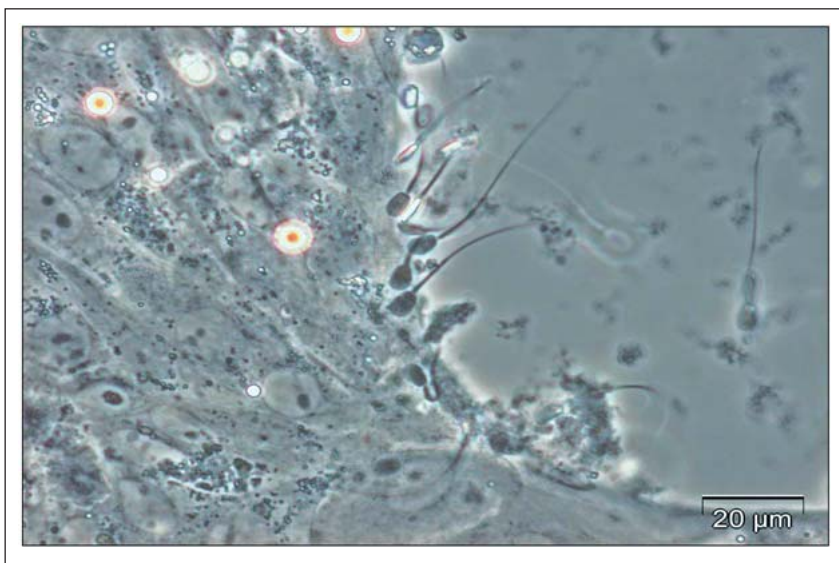
sammenhang mit der Volumenregulation: die höhere Bindungsfähigkeit der Spermatozoen ist mit der besseren Regulation des Zellvolumens assoziiert [21].

### Kapazitationstests

Die post-ejakulatorische Wechselwirkung mit der Umgebung hat weitere Auswirkungen auf die membranvermittelten Prozesse in Spermatozoen. Die Vorgänge der Kapazitation, die die Spermatozoen auf die Befruchtung vorbereiten, umfassen vor allem Veränderungen der molekularen Struktur, der Funktion und der Morphologie der Membran. Diese Veränderungen spiegeln sich in der Dynamik der Regulation der Transportvorgänge und intrazellulären Ionenkonzentrationen wider und resultieren in der Aktivierung spezifischer Signalübertragungssysteme, die zur Hyperaktivierung (Veränderung des Bewegungsmusters) und am Ende zur Akrosomreaktion (Exozytose des Akrosoms) führen [51]. Während der Ejakulation binden als „Dekapazitationsfaktoren“ bezeichnete sekretorische Proteine der akzessorischen Geschlechtsdrüsen an die Spermienoberfläche und bilden eine Schutzschicht [52]. Die funktionelle Destabilisierung wird zum einen durch die Bikarbonat-gesteuerte Veränderung der Lipidstruktur der Membran und durch einen „lipid carrier“-vermittelten Efflux von Cholesterin aus der Membran, zum anderen durch die Entfernung der sekretorischen Proteine (Dekapazitationsfaktoren) eingeleitet. Erst dann ist die Membran für die endogenen Prozesse (z. B. Veränderungen in den intrazellulären Ionenkonzentrationen und Umverteilungen der Rezeptoren und Proteine) vorbereitet.

### Tests zur Erfassung molekularer Veränderungen

Eines der frühzeitigen Ereignisse der Kapazitation ist die Veränderung der Lipidarchitektur der Membran. Der Grad der Asymmetrie kann mit dem **Merocyanin-Assay** unter Anwendung der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Schon nach wenigen Minuten (10–25 min) ist in der kapazitationsbehandelten (Bikarbonat/CO<sub>2</sub>) Spermienpopulationen ein höheres Maß an Merocyanin-Bindung nachweisbar. Die Ausprägung ist höchst individuell bei unterschiedlichen Vartieren. Dieser Test wird erfolgreich bei Schwein, Hengst und Bulle angewandt.



**Abbildung 3:** „Ovidukt Explant Assay“: an ein Eileiterexplant gebundene Eberspermien. Vergrößerung × 250.

Die Erhöhung des internen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels und Tyrosinphosphorylierung von Spermienproteinen sind endogene Veränderungen, die im Verlauf der Kapazitation auftreten; sie sind für die nachfolgende Akrosomreaktion essenziell. Diese Veränderungen können anhand der Immunfluoreszenz unter Anwendung der Mikroskopie oder Durchflusszytometrie im Rahmen fortgeschrittener diagnostischer Verfahren erfasst werden.

Mit Darstellung des **intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels** von Spermatozoen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging unter Einsatz von Kalzium-Fluorochromen (z. B. Fluo-3-AM) wurde am Beispiel von Pferd und Schwein nachgewiesen, dass durch die Interaktion der Spermatozoen mit dem Eileiterepithel der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt auf einem konstant niedrigeren Niveau gehalten wird [53–55], während sich der prozentuale Anteil der ungebundenen Spermatozoen mit hohem  $\text{Ca}^{2+}$ -Level im Verlauf einer 3-stündigen Koinkubation unter kapazitationsfördernden Bedingungen verdoppelte (22 %).

Durch Aktivierung der Adenylatzyklase und der damit zusammenhängenden Erhöhung des cAMP-Spiegels erfolgt die Aktivierung von PKA (Proteinkinase A) und die **Tyrosinphosphorylierung** von Proteinen [56, 57]. Diese Phosphorylierung setzt innerhalb der ersten Stunden des Kapazitationsvorganges ein [58, 59]. Dass die Phosphorylierungsreaktionen eine Begleiterscheinung der Kapazitation sind, wurde in unterschiedlich kombinierten In-vitro-Systemen nachgewiesen. Die spezifische Phosphorylierung der Spermienproteine, deren Molekulargewichte sich tierartspezifisch unterscheiden, wurde sowohl im Geißelkompartiment als auch im Spermienkopfkompartment der Spermatozoen einiger Spezies, z. B. Schwein und Hund, lokalisiert [60]. Diese Veränderungen könnten somit sowohl auf eine mögliche Beteiligung der Tyrosinphosphorylierung in Vorbereitung auf die Akrosomreaktion als auch auf die Hyperaktivierung hindeuten. Individuelle Unterschiede in der Tyrosinphosphorylierung können sowohl in der Elektrophorese als auch in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden und sind als fortgeschrittene Diagnostika anwendbar (z. B. beim Hund [61]). Die Ausprägung der kapazitationsbedingten Tyrosinphosphorylierung ist außerdem von der Be-

handlung der Spermien abhängig, was eine Perspektive zum Einsatz von diesem Parameter für die Beurteilung der Verdünnereffizienz zuzunutzen macht [62].

#### Auslösung der Akrosomreaktion

Nur kapazitierte Spermien sind in der Lage, die Akrosomreaktion zu durchlaufen, die Zona pellucida zu penetrieren und mit der Eizelle zu fusionieren [2]. Daher ist die Erfassung des Membranstatus durch gleichzeitige Beurteilung der Integrität von Plasmamembran und Akrosom unter Einsatz Propidiumjodid/FITC-konjugierter Lektine nach einer Kapazitationsbehandlung und Induktion der Akrosomreaktion ein Gradmesser der Kapazitationsfähigkeit der Spermien und ein wichtiges Diagnostikum [63]. Auch bei der Beurteilung der Verdünnereffizienz für die Kryokonservierung erweist sich die Erfassung der induzierten Akrosomreaktion in Kombination mit der volumetrischen Analyse sensitiver als standardspermatologische Parameter bei Hundespermien [64].

Die **Induktion der Akrosomreaktion** kann durch Anwendung spezieller Stimuli erfolgen: intakte Zona pellucida, solubilisierter Zona pellucida-Proteine, Progesteron, Kalziumionophor etc. Der Grad der Reaktivität auf die verschiedenen Stimuli ist von dem Reifungsstatus der Spermien, dem Individuum, den Inkubationsbedingungen und anderen Einflussfaktoren wie Konzentration der Stimuli oder Reifungsstatus der Zonae abhängig. Deshalb sollten solche Tests unter standardisierten Bedingungen

durchgeführt und als Gesamtprozess betrachtet werden [22].

*Dynamische Charakterisierung der kapazitationsbedingten Destabilisierung*  
Kapazitation kann auch als ein Prozess der kontrollierten positiven Membrandestabilisierung verstanden werden [65]. Die Heterogenität der Zellpopulationen (stark ausgeprägte Variation funktioneller Eigenschaften innerhalb eines Ejakulates) sowie Differenzen zwischen den Ejakulaten eines Spenders und zwischen den Ejakulaten verschiedener Individuen äußern sich in unterschiedlichen Geschwindigkeiten dieser Kapazitationsabläufe. Je schneller die Spermatozoen die einzelnen Stadien dieses Prozesses durchlaufen, desto schneller wird die untere und obere Grenze des sogenannten „Kapazitationsfensters“ erreicht (Abb. 4). Der Eintritt in das „Kapazitationsfenster“ wird im Allgemeinen mit der Fähigkeit der Spermatozoen assoziiert, auf die befruchtungsfördernden Bedingungen zu reagieren, indem sie hyperaktivierte Bewegungsmuster zeigen und an der Zona pellucida der Eizelle die Akrosomreaktion vollziehen [65].

Außerhalb dieses Fensters ist nicht mehr von „positiver Destabilisierung“, sondern von „Zelldegeneration“ zu sprechen. Die Bestimmung einzelner spermatologischer Parameter als Populationsdurchschnitt zu einem definierten Zeitpunkt reflektiert weder den Grad der Heterogenität der Gesamtpopulation noch den Grad der funktionellen Modulation der Samenzellen in ausreichender Weise. Dagegen ermöglicht die **dynamische**

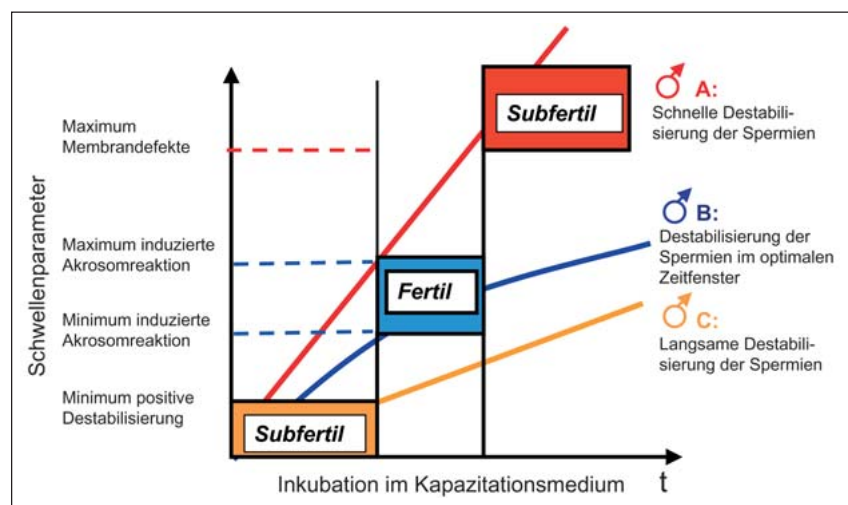


Abbildung 4: Modell zur Kinetik der Kapazitationsveränderungen bei Vatertieren mit unterschiedlicher Fertilität.

**Charakterisierung funktioneller Veränderungen** (1) die Determinierung der Sequenz einzelner Kapazitationsabläufe (Prozesskette) und (2) den Vergleich zwischen funktionell unterschiedlichen Zellpopulationen [55, 61].

Deswegen wird in der weiterführenden Diagnostik großen Wert auf Verfahren zur Erfassung der Prozesskinetiken gelegt. Anwendungsbeispiele gibt es aus der Spermakonservierungsforschung. So konnten bei flüssigkonservierten Eberspermien lage- und temperaturabhängige Qualitätsunterschiede nur anhand der Kinetik des Kalziuminfluxes und induzierten Akrosomreaktion erfasst werden; standardspermatologische Parameter erwiesen sich nicht sensitiv genug [66]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sowohl eine zu schnelle als auch eine zu langsame Kinetik der kapazitationsbedingten Destabilisierung mit Subfertilität assoziiert ist [63]. Das begründet die weitere Etablierung solcher spezieller Verfahren in der spermatologischen Praxis.

#### **Zonabindung/Penetration**

Zona pellucida-Bindung und Oozyten-Penetration-Tests wurden für unterschiedliche Spezies etabliert. In diesem Verfahren werden die an die Zona pellucida gebundenen bzw. penetrierten Spermatozoen ausgezählt. Allerdings sind solche Assays einigen Einschränkungen unterlegen. Es wurde gezeigt, dass auch unkapazitierte Spermien an der Zona pellucida binden können und somit die Bindung nicht als Kriterium der Befruchtungskompetenz angesehen werden kann [67]. Andererseits gilt die Fähigkeit von Spermatozoen, die Zona pellucida zu penetrieren, als Zeichen der funktionellen Kompetenz, da diese Barriere nur von kapazitierten Spermien während des Befruchtungsvorganges überwunden werden kann [68]. Die Assays gelten als aufwendig und wenig standardisierbar, sodass sie in der Laborroutine nicht etabliert sind. Nachteilig ist auch, dass unter In-vivo-Bedingungen essenzielle Spermieigenschaften, wie deren Überlebensfähigkeit im weiblichen Genital, mit diesen Testverfahren nicht erfassbar sind [69]. Für experimentelle Zwecke, die der unmittelbaren Überprüfung der Befruchtungs- und frühembryonalen Entwicklungsfähigkeit dienen, sind IVF-Tests für verschiedene Spezies etabliert.

### **Perspektiven in der modernen Spermatologie**

Die Anwendung computergestützter und insbesondere zytometrischer Verfahren in der Reproduktionsbiologie und in der spermatologischen Diagnostik gewinnt zunehmend an Bedeutung. Allerdings steht die Zytomik als neues Gebiet der funktionellen und molekularen Analyse noch am Anfang ihrer Entwicklung. Obwohl das enorme Potenzial der multiparametrischen Erfassung von Systemeigenschaften und nachfolgender Molekularanalyse nicht zu bestreiten ist, bedarf es umfassender Vorarbeit in konventionellen Monosystemen isolierter Zellen, um die zu Verfügung stehenden technischen und analytischen Mittel in das Spektrum gängiger Verfahren zu integrieren und Aspekte der Dynamik und Heterogenität in die Analyse der Zellpopulationen innerhalb komplexer biologischer Systeme einzuschließen.

Um die spermatologischen Parameter gemäß ihrer Signifikanz im Reproduktionsgeschehen einordnen zu können, müssen die Erfassungs- und Analyse-Methoden sensitiv und reproduzierbar sein. Dabei ist es wichtig, nicht nur eine repräsentative Popula-

tion quantitativ auszuwerten, sondern möglichst die gesamte biologische Heterogenität innerhalb eines Zellsystems zu berücksichtigen. Die multiparametrische zytometrische Erfassung und Bestimmung dynamischer Regulationsprozesse in Spermatozoenpopulationen in ihrem zeitlichen Verlauf bietet in diesem Zusammenhang eine einzigartige Möglichkeit, die Charakterisierung und das Verständnis reproduktionsbiologischer Vorgänge zu erweitern. Das humane Zytomprojekt schreibt neben modernen Methoden der Proteomik und Genomik der zusammenfassenden molekularen funktionellen Zellsystemforschung eine zentrale Rolle in der Diagnostik und Prädiktivmedizin zu [4, 5]. Die Einbeziehung der modernen Methoden der Zytomik bei der Charakterisierung der Heterogenität und Dynamik tierischer Zellen und Zellsysteme würde eine logische Fortsetzung des humanen Zytomprojektes zur funktionellen Zytomanalyse darstellen. Die Inhalte vorliegender Arbeit illustrieren die Anwendung multimolekularer Analyseverfahren in Verbindung mit nachfolgender quantitativer und analytischer Auswertung auf dem Gebiet der Reproduktionsbiologie von Säugetierspezies.

#### **Relevanz für die Praxis**

In der Praxis ermöglichen die modernen Methoden neue Perspektiven der Fertilitätsprognose und des Therapieentscheids. Die Differenzierung biologisch unterschiedlicher Spermienpopulationen ist insbesondere unter In-vivo-Fertilisationsbedingungen von hoher Bedeutung. Hiervon profitiert in erster Linie die veterinärmedizinische Andrologie, wo die Erzielung möglichst vieler Graviditäten mit konserviertem Sperma nach Insemination die Grundlage einer effizienten Tierproduktion ist. Die frühzeitige Erkennung subfertiler Vartiere steht dabei im Vordergrund. In der Humanmedizin bieten die neuen Verfahren wertvolle Entscheidungshilfen für den Einsatz assistierter Reproduktionstechniken. Die stetige Suche nach besseren Spermakonservierungstechniken und die Bestrebung, mit möglichst geringen Spermienzahlen oder mit besonders aufbereitetem Sperma (z. B. gesextem Sperma) zum Befruchtungserfolg zu gelangen, erfordern eine differenzierte spermatologische Diagnostik. Hier findet sich ein großes Anwendungspotenzial der modernen Spermatologie.

#### **Literatur:**

1. Austin CR. The capacitation of mammalian sperm. *Nature* 1952; 17: 326.
2. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (ed). *The physiology of reproduction*. New York, Raven Press, 1994; 189–317.
3. Hunter RHF. The Fallopian Tubes: Their Role in Fertility and Infertility. In: *The Fallopian Tubes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1988; 58–74.
4. Valet G, Tarnok A. Cytomics in predictive medicine. *Cytometry B Clin Cytometry* 2003; B53; 1–3.
5. Valet G, Leary JF, Tarnok A. Cytomics – new technologies: towards a human cytome project. *Cytometry A* 2004; A59: 167–71.
6. Holt WV, Van Look KJ. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 2004; 127: 527–35.

7. Davis RO, Siemers RJ. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 857–69.
8. Satake N, Elliot RMA, Watson PF, Holt WV. Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm subpopulations within the oviduct. *J Exp Biol* 2006; 209: 1560–72.
9. Holt C, Holt WV, Moore HD, Reed HC, Curnock RM. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl* 1997; 18: 312–23.
10. Aitken RJ, de Iuliis GN. Value of DNA integrity assays for fertility evaluation. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65: 81–92.
11. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210: 1131–3.
12. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparison with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25–43.
13. Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male fertility. *Theriogenology* 2006; 65: 979–91.
14. Spano M, Bonde JP, Hjöllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril* 2000; 73: 43–50.
15. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039–49.
16. Ardón F, Helms D, Sahin E, Bollwein H, Töpfer-Petersen E, Waberski D. Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes in vivo. *Reproduction* 2008; 135: 461–70.
17. Christensen P, Knudsen DB, Wachmann H, Madsen MT. Quality control in boar semen production by use of the FACSCount AF system. *Theriogenology* 2004; 62: 1218–28.
18. Al Habori M. Cell volume and ion transport regulation. *Int J Biochem* 1994; 26: 319–34.
19. Cooper TG, Yeung CH. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Micros Res Tech* 2003; 61: 28–38.
20. Yeung CH, Cooper TG. Effects of the ion-channel blocker quinine on human sperm volume, kinematics and mucus penetration, and the involvement of potassium channels. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 819–28.
21. Khalil AAY, Petrunkina AM, Sahin E, Waberski D, Töpfer-Petersen E. Enhanced binding of sperm with superior volume regulation to oviductal epithelium. *J Androl* 2006; 27: 754–65.
22. Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 2007; 134: 3–17.
23. Petrunkina AM, Gröpper B, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. Functional significance of the cell volume for detecting cell membrane changes and predicting freezability in dog semen. *Reproduction* 2004; 128: 829–42.
24. Engel S, Petzoldt R. The spermatozoal volume as indicative of the plasma membrane integrity (modification of the hypoosmotic swelling test). I. Methods. *Andrologia* 1994; 26: 309–13.
25. Petzoldt R, Engel S. The spermatozoal volume as indicative of the plasma membrane integrity (modification of the hypoosmotic swelling test). II. Diagnostic approach. *Andrologia* 1994; 26: 315–21.
26. Petrunkina AM, Harrison RAP, Petzoldt R, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. Cyclical changes in sperm volume during in-vitro incubation under capacitating conditions: a novel boar semen characteristics. *J Reprod Fertil* 2000; 118: 283–93.
27. Petrunkina AM, Petzoldt R, Stahlberg R, Pfeilsticker J, Beyerbach M, Bader H, Töpfer-Petersen E. Sperm-cell volumetric measurements as parameters in bull semen function evaluation: correlation with nonreturn rate. *Andrologia* 2001; 33: 360–7.
28. Petrunkina AM, Jebe E, Töpfer-Petersen E. Regulatory and necrotic volume increase in boar spermatozoa. *J Cell Phys* 2005; 204: 508–21.
29. Yeung CH, Barfield JP, Cooper TG. Chloride channels in physiological volume regulation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 2005; 73: 1057–63.
30. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 219–28.
31. Pérez-Llano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, García-Casado P. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 2001; 56: 387–98.
32. Caiza de la Cueva FI, Pujol MR, Rigau T, Bonet S, Miró J, Briz M, Rodríguez-Gill JE. Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. *Theriogenology* 1997; 48: 947–68.
33. Januskauskas Rodríguez-Martínez H. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta Vet Scand* 1995; 36: 571–4.
34. Casper RF, Meriano JS, Jarn KA, Cowan L, Lucato ML. The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1996; 65: 972–86.
35. Van der Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Perez-Pelaez M, Dietrich K, Zaneveld LJD. Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (hypoosmotic swelling test) and in vitro fertilization. *J Androl* 1986; 7: 190–6.
36. Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, Critser JK. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1995; 53: 985–95.
37. Gilmore JA, Liu J, Peter AT, Critser JK. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol Reprod* 1998; 58: 28–36.
38. Petrunkina AM, Töpfer-Petersen E. Heterogeneous osmotic behaviour in boar sperm populations and its relevance for detection of changes in plasma membranes. *Reprod Fertil Dev* 2000; 12: 297–305.
39. Drevius LO, Erickson H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp Cell Res* 1966; 136–56.
40. Kulkarni SB, Sauna ZE, Somlata V, Sitaramam V. Volume regulation of spermatozoa by quinine-sensitive channels. *Mol Reprod Dev* 1997; 46: 535–50.
41. Petrunkina AM, Hebel M, Waberski D, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. Requirement of intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. *Reproduction* 2004; 127: 105–16.
42. Petrunkina AM, Harrison RAP, Ekhlas-Hundrieser M, Töpfer-Petersen E. The role of volume-sensitive osmolyte and anion channels in volume regulation by mammalian spermatozoa. *Mol Human Reprod* 2004; 10: 815–23.
43. Hunter RHF. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J Reprod Fert* 1981; 63: 109–17.
44. Thomas PG, Ball BA, Miller PG, Brinsko SP, Southwood L. A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers. *Biol Reprod* 1994; 51: 303–9.
45. Petrunkina AM, Gehlhaar R, Drommer W, Waberski D, Töpfer-Petersen E. Selective sperm binding to porcine oviductal epithelium in vitro. *Reproduction* 2001; 121: 889–96.
46. Gualtieri R, Talevi R. Selection of highly fertilization-competent bovine spermatozoa through adhesion to the fallopian tube epithelium in vitro. *Reproduction* 2003; 125: 251–8.
47. Lefebvre R, Chenoweth PJ, Drost M, LeClear CT, MacCubbin M, Dutton JT, Suarez SS. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biol Reprod* 1995; 53: 1066–74.
48. Suarez SS, Redfern K, Raynor P, Martin F, Philipps DM. Attachment of boar sperm mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir. *Biol Reprod* 2001; 44: 998–1004.
49. De Pauw IMC, Van Soom A, Laevens H, Verberckmoes S, de Kruijff A. Sperm binding to epithelial oviduct explants in bulls with different nonreturn rates investigated with a new in vitro model. *Biol Reprod* 2002; 67: 1073–9.
50. Waberski D, Magnus F, Ardón F, Petrunkina AM, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. Binding of boar spermatozoa to oviductal epithelium in vitro in relation to sperm morphology and storage time. *Reproduction* 2006; 131: 311–8.
51. Suarez SS. Hyperactivated motility in sperm. *J Androl* 1996; 17: 331–5.
52. Töpfer-Petersen E. Molecules on the sperm's route to fertilization. *J Exp Zool* 1999; 285: 259–66.
53. Dobrinski I, Suarez SS, Ball BA. Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro. *Biol Reprod* 1996; 54: 783–8.
54. Dobrinski I, Smith TT, Suarez SS, Ball BA. Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 861–9.
55. Petrunkina AM, Friedrich J, Drommer W, Bicker G, Waberski D, Töpfer-Petersen E. Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca<sup>2+</sup>-concentration, and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction* 2001; 122: 469–80.

56. Harrison RAP, Miller NGA. cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 220–8.
57. Holt WV, Harrison RAP. Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. *J Androl* 2002; 23: 557–65.
58. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa: I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995; 121: 1129–37.
59. Visconti PE, Moore GD, Bailey JL, Leclerc P, Connors SA, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa: II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway. *Development* 1995; 121: 1139–50.
60. Urner F, Sakkas D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2003; 125: 17–26.
61. Petrunkina AM, Simon K, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E. Specific order in the appearance of protein tyrosine phosphorylation patterns is functionally coordinated with dog sperm hyperactivation and capacitation. *J Androl* 2003; 24: 423–33.
62. Dubé C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Guillemette C, Bailey JL. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology* 2004; 62: 874–86.
63. Petrunkina AM, Volker G, Brandt H, Töpfer-Petersen E, Waberski D. Functional significance of sperm responsiveness to capacitating conditions. *Theriogenology* 2005; 64: 1766–82.
64. Petrunkina AM, Gröpper B, Töpfer-Petersen E, Günzel-Apel AR. E Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. *Theriogenology* 2005; 63: 1390–406.
65. Harrison RAP. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 581–94.
66. Petrunkina AM, Volker G, Beyerbach M, Töpfer-Petersen E, Waberski D. Detection of cooling-induced membrane changes in boar sperm response to capacitating conditions. *Theriogenology* 2005; 63: 2278–99.
67. Lynham JA, Harrison RAP. Use of stored pig eggs to assess boar sperm fertilizing functions in vitro. *Biol Reprod* 1998; 58: 539–50.
68. Gadea J, Matas C. Sperm factors related to in vitro penetration of porcine oocytes. *Theriogenology* 2000; 54: 1343–57.
69. Waberski D, Magnus F, Mendonca Ferreira F, Petrunkina AM, Weitze KF, Töpfer-Petersen E. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 63: 470–84.

ANTWORTFAX

# JOURNAL FÜR REPRODUKTIONSMEDIZIN UND ENDOKRINOLOGIE

Hiermit bestelle ich

ein Jahresabonnement  
(mindestens 4 Ausgaben) zum  
Preis von € 80,- (Stand 1.1.2008)  
(im Ausland zzgl. Versandkosten)

Name

Anschrift

Datum, Unterschrift

## Einsenden oder per Fax an:

Krause & Pachernegg GmbH, Verlag für Medizin und Wirtschaft,  
Postfach 21, A-3003 Gablitz, **FAX: +43 (0) 2231 / 612 58-10**

---

**Bücher & CDs**  
**Homepage: [www.kup.at/buch\\_cd.htm](http://www.kup.at/buch_cd.htm)**

---

# Mitteilungen aus der Redaktion

## Die meistgelesenen Artikel



Speculum

## Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie

