

ISBN 973-7937-15-5

Casa de editură „Mureș”
Str. G. Enescu nr. 2, Târgu-Mureș
Consilier editorial: *Eugeniu Nistor*
Culegere și corectură: *autorul*
Secretar de redacție: *Rozalia Cotoi*
Copyright © *Mihai Cristian Griga*

Aus der
Tierklinik für Fortpflanzung
Arbeitsgruppe Bestandsbetreuung und Qualitätsmanagement
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
www.tiergyn.de

**Untersuchungen zur Verbesserung der Technologie der Gefrierkonservierung
von Bullensperma**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Mihai Cristian Griga
Tierarzt aus Târgu-Mureş/Rumänien

Berlin 2008

Journal-Nr.:3246

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Brunnberg

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heuwieser

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Bollwein

Dritte Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Staufenbiel

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Bull semen; semen preservation; semen production; kryoconservation; semen quality; sperm motility; CASA; sperm viability; equilibrationtime; fertility; NRR; flow cytometry; lipid peroxidation

Tag der Promotion: 01.04.2009

Diese Arbeit wurde durch Mittel des Dr. Dr. h.c.Karl Eibl-Stiftung, gefördert.

für Tudorița und meine Eltern

Inhaltverzeichnis

1	Einleitung	10
2	Literaturübersicht	11
2.1	Technologie der Konservierung von Bullensperma	11
2.1.1	Gefrierkonservierung von Bullensperma	11
2.1.2	Flüssigkonservierung von Bullensperma	18
2.2	Spermauntersuchung und –beurteilung	19
2.2.1	Makroskopische Untersuchungen	19
2.2.2	Mikroskopische Untersuchungen	20
2.2.3	Qualitätskontrolle und Beurteilung des aufgetauten tiefgefrierkonservierten Bullenspermas	21
2.3	Zusatz von Antioxidanzien zur Verringerung von oxidativem Stress	25
2.4	Zusammenhänge zwischen den spermatologischen Parametern und der Fertilität	28
3	Material und Methoden	31
3.1	Versuchstiere und Versuchssperma	31
3.2	Grundsätzliche technologische Abläufe der Gefrierkonservierung von Bullensperma in der Besamungsbullenstation Neustadt a. d. Aisch	31
3.2.1	Spermagewinnung	31
3.2.2	Spermabeurteilung	32
3.2.3	Spermaverdünnung und -gefrierkonservierung	33
3.3	Versuchsansätze	34
3.3.1	Untersuchung der Homogenität von Besamungsportionen gleicher Ejakulate hinsichtlich Spermienzahl und Spermaqualität	35
3.3.1.1	Vorversuch zum Sedimentationsverhalten von Bullenspermien im verdünnten Sperma	35
3.3.1.2	Versuch 1 - Einfluss von Konfektionierungsablauf, Verdünner und Verdünnungsgrad	36
3.3.2	Untersuchungen zum Temperaturregime und zu den Zeitabläufen bei der Spermaaufbereitung von der Phase der Spermaverdünnung bis zur Phase des Einfrierens.	38
3.3.2.1	Versuch 2 - Einfluss von Bedingungen bei der Zweitverdünnung auf die Spermaqualität	39
3.3.2.2	Versuch 3 – Einfluss von Bedingungen der Äquilibration und des Konfektionierungszeitpunktes auf die Spermaqualität	39
3.3.2.3	Versuch 4 – Einfluss von Äquilibrationdauer auf die Spermaqualität	40
3.3.3	Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree® Premix zum Verdünner	41
3.3.3.1	Versuch 5 - Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree® Premix zu den Verdünnern Triladyl® und BioXcell®	41

3.3.3.2	Versuch 6 - Ermittlung von Spermienvitalitäts- und Fertilitätsparameter nach Zusatz von Oxyfree® Premix zum Triladyl®-Verdünner und Erhöhung des Verdünnungsgrades	42
3.3.4	Untersuchungen zur Ermittlung des fertilitätsprognostischen Wertes der Parameter des gefrierkonservierten Bullenspermien	43
3.4	Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der Spermaqualität	44
3.4.1	Ermittlung der Spermienkonzentration in aufgetautem Sperma mittels Zählkammer nach THOMA ^{neu}	44
3.4.2	Ermittlung der Spermienkonzentration in aufgetautem Sperma mittels Nucleocounter®	45
3.4.3	Schätzung des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien im Thermoresistenztest nach dem Auftauen	45
3.4.4	Computergestützte Motilitätsanalyse	46
3.4.5	Durchflusszytometrie	47
3.4.5.1	FITC-PNA/PI – Färbung	48
3.4.5.2	Rhodamin 123/PI – Färbung	49
3.4.5.3	Dihydrorhodamin 123 (DHR)/PI – Färbung	51
3.4.5.4	Dichlorofluoreszein diacetate (DCFH)/PI – Färbung	52
3.4.5.5	C11-Bodipy ^{581/591} (Bodipy)/PI – Färbung	53
3.4.5.6	SCSA®-Färbung	55
3.5	Erfassung von Befruchtungsergebnissen bei Feldversuchen	56
3.6	Anwendung biostatistischer Verfahren bei der Versuchsauswertung	57
4	Ergebnisse	58
4.1	Untersuchung der Homogenität von Besamungsportionen gleicher Ejakulate hinsichtlich Spermienzahl und Spermaqualität	58
4.1.1	Sedimentationsverhalten von Bullenspermien im verdünnten Sperma	58
4.1.2	Einfluss unterschiedlicher Konfektionierungsabläufe, Verdünner und Verdünnungsgrad auf die Homogenität von Besamungsportionen	60
4.2	Untersuchungen zum Temperaturregime und zu den Zeitabläufen bei der Spermaaufbereitung von der Phase der Spermaverdünnung bis zur Phase des Einfrierens	64
4.2.1	Einfluss unterschiedlicher Bedingungen bei der Zweitverdünnung auf die Spermaqualität	64
4.2.2	Einfluss unterschiedlicher Bedingungen der Äquilibration und des Konfektionierungszeitpunktes auf die Spermaqualität	67
4.2.3	Einfluss von Äquilibrationdauer auf die Spermaqualität	70
4.3	Ermittlung von Spermienvitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree® Premix zum Verdünner	74
4.3.1	Ermittlung von Spermienvitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree® Premix zu den Verdünnern Triladyl® und BioXcell®	74

4.3.2	Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparameter nach Zusatz von Oxyfree® Premix zum Triladyl®-Verdünner und der Erhöhung des Verdünnungsgrades _____	81
4.4	Untersuchungen zur Ermittlung des fertilitätsprognostischen Wertes der spermatologischen Parameter der gefrierkonservierten Bullenspermien _____	87
5	<i>Diskussion</i> _____	96
5.1	Untersuchung der Homogenität von Besamungsportionen gleicher Ejakulate hinsichtlich Spermienzahl und Spermaqualität _____	96
5.2	Untersuchungen zum Temperaturregime und zu den Zeitabläufen bei der Spermaaufbereitung von der Phase der Spermaverdünnung bis zur Phase des Einfrierens _____	99
5.2.1	Einfluss unterschiedlicher Bedingungen bei der Zweitverdünnung auf die Spermaqualität _____	99
5.2.2	Einfluss unterschiedlicher Bedingungen der Äquilibration und des Konfektionierungszeitpunktes auf die Spermaqualität _____	100
5.2.3	Einfluss der Äquilibrationdauer auf die Spermaqualität _____	100
5.3	Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree® Premix zum Verdünner _____	102
5.3.1	Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparameter nach Zusatz von Oxyfree® Premix zu den Verdünnern Triladyl® und BioXcell® _____	103
5.3.2	Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparameter nach Zusatz von Oxyfree® Premix zum Triladyl®-Verdünner und der Erhöhung des Verdünnungsgrades _____	106
5.4	Untersuchungen zur Ermittlung des fertilitätsprognostischen Wertes der spermatologischen Parameter der gefrierkonservierten Bullenspermien _____	108
6	<i>Zusammenfassung</i> _____	115
7	<i>Summary</i> _____	117
8	<i>Literaturverzeichnis</i> _____	119
9	<i>Anhang</i> _____	143

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALH	Amplitude of lateral head displacement
BCF	Beat cross frequency
Bidest.	Aqua bidestillate
Bodipy	C11-Bodipy ^{581/591}
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CASA	Computer assisted sperm analysis
DCFH	Dichlorofluoreszein
DFI	DNA-Fragmentationsindex
d. h.	das heißt
DHR	Dihydrorhodamin 123
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
et al.	et alii
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL 1-3	Fluoreszenzkanäle 1 bis 3
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
LIN	Linearity: VSL/VCL
Lin.	linear progressiv motile Spermien

mg	Miligramm
min.	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mMol.	Milimolar
MOT	Motilität
MW	arithmetrischer Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Probendenzahl
NaCl-Lsg.	physiologische Kochsalzlösung
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
NRR90	Non-Return-Rate am Tag 90
p	Signifikanz
PI	Propidiumiodid
PMI	Plasmamembranintakte Spermien
PNA	Peanut-Agglutinin
Prog.	progressiv motile Spermien
PSA	Pisum sativum
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SCSA	Spermachromatinstrukturanalyse
±SD	Standardabweichung
SSC	Side Scatter
STR	Straightness: VSL / VAP

Tab.	Tabelle
u.a.	und andere
u.a.	unter anderem
VAP	Velocity straight line
VCL	Velocity curve line
VSL	Velocity averaged path
z. B.	zum Beispiel
WOB	Wobble: VAP / VCL

1 Einleitung

Für die Gefrierkonservierung von Bullensperma stehen seit Jahren erfolgreich genutzte Technologien zu Verfügung. Trotzdem leiten sich aus der Routinenutzung und aus laufenden Entwicklungsarbeiten immer wieder neue Fragestellungen ab. So besteht durchaus Spielraum für Weiterentwicklungen, z. B. hinsichtlich der Objektivierung und Erhöhung der Effektivität der Beurteilung der Spermaqualität, der Verbesserung des Konservierungserfolges, der Reduzierung der Spermienzahl pro Besamungsportion und der graduellen Veränderungen der Technologie.

Im Rahmen der Spermabeurteilung ermöglichen die computergestützte Spermabeurteilung, „Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)“ und die Durchflusszytometrie eine objektive und standardisierbare Erfassung von Qualitätsparametern der Spermien. Der technische Fortschritt qualifiziert diese Systeme inzwischen auch für den Einsatz auf den Besamungsstationen, wo sie zur Qualitätssicherung und Steigerung der Produktionseffizienz beitragen. Die beiden Systeme ermöglichen es, über eine Fülle von Motilitätsparametern und anderen funktionellen Zelleigenschaften sowie eine Einzel-Zell-Analyse Spermienpopulationen zu erfassen, deren fertilitätsdiagnostisches Potential z. T. noch weitgehend unbekannt ist.

Die eigenen Arbeiten wurden in enger Zusammenarbeit mit einer Besamungsbullenstation durchgeführt. Sie hatten ein sehr anwendungsorientiertes Konzept und verbanden ausgewählte spermatologisch-technologische Fragestellungen mit den Problemen eines stationsspezifischen Managements. Folgende Schwerpunkte wurden bearbeitet:

1. Kontrolle und Verbesserung der Homogenität von Besamungsportionen hinsichtlich der Spermienzahlen und der Spermaqualität
2. Weitere Standardisierung des Temperaturregimes und der Zeitabläufe bei der Spermaaufbereitung von der Phase der Spermaverdünnung bis zur Phase des Einfrierens
3. Testen eines antioxidanzienhaltigen Verdünnerzusatzes zur Verringerung von oxidativem Stress bei der Aufbereitung von gefrierkonserviertem Bullensperma mit hohen Verdünnungsgraden
4. Ermittlung der Zusammenhänge zwischen einem verbreiteten Spektrum spermatologischer Parameter und der Fertilität der Besamungsbullen beim Einsatz von Tiefgefrier-sperma

2 Literaturübersicht

2.1 Technologie der Konservierung von Bullensperma

2.1.1 Gefrierkonservierung von Bullensperma

Die künstliche Besamung hat in den letzten 50 Jahren entscheidend zur Verbesserung und intensiven Nutzung des genetischen Potentials innerhalb der Rinderpopulationen beigetragen. Die sanitären Risiken, die mit dem Natursprung verbunden sind, können durch künstliche Besamung kontrolliert werden (Vishmanath 2003).

Die Technologie der Spermakonservierung im Allgemeinen und im Besonderen die Konservierungstechnologie für Bullensperma wurde bereits vor über 50 Jahren revolutioniert als Glycerol zum ersten Mal als Kryoprotektivum verwendet wurde (Polge et al. 1949). Die Entdeckung des Glycerols als wirksames Kryoprotektivum ermöglichte es Sperma durch Einfrieren für eine längere Periode zu konservieren und erfolgreich für die künstliche Besamung zu nutzen. Die Entwicklung von Techniken des Tiefgerierens bei -196 °C in flüssigem Stickstoff, wobei praktisch alle thermodynamischen Vorgänge unterbrochen sind, ermöglicht eine fast unbegrenzte Lagerung des Spermas. Man geht davon aus, dass Tiefgefriersperma mehrere 1000 Jahre gelagert werden kann, ohne dass die Qualität und die Fertilität drastisch beeinträchtigt werden (Mazur 1980).

Die aktuell angewandte Technologie der Kryokonservierung von Bullensperma wurde über mehrere Jahrzehnte entwickelt und von mehr oder weniger empirisch festgestellten Grundsätzen beeinflusst (Curry 2000, Hammerstedt et al. 1990, Medeiros et al. 2002, Vishwanath 2003, Vishwanath und Shannon 2000, Watson 2000, Woelders und Chaveiro 2004).

Obwohl die grundsätzlichen Bedingungen für die Gefrierkonservierung von Bullensperma immer wieder untersucht und perfektioniert worden sind, werden beim Einfrier- und Auftauvorgang erhebliche Schäden verursacht, so dass Verluste von 30 – 50 % durchaus auftreten können (Vishwanath und Shannon 2000).

Spermagewinnung

Ein Ejakulat muss vollständig, unverändert, nicht verschmutzt und ohne Schädigung des Vartieres gewonnen werden (Götze 1949). Die Durchführung der Samengewinnung vom Bullen wurde u. a. von Wenkoff (1988), Krause (1990), Busch et al. (1991) und Kupferschmied (1993) beschrieben. Zur Absamung von Bullen wird eine künstliche Vagina benutzt. Die ersten Modelle wurden von Milowanow (1934) entwickelt (nach Busch et al. 1991) und wurden seitdem kontinuierlich weiterentwickelt. Die Temperatur der künstlichen Vagina unmittelbar vor der Samengewinnung sowie die verschiedenen Gebrauchsanweisungen wurden in mehreren Veröffentlichungen beschrieben (Anzar et al. 2002, Busch et al. 1991, Kupferschmied 1993, Wenkoff 1988).

Um qualitativ und quantitativ hochwertige Ejakulate zu gewinnen, ist eine sexuelle Stimulation der Bullen durch „Blindsprünge“ und „Rückhalte- bzw. Wartezeiten“ erforderlich (Almquist 1982, Amann und Almquist 1976, Jansen 1984, Lorton et al. 1984). Als „Aufsprungobjekte“ zur Samengewinnung von Bullen eignen sich Aufsprungbullen (Kupferschmied 1993, Püschel 1974) oder Phantome (Püschel 1974).

Medien für die Kryokonservierung

Seit den Anfängen der künstlichen Besamung von Rindern haben sich viele Arbeitsgruppen mit der Entwicklung geeigneter Medien zur Verdünnung und Konservierung von Sperma beschäftigt. Zu den Voraussetzungen, die Verdünnungsmedien erfüllen müssen, zählen: Stabilisierung des pH-Wertes zwischen 6,0 und 7,0, Schutz vor Kälteschock, Erhaltung des osmotischen Drucks von 250 bis 300 mOsm/l, Ernährung der Spermien sowie Hemmung des Keimwachstums (Kupferschmied 1993, Vishwanath und Shannon 2000). Bewährt haben sich so genannte Tris-Verdünner, die auf der Basis von Tris-Puffer und Eidotter oder Milch aufgebaut sind. Entscheidend ist der Gehalt an einem Kryoprotektivum. Trotz vielfältiger Versuche gibt es bislang keine effektive Alternative zum Glycerol.

Seit einigen Jahren versucht man aus verschiedenen Gründen vom Einsatz tierischer Produkte (Eidotter und Milch) als Bestandteil der Verdünner abzurücken. Ein eidotterfreier Verdünner

beinhaltet stattdessen steriles Soja-Lecitin. Auf diese Weise wird die Gefahr einer möglichen mikrobiellen Kontamination durch den Zusatz tierischer Produkte ausgeschlossen.

Hinsch et al. (1997) konnten in vergleichenden Studien an aufgetauten Spermaproben von Split-Ejakulaten zwischen einem eidotterhaltigen und einem eidotterfreien Verdünner keine hoch signifikanten Unterschiede im Anteil lebender Zellen, im akrosomalen Status und in der Motilität feststellen. Auch Herold et al. (2003), Schneider et al. (2002) und Sehner (2005) beobachteten keinen deutlichen Unterschied hinsichtlich Vitalität und akrosomalem Status der Spermien zwischen den beiden Verdünnervarianten.

In einer weiteren Studie vergleichen Thun et al (2002) einen Tris-Eidotter-Verdünner und einen eidotterfreien Verdünner (Biociphos-Plus[®], IMV, Frankreich). Sie fanden signifikant bessere Werte nach dem Auftauen bei allen Laborparametern bei der Tris-Eidotter-Variante. Daraus ging hervor, dass der eidotterhaltige Verdünner einen besseren Schutz der Spermien gewährleistet als der eidotterfreie Verdünner mit Lecithin als Eidotterersatz. Eine Reihe von Autoren berichteten über höhere Spermengeschwindigkeiten bei den eidotterfreien Verdünnern (Aires et al. 2003, Gil et al. 2000, Janett et al. 2005, Nehring und Rothe 2003, Sehner 2005).

Feldversuche mit Split-Ejakulaten ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Non-Return-Rate (NRR) von mit eidotterhaltigem und eidotterfreiem Verdünner verdünnten Spermaportionen (Gil et al. 2000, Hinsch et al. 1997, Hurtado 1998).

Spermaverdünnung

Im eigentlichen Verdünnungsvorgang werden in der Regel ein- oder zweistufige Verdünnungsverfahren angewendet (Kupferschmied 1993). Beim zweistufigen Verdünnungsverfahren enthält die erste Verdünnungsstufe zumeist kein Glycerol. Der „erste“ Verdünner wird bei hoher Temperatur (30 – 37 °C) dem Sperma beigemischt. Nach einer Temperaturabsenkung auf ca. 4 – 5 °C erfolgt die zweite, glycerolhaltige Verdünnungsstufe. Bei dem einstufigen Verfahren wird nur ein glycerolhaltiger Einheitsverdünner verwendet. Beim Vergleich zwischen ein- und zweistufigen Verdünnungsmedien zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen NRR (Schenk et al. 1987). Nach Baracaldo et al. (2007) werden die

zweistufigen Verdünnungsmedien häufiger in Nordamerika und die einstufigen Verdünnungsmedien häufiger in Europa angewandt.

Die Verdünnung des Spermas unmittelbar nach dem Absamen vermeidet die Bildung und Ansammlung der metabolischen Produkte (Foote 1982). Sehner (2005) zeigte, dass bei einer Aufbewahrung des unverdünnten Spermas bei 32 °C über zehn Minuten hinaus mit Vitalitätsverlusten des tiefgefrierkonservierten Spermas zu rechnen ist. Die Erstverdünnung im Anschluss an die Spermagewinnung erfolgt meistens bei einer Verdünnertemperatur zwischen 30 und 37 °C (Vishwanath und Shannon 2000). Kupferschmied (1993) und Sehner (2005) beschrieben eine Temperatur bei der Erstverdünnung von 32 °C und Gil (1999) von 35 °C. In der Regel wird bei der Erstverdünnung eine kleine Menge Verdünner langsam dem Sperma zugegeben. Die Verdünnermenge bei der Erstverdünnung ist stationsspezifisch und kann für alle Ejakulate gleich sein oder variieren, abhängig von der Gesamtspermienzahl pro Ejakulat bis zu 50 % der Gesamtverdünnermenge (Baracaldo et al. 2007). Bei der einstufigen Verdünnung folgt nach einer kurzen Abkühlungsphase bei Raumtemperatur oder im temperierten Wasserbad die Endverdünnung mit der restlichen Verdünnermenge. Bei den zweistufigen Verdünnern wird die Endverdünnung nach einer Abkühlungsphase bei 4 °C vorgenommen.

Abkühlung des verdünnten Spermas

Viele Studien haben sich mit der Gestaltung einer optimalen Abkühlungsrate des verdünnten Spermas beschäftigt. Die Abkühlung des verdünnten Spermas auf 5 °C ist ausschlaggebend für die Spermiovitalität nach dem Auftauen (Mazur 1980, Robbins et al. 1976, Woelders und Malva 1998). Während der Abkühlung des verdünnten Spermas finden insbesondere im Bereich von 15 bis 20 °C temperaturabhängige Membranzstrukturierungsprozesse statt (Hammerstedt et al. 1990). Holt et al. (2005) stellte fest, dass unterhalb von 16 °C die Spermien eine deutlich verringerte Motilität aufweisen. Es ist generell akzeptiert, dass eine langsame Abkühlung des verdünnten Spermas auf 5 °C einen positiven Effekt auf die Spermiovitalität nach dem Auftauen hat (Dhami et al. 1992, Gilbert und Almquist, 1978). Dhami et al. (1992) stellten fest, dass eine langsame Abkühlung über zwei Stunden wichtig für eine gute Spermaqualität nach dem Auftauen ist. Ennen et al. (1976) beobachteten bessere Motilitätswerte nach dem Auftauen nach einer Abkühlung von zwei bis vier Stunden.

Januskauskas et al. (1999) verglichen eine langsame (0,1 °C/Minute) mit einer schnelleren (4,2 °C/Minute) Abkühlung. Die Vitalitätsparameter der Spermien nach dem Auftauen waren zwar besser bei der langsamen Abkühlung, aber nicht signifikant. Trotzdem empfahlen die Autoren eine langsame Abkühlung des verdünnten Spermas. Chaveiro et al. (2006) verglichen drei Abkühlungsraten (0,2, 0,75 und 3 °C/Minuten) und stellten bessere Auftauergebnisse für die Abkühlungsrate von 0,2 °C/Minute fest.

Äquilibrierungsphase

Zwischen Verdünnung und Einfrieren wird das verdünnte Sperma einer so genannten Äquilibrierung bei ca. 4 bis 5 °C unterzogen. Die Literaturangaben bezüglich der Dauer einer Äquilibrierungsphase liegen zwischen zehn Sekunden (Berndtson und Foote 1969) und 18 Stunden (Martin und Emmens 1958). Häufiger wird eine Äquilibrierungsdauer von drei bis sechs Stunden vorgenommen (Brogliatti et al. 2005). Bei der zweistufigen Verdünnung wird in dieser Phase der glycerolhaltige Verdünner zugemischt. Aus diesem Grund wird diese Phase immer wieder irrtümlicherweise als „Glyceroläquilibrierungszeit“ bezeichnet. Das Gefrierschutzmittel Glycerol durchdringt aber bei 4 – 5 °C sehr schnell die Spermienmembran und kann dem Sperma zu jedem Zeitpunkt der Abkühlung beigemischt werden (De Leeuw et al. 1993). Man geht deshalb davon aus, dass es während der Äquilibrierungsphase zu einer Wechselwirkung zwischen Proteinen aus dem Verdünner und der Spermienoberfläche kommt, die dazu führt, dass die Belastungen des Einfrierens und Auftauens besser überstanden werden.

Ennen et al. (1976) verglichen Äquilibrierungsphasen von zwei bis 18 Stunden. Die optimalen Motilitätswerte nach dem Auftauen ergaben sich nach einer Äquilibrierungsdauer zwischen vier und zehn Stunden. Auch Gilbert und Almquist (1978) empfehlen eine Äquilibrierungsdauer von drei bis neun Stunden für die Gefrierkonservierung von Bullensperma. Für Sperma, das mit magermilchhaltigem Verdünner verdünnt war, berichteten Wiggin und Almquist (1975) von einer optimalen Äquilibrierungszeit von zwei bis vier Stunden.

Foote und Kaproth (2002) verglichen bei einem mit vollmilchhaltigem Verdünner verdünnten Sperma eine 4-stündige mit einer 18-stündigen Äquilibrierungsdauer. Die 18-stündige Äquilibrierungsdauer zeigte kleine aber signifikant bessere Auftauwerte als die vierstündige Äquilibrierungsdauer. In weiteren Versuchen fanden die gleichen Autoren keine signifikanten Un-

terschiede hinsichtlich der NRR zwischen den Varianten mit vier bzw. 26 Stunden Äquilibrationdauer.

Muiño et al. (2007) verglichen drei Verdüner, einen eidotterhaltigen und zwei eidotterfreie Verdüner, hinsichtlich der Spermaqualität nach einer Äquilibrationdauer von 18 Stunden miteinander. Sie stellten fest, dass die Qualität des aufgetauten Spermas bei der eidotterhaltigen Verdünnervariante besser war als bei den eidotterfreien Verdünnervarianten.

Konfektionierung des verdünnten Spermas

Das verdünnte Sperma wird vor der Tiefgefrierung in einzelne Besamungsportionen verpackt. Die Konfektionierung bzw. das Abfüllen des verdünnten Spermas geschieht heute fast ausschließlich in speziellen Kunststoffröhrchen, den so gennante Pailletten. Die ursprünglich von Cassou entwickelten „französischen Pailletten“ (IMV. L`Aigle, Frankreich) bestehen aus Polyvinylchlorid und haben an einem Ende einen Baumwollstopfen. In dessen Mitte befindet sich eine Schicht aus Polyvinyl-Alkohol-Puder. Bei Kontakt mit einer Flüssigkeit bzw. mit verdünntem Sperma verfestigt sich der Stoff und verschließt so das Ende der Paillette. Bei der Samenübertragung dient dieser Stopfen als Kolben zum Ausstoß des Spermas. Das zweite Ende wird zusammengepresst und mit Hilfe von Ultraschall verschlossen. Bei einem von Simmet entwickelten System werden beide Enden des Plastikröhrchens durch Glas- oder Metallkugeln versiegelt (MiniTüb, Tiefenbach, Deutschland). Durchgesetzt haben sich die Pailletten mit einem Volumen von 0,25 oder 0,50 Milliliter. Früher wurden Glasampullen und/oder Pellets benutzt. Die Pailletten haben im Gegensatz zu den Glasampullen bzw. den Pellets folgende Vorteile: vergleichbare oder bessere NRR; bessere Lagermöglichkeit; leichtere Kennzeichnung und Identifizierung; vergleichsweise niedriges Kontaminationsrisiko. Die vielfältigen Vorteile der Pailletten haben zu einer vollständigen Verdrängung der Glasampullen und der Pellets geführt (Kupferschmied 1993).

Es werden zunehmend Röhrchentypen verwendet, die einen geringeren Verlust an konfektioniertem Sperma gewährleisten. So wird von der Firma MINITÜB (Tiefenbach, Deutschland) eine feine Paillette mit der Bezeichnung „golden ball[®]“ angeboten. Der Industriestopfen wird hier gänzlich durch einen Kugelverschluss ersetzt. Um die Vorteile des konventionellen Baumwollstopfens im Handling weiter zu nutzen, werden von der Firma IMV (L`Aigle,

Frankreich) eine feine Paillette mit der Bezeichnung „Top Bull Straw[®]“ und von der Firma MINITÜB eine Paillette mit der Bezeichnung „EcoPaillette[®]“ vertrieben. Bei diesem Pailletentyp ist der Baumwollstopfen durch einen baumwollummantelten Plastikstopfen ersetzt. Diese Pailletten gewähren einen um ca. 5 % geringeren Verlust an eingefülltem Sperma.

Die Konfektionierung kann bei Raumtemperatur vor der Äquilibration oder bei 4 °C nach der Äquilibration erfolgen.

Einfrieren des verdünnten Spermas

Das verdünnte und konfektionierte Sperma wird im Stickstoffdampf innerhalb von ca. neun bis zehn Minuten bei -90 bis -110 °C eingefroren, anschließend in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert. Der Einfriervorgang kann in großen Gefäßen im Stickstoffdampf über dem flüssigen Stickstoff oder mit Hilfe von Einfrierautomaten nach einer standardisierten oder programmierten Einfrierkurve erfolgen (Kupferschmied 1993).

Für das erfolgreiche Einfrieren der Bullenspermien ist eine steile und kontrollierte Einfrierkurve nötig um zelluläre Schäden zu minimieren (Kumar et al. 2003). Die optimale Einfriererate liegt für den Bereich + 4 °C bis -10 bzw. -20 °C bei 50 bis 100 °C/Minute (Woelders und Chaveiro 2004, Woelders und Malva 1998). Für den Bereich -20 bis ca. -100 °C wird eine langsame Einfrierkurve von ca. 10 bis 20 °C/Minute verwendet.

Durch Tiefgefrierkonservierung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C wird der Zellstoffwechsel in den Spermienzellen stillgelegt. So ist eine fast unbegrenzte Lagerung ohne Reduzierung der Befruchtungsfähigkeit der Besamungsportionen möglich (Kupferschmied 1993, Mazur 1980).

Auftauen des tiefgefrierkonservierten Bullenspermas

Es ist generell akzeptiert, dass ein schnelles Auftauen des gefrierkonservierten Bullenspermas Vorteile für das Überleben der Spermien hat. Mazur (1980) beobachtete, dass ein schnelles Auftauen die Rekristallisierung der Wassermoleküle vermeidet und somit auch mögliche Zellschäden. Ein anderes Problem bei einem langsamen Auftauvorgang ist der Wechsel im

osmotischen Druck, welcher die Spermien zerstören könnte (Curry und Watson 1994). Es wird ein Auftauvorgang in einem 37 – 38 °C warmen Wasserbad bei ca. 30 Sekunden empfohlen (Kupferschmied 1993).

2.1.2 Flüssigkonservierung von Bullensperma

Die Flüssigkonservierung von Bullensperma ermöglicht – da der Stress des Einfrierens und Auftauens des verdünnten Spermas entfällt – Spermienzahlen/Besamungsportion von zwei bis fünf Millionen, d. h. ca. ein Drittel bis ein Achtel weniger als bei der Gefrierkonservierung (Shannon und Vishwanath 1995). Bedeutsamer Nachteil ist allerdings die auf drei Tage begrenzte Einsatzdauer und der damit verbundene logistische Aufwand des Spermatransportes. Der weltweite Handel mit männlicher Spitzengenetik beim Rind wird nur mit gefrierkonserviertem Bullensperma betrieben. Der Einsatz flüssigkonservierten Bullenspermas stellt deshalb, mit Ausnahmen in Neuseeland und Australien, nur eine ergänzende Variante in der künstlichen Besamung dar. Die Flüssigkonservierung wird dann angewandt, wenn ein sehr hoher Bedarf am Sperma eines Spitzenbullens besteht und die Bedingungen für den Spermatransport günstig sind.

Für die Flüssigkonservierung von Bullensperma entwickelte Shannon in den Jahren 1964 und 1965 den so genannten Caprogen-Verdünner (Shannon 1964). Caprogen[®] ist mit den später eingebrachten Modifikationen heute noch der am häufigsten eingesetzte Verdünner für die Flüssigkonservierung von Bullensperma (Shannon et al. 1984, Shannon und Vishwanath 1995).

Nachdem lange Zeit das flüssigkonservierte Bullensperma bei 5 °C gelagert worden war, fand man heraus, dass auch eine Lagerung zwischen 15 und 24 °C möglich ist. Dafür wurde der Anteil des Eigelbs im Verdünner von 20 % auf 5 % gesenkt (Shannon und Curson 1984).

Die Flüssigkonservierung von Bullensperma kommt heute weltweit am häufigsten in Neuseeland zur Anwendung. Dort werden die Kühe überwiegend saisonal in den Monaten September bis Dezember besamt. In dieser Inseminationsperiode besteht extrem hoher Bedarf an Sperma.

2.2 Spermauntersuchung und –beurteilung

Seit der Einführung der künstlichen Besamung beim Rind wird durch zahlreiche verschiedene Tests versucht, eine Vorhersage für die Eignung zur Konservierung und die Befruchtungsfähigkeit der einzelnen Ejakulate zu treffen. In der Besamungspraxis dienen dabei als Beurteilungsgrundlage Mindestanforderungen, die auf systematisch ermittelten Ergebnissen basieren (Busch et al. 1991, Kupferschmied 1993).

2.2.1 Makroskopische Untersuchungen

Bullensperma soll grauweiß bis elfenbeinfarben, eine rahmige Konsistenz haben und geruchsneutral sein (Busch et al. 1991, Kupferschmied 1993).

Das Volumen eines Ejakulates kann durch Wiegen oder durch direktes Ablesen des graduier- ten Auffangglases bestimmt werden (Kupferschmied 1993). Das Ejakulatsvolumen soll für die Weiterverarbeitung mindestens zwei Milliliter betragen (Busch et al. 1991).

Spermienkonzentration

Die Spermienkonzentration im originären Ejakulat, auch als Dichte bekannt, wird von äußeren Faktoren wie Fütterung, Vorbereitung und Durchführung der Samenentnahme (Busch et al. 1991), sowie genetischen Faktoren (Müller et al. 1971) beeinflusst. Die Mindestanforderung an die Dichte eines Ejakulates soll nach Lague und Greig (1987) bei 300 Millionen pro Milliliter liegen.

Eine exakte Bestimmung der Spermienkonzentration ist Voraussetzung für die Berechnung des Verdünnungsgrades und damit für eine effektive und risikofreie Auslastung von Ejakulaten. Geeignet sind mehrere Methoden. Klassischerweise wird die Spermienkonzentration mittels Zählkammer wie z. B. nach Thoma, Bürker-Türk bestimmt (Busch et al. 1991, Christensen et al. 2005c).

Die Dichte kann jedoch schneller und einfacher mittels Photometer oder Partikelzählgerät bestimmt werden. Ein Photometer misst die Trübung (Lichtabsorption) in einer mit NaCl-Lösung verdünnten Spermaprobe. Der ermittelte Wert wird mit den Werten einer Eichkurve verglichen, die zuvor mittels einer Zählkammer oder eines Partikelzählgerätes bestimmt wurden (Ax et al. 1988). Moderne Photometer verarbeiten das Messergebnis in ihrer Software und weisen den Spermienkonzentrationswert direkt aus.

Das Partikelzählgerät zeichnet sich durch einfache Handhabung, hohe Messgenauigkeit und geringen Zeitaufwand aus (Busch et al. 1991).

Die Untersuchung fluoreszenzfarbstoffmarkierter Spermien mittels Durchflusszytometer („Flow Cytometer“) gilt derzeit als genaueste Methode der Konzentrationsbestimmung der Spermien (Christensen et al. 2004, Evenson et al. 1993b, Hansen et al. 2002). Genau so exakte Ergebnisse erzielt man mit dem Zählgerät NucleoCounter[®] SP-100 (ChemoMetec, Allerød, Dänemark), das auf einem ähnlichen Prinzip wie dem der Durchflusszytometrie beruht. Der NucleoCounter[®] SP-100 arbeitet genau, schnell, benutzerfreundlich und ist gut im Routineablauf einsetzbar (Hansen et al. 2002, Hansen et al. 2006). Diese Autoren bezeichnen die störungsfreie Möglichkeit von Kontrollmessungen in aufgetauten Besamungsportionen als einen weiteren Vorteil des NucleoCounter[®] 's.

Eine weitere Möglichkeit, die Dichte eines Ejakulates zu bestimmen, ist die Nutzung eines computergestützten Spermienanalysesystems (CASA), das gleichzeitig neben der Motilitätsanalyse auch die Spermienkonzentration ermittelt (Hansen et al. 2006).

2.2.2 Mikroskopische Untersuchungen

Motilität

Die mikroskopische Schätzung des Anteils vorwärtsbeweglicher oder motiler Spermien ist das in der Routine am häufigsten verwendete Kriterium zur Spermabeurteilung (Budworth et al. 1987, Den Daas 1992). Das Verfahren der mikroskopischen Schätzung wurde mehrmals beschrieben (Busch et al. 1991, Kupferschmid 1993). Als Mindestanforderungen für ein konservierungstaugliches originäres Ejakulat wurden Werte von 50 % (Lague und Greig

1987), 60 % (Busch et al. 1991), 65 % (Anzar et al. 2002) und 70 % (Kupferschmied 1993) vorgeschlagen. An diesen doch sehr unterschiedlichen Werten zeigen sich die beiden großen Probleme dieses Testes: die subjektiven Einflüsse beim Schätzverfahren und der relativ geringe Vorhersagewert für den Befruchtungserfolg (Rodriguez-Martinez 2003).

Morphologie

Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung der Spermienqualität ist die morphologische Untersuchung. Der Anteil morphologisch veränderter Spermien im Bullensperma ist niedriger als bei anderen Nutztierarten. Sporadisch auftretende morphologische Veränderungen führen, wenn der Prozentsatz abnormaler Spermien 20 % nicht überschreitet, zu keiner verminderten Befruchtungsfähigkeit (Busch et al. 1991). Die morphologische Untersuchung der Spermienproben, die meistens durch visuelle mikroskopische Bewertung im Feuchtpräparat oder nach spezieller Anfärbung der Spermien erfolgt, ist von Busch et al. (1991) und Kupferschmied (1993) genau beschrieben worden.

2.2.3 Qualitätskontrolle und Beurteilung des aufgetauten tiefgefrierkonservierten Bullenspermas

Neben der mikroskopischen Schätzung der Spermienmotilität werden heute nicht nur in der Forschung moderne Methoden angewendet, die eine hohe Objektivität und Genauigkeit gewährleisten. Die Entwicklung der computergestützten Spermienmotilitätsanalyse (CASA) und einer Vielfalt an Fluoreszenzfarbstoffen bietet neue Möglichkeiten, mehr und objektivere Informationen über die Funktionalität von originärem und konserviertem Sperma zu bekommen (Tardif et al. 1997, Thomas et al. 1998).

CASA-System

Um die subjektiven Schätzwerte der Spermienmotilität zu objektivieren und standardisieren, wurde nach einem automatisiertem System gesucht. Die ersten Verfahren fotografierten oder filmten die Spermien. Die aufgenommenen Bilder wurden anschließend vermessen und bewertet (Amann und Katz 2004). Später wurde das mikroskopische Bild mittels Videosystemen aufgezeichnet und mit Computerprogrammen analysiert (Budworth et al. 1987). Systeme, welche eigenständig die sofortige Bildanalyse und Datenbearbeitung vornahmten, waren erstmals im Jahr 1985 kommerziell erhältlich. Schon kurze Zeit später wurde der Nutzen der computergestützten Spermienanalyse zur Identifizierung von Umwelteinflüssen auf die Spermienproduktion und -funktion erkannt (Amann und Katz 2004). Neben dem Prozentsatz gesamt motiler, progressiv motiler und lokal motiler Spermien, werden mit Hilfe des CASA-Systems (computer assisted sperm analysis) auch verschiedene Geschwindigkeitsparameter, wie geradlinige und kurvilineare Geschwindigkeit (velocity straight line VSL, velocity curvilinear VCL) oder die Häufigkeit der Überschreitung der mittleren Bahn (Beat cross frequency BCF) erfasst (Amann und Katz 2004). Trotz starker Automatisierung bleiben die Ergebnisse bis heute von dem Umgang mit den Proben, den Messgeräten und der Programmierung derselben abhängig (Holt et al. 1994).

Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein vollautomatisiertes und hochgradig standardisiertes Messverfahren dar. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, eine große Anzahl fluoreszenzmarkierter Zellen objektiv und schnell auf Einzelzellebene zu untersuchen und in ihrem physiologischen Zustand zu bewerten. Der Vorteil dieser Technik liegt in der Möglichkeit, tausende Zellen innerhalb von Sekunden zu analysieren, in der höheren Sensitivität im Vergleich mit einer mikroskopischen Beurteilung angefärbter Zellen und in der Möglichkeit, verschiedene Zelleigenschaften simultan zu beurteilen (Gillan et al. 2005, Graham 2001, Magistrini et al. 1997). Die Grundlagen der Durchflusszytometrie sind in mehreren Veröffentlichungen beschrieben (Grogan und Collins 1990, Baarz 2006).

Die Durchflusszytometrie wurde zunächst vorwiegend für die Analyse von Blutzellen genutzt (Grogan und Collins 1990). Seitdem Yamada et al. (1974) die erste durchflusszytometrische Untersuchung von Spermienzellen durchführten, wurden viele weitere, auch auf Bullensperma basierende durchflusszytometrische Untersuchungen, veröffentlicht (Chaveiro et al. 2007, Christensen et al. 2005b, Thomas et al. 1998). Die durchflusszytometrische Untersuchung des Spermas spielt eine zunehmende Rolle bei der Qualitätsbeurteilung und bei der Vorhersage der Fertilität des untersuchten Spermas (Alm et al. 2001, Ballachey et al. 1987, Christensen et al. 2005a, 2005b, Gillan et al. 2005)

Durch Kombination von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen können mehrere Zellfunktionen bzw. Zelleigenschaften gleichzeitig beurteilt werden (De Andrade et al. 2007, Ericsson et al. 1993, Garner et al. 1997).

Zur Untersuchung des akrosomalen Status eignet sich für die durchflusszytometrische Messung die FITC-PNA/Propidiumiodid (PI)-Färbung. Das mit Lektinen gekoppelte Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) ist für eine selektive Fluoreszenzmarkierung des Akrosoms sehr gut geeignet (Blottner et al. 1998). Was die Koppelung betrifft, hat sich ein Lektin von *Arachis hypogaea* (Peanut agglutinin, PNA) besonders bewährt. Dieses Lektin bindet sich selektiv an die äußere Akrosomenmembran und emittiert nach Laseranregung aufgrund der FITC-Markierung grünes Licht (Blottner et al. 1998, Cooper und Yeung 1998, Cheng et al. 1996, Gadella et al. 2001). Bei vitalen Spermien ist die Plasmamembran, die über der äußeren Akrosommembran verläuft, für FITC-PNA nicht permeabel (Cheng et al. 1996). Propidiumiodid (PI) ist ein nicht membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff. Eine Kernfärbung der Spermien mit PI gelingt nur bei geschädigter Plasmamembran (Garner et al. 1994, Lichtenstern 1995). Geschädigte Spermien weisen eine Rotfärbung auf. Neben *Arachis hypogaea* Lektin (PNA) kommt auch *Pisum Sativum* Lektin (PSA) zur Anwendung. Dieses Lektin bindet sich an die innere Seite des Akrosoms (De Andrade et al. 2007, Farlin et al. 1992). Nach Nagy et al. (2003) eignet sich die FITC-PNA/PI-Färbung auch für die Untersuchung von tiefgefrierkonserviertem Bullensperma, welches mit einem eidotterhaltigen Verdünner verdünnt wurde.

Evenson et al. (1980) entwickelten den Spermienchromatinstrukturassay (SCSA[®]) zur Erfassung chromatindefekter Spermien. Seitdem wird dieses Verfahren sowohl bei Human- als auch bei Tierspermien angewandt um die Integrität der Spermachromatinstruktur zu beurteilen (Evenson und Jost 1994). Der SCSA[®] beruht auf dem Prinzip, dass abnormal strukturiertes

Chromatin empfindlicher gegenüber einer physikalisch induzierten Denaturierung ist als physiologisches Chromatin (Digrassi 2000). Die Methode wurde von mehreren Autoren genauer beschrieben (Digrassi 2000, Evenson und Jost 1994, Evenson et al. 1991, Evenson et al. 2002).

Zur Aktivitätsbestimmung der Mitochondrien wird eine Färbung mit Rhodamin 123 angewandt (Garner et al. 1997, Thomas und Garner 1994). Rhodamin 123 wird durch die Mitochondrienmembran ins Innere der Mitochondrien transportiert (Ericsson et al. 1993) und dort akkumuliert (Digrassi 2000, Garner et al. 1997, Papaioannou et al. 1997). Voraussetzung dafür sind lebende Zellen mit funktionsfähigen Mitochondrien (Garner et al. 1997, Ericsson et al. 1993). Über das Mitochondrienmembranpotential sagt diese Methode nichts aus.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können auch reaktive Sauerstoffspezien (ROS) nachgewiesen werden, die wegen der Anfälligkeit von Spermien gegenüber einer Lipidperoxidation für deren Funktionalität eine große Rolle spielen. Ostrovidov et al. (2000) berichteten über den Nachweis von ROS mit Hilfe der Dihydrorhodamin 123 (DHR)- und Dichlorofluoreszin (DCFH)-Färbung bei lebenden Mäusezellen. DHR zeigte eine höhere Sensitivität gegenüber Superoxidanionen und DCFH gegenüber Peroxiden. Die DHR und DCFH sind membranpermeabel und fluoreszieren erst bei Oxidierung durch die in der Zelle vorhandene ROS (Halliwell und Whiteman 2004). Nach Ohashi et al. (2002) hat DHR eine höhere Sensitivität beim Nachweis von ROS als DCFH.

Zur Bestimmung der Lipidperoxidation wurde die durchflusszytometrische Messung nach C11-Bodipy^{581/591} (Bodipy)/PI-Färbung angewandt (Almeida und Ball 2005, Ball und Vo 2002, Brouwers und Gadella 2003, Brouwers et al. 2005, Drummen et al. 2004). Bodipy ist eine Fettsäure, die in die meisten Zellmembranen eindringt und durch Oxidation das Spektrum ihres emittierten Fluoreszenzlichtes vom roten in den grünen Bereich verlagert (Halliwell und Whiteman 2004, Drummen et al. 2004).

2.3 Zusatz von Antioxidanzien zur Verringerung von oxidativem Stress

Der Begriff „oxidativer Stress“ bezeichnet eine gestörte oxidative/antioxidative Balance in Richtung Peroxidation (Sies 1993). Die Lipidperoxidation wurde als eine der ersten Folgen oxidativer Reaktionen in der Zellpathologie erkannt. Sie stellt ein wichtiges Phänomen eines unkontrollierten oxidativen Stresses dar. Der oxidative Stress bzw. die Lipidperoxidation wird durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) induziert (Frankel 1987). ROS sind hoch reaktive oxidierende Verbindungen, die in die chemische Klasse der freien Radikale eingeordnet werden (Aitken und Fisher 1994).

Wie alle lebenden Zellen mit aerobem Stoffwechsel können auch Spermien ROS produzieren (Aitken und Clarkson 1987, Ball et al. 2001b, Bilodeau et al. 2000, O'Flaherty et al. 1999, Rivlin et al. 2004, Sreejith et al. 2006). Unter physiologischen Bedingungen werden am meistens ROS während der Reaktionen der Atmungskette in den Mitochondrien gebildet. Die ROS spielen eine physiologische Rolle bei der Spermienkapazitation und der Akrosomreaktion (De Lamirande und Gagnon 1993, De Lamirande et al. 1997, Griveau et al. 1995, O'Flaherty et al. 1999, 2003, Rivlin et al. 2004, Sreejith et al. 2006). Auf der anderen Seite hat eine Vermehrung der ROS bei geschädigten Spermien (Ball et al. 2001b) oder nach einer Kontaminierung mit Leukozyten (Aitken und West 1990, Baumber et al. 2000) einen schädlichen Effekt auf die Spermienfunktion. Vor allem wird durch die Wirkung der ROS die Motilität und Viabilität der Spermien beeinträchtigt (Armstrong et al. 1999, Baumber et al. 2000, 2003, Bilodeau et al. 2000, Brouwers und Gadella 2003, De Lamirande und Gagnon 1992).

Spermien sind gegenüber ROS-Aktivität besonders empfindlich, weil sie eine hohe Konzentration an ungesättigten Fettsäuren haben (Storey 1997). Als Folge der Lipidperoxidation verliert die Spermienmembran ihre Fluidität und Integrität und so wird die Befruchtungsfähigkeit der Spermien beeinträchtigt (Storey 1997). In der Humanandrologie geht man davon aus, dass die ROS eine große Rolle bei der männlichen Infertilität spielt (Aitken 1995, Iwasaki und Gagnon 1992, Koca et al. 2003).

Neben Membranschäden kann der oxidative Stress auch Schäden an der DNA verursachen (Aitken et al. 1998, Baumber et al. 2003, Twigg et al. 1998).

Das Seminalplasma enthält verschiedene Antioxidanzien, die den ROS entgegenwirken. Die wichtigsten antioxidativen Systeme sind die Enzyme Superoxiddismutase (Aitken et al. 1996,

Alvarez et al. 1987, Nissen und Kreysel 1983), Catalase (Jeulin et al. 1989) und Glutation-Peroxidase/Reduktase (Alvarez und Storey 1989). Weiterhin gibt es eine Reihe von anderen chemischen Verbindungen, die Superoxiddismutase- (SOD) und Catalase-ähnliche Aktivitäten haben. So sind z. B. α -Tocopherol, Ascorbinsäure, Glutathion, Pyruvat (De Lamirande und Gagnon 1992), Taurin oder Hypotaurin und Albumin (Alvarez und Storey 1983).

Intrazelluläre Antioxidanzien können die Zellmembran, die das Akrosom und den Spermenschwanz umgibt, nicht schützen, was die Zelle zwingt sich ganz auf die antioxidativen Eigenschaften des Seminalplasmas zu verlassen (Iwasaki und Gagnon 1992).

Während der Verarbeitung des Spermas wird das Seminalplasma verdünnt und so die antioxidative Protektion drastisch reduziert. Bullenspermien sind nach Bilodeau et al. (2000) ohne den Schutz von Seminalplasma mit wenigen natürlichen Antioxidanzien ausgestattet. Durch die Gefrierkonservierung des Spermas steigen die ROS-Bildung und zugleich auch die Spermenschäden an (Ball et al. 2001a, Ball und Vo 2002, Bilodeau et al. 2000, Brouwers und Gadella 2003, Chatterjee und Gagnon 2001, Morani et al. 2004, Neild et al. 2005). Der Kryokonservierungsvorgang reduziert deutlich die Aktivität der Superoxiddismutase und des Glutathion (Bilodeau et al. 2000).

Aus diesen Gründen werden seit längerem im Rahmen der Konservierung von Bullensperma mit der Zufuhr von Antioxidanzien von außen Versuche durchgeführt, um den Verlust an antioxidativer Kapazität auszugleichen. Die am meisten eingesetzten Antioxidanzien sind die, welche die ROS-Bildungskaskade unterbrechen können. Dies kann durch den Einsatz von α -Tocopherol, Ascorbinsäure oder Thiole geschehen (Bilodeau et al 2001, Sehner 2005).

Durch den Zusatz von verschiedenen Thiolen bei aufgetautem Bullensperma konnte während einer sechsstündigen Inkubation bei 38,5 °C eine hohe Motilitätsrate aufrechterhalten werden (Bilodeau et al 2001). Der Zusatz von Antioxidanzien konnte die Wirkung des durch Wasserstoffperoxyd (H_2O_2) induzierten oxidativen Stresses vermindern (Bilodeau et al 2001).

In weiteren Versuchen konnten Bilodeau et al. (2002) zeigen, dass ein eidotterhaltiger Verdüner im Vergleich zum Referenzmedium Tyrode einen signifikant geringeren Schutz gegen oxidativen Stress bietet. Ein Zusatz von 5 U/ml Catalase reichte aus, um den Motilitätsverlust durch induzierten oxidativen Stress zu beseitigen. Dabei zeigte Catalase aus dem Eileiter eine bessere Wirkung als Catalase aus der Leber (Bilodeau et al. 2002).

Borges et al. (2004) kamen zu dem Ergebnis, dass der Zusatz von Vitamin E und Vitamin C zum Verdünner die Motilität der Spermien gleich nach dem Auftauen nicht signifikant verbessert. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsvariante Vitamin E + C traten erst nach einer 120-minütigen Inkubationszeit ein (Borges et al. 2004).

Foote et al. (2002) untersuchten in einer größeren Studie über 250 Kombinationen von verschiedenen Antioxidanzien und Konzentrationen von Antioxidanzien als Zusatz zum Frischsperma und zum gefrierkonserviertem Sperma. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass der Zusatz von Antioxidanzien eine Verbesserung der Spermienmotilität bringt. Auf die Fertilität des Bullenspermas hatten die Antioxidanzien keinen Einfluss. Da der Vollmilchverdünner eine große Menge Kasein beinhaltet, die als Antioxidanz gilt, wird der Zusatz von Antioxidanzien nur bei eidotterhaltigen Verdünnern empfohlen (Foote et al. 2002).

Gérard et al. (2006) testeten 36 Substanzen mit einem antioxidativem Wirkungsspektrum. Davon zeigten vier eine schützende Wirkung gegen Hydrogenperoxid. Diese vier Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen bei frisch- und gefrierkonserviertem Bullensperma getestet. Durch Zusatz von Antioxidanzien konnten die Motilitätswerte der Spermien nach vier Tagen bei Frischsperma bzw. nach dem Auftauen bei gefrierkonserviertem Sperma verbessert werden. Vor allem wurde die Geschwindigkeit der Spermien deutlich erhöht (Gérard et al. 2006). Im Feldversuch der gleichen Autoren wurden die Ergebnisse der Non-Return-Rate (NRR) des Frischspermas durch Zusatz von Antioxidanzien signifikant verbessert. Bei gefrierkonserviertem Sperma wurde durch Zusatz von Antioxidanzien die NRR bei zwei von fünf Bullen verbessert, bei einem blieb sie gleich und bei zwei Bullen verschlechterte sie sich (Gérard et al. 2006). Auf der Basis dieses Versuches wurde das Produkt Oxyfree[®] - Premix von der Firma IMV (L'Agde, Frankreich) entwickelt. Vergleichbare Ergebnisse präsentierte die gleiche Arbeitsgruppe (Gérard et al. 2007) ein Jahr später unter Verwendung des Oxyfree[®] - Premix.

Der Zusatz von Antioxidanzien wurde unter anderem auch bei Pferde- (Almeida und Ball 2005, Ball et al. 2001a, Baumber et al. 2005), Schafbock- (Santiani et al. 2004, Stefanov et al. 2004), Eber- (Breininger et al. 2005) und Hundesperma (Michael et al. 2007) angewandt.

2.4 Zusammenhänge zwischen den spermatologischen Parametern und der Fertilität

Routinemäßige Laboruntersuchungen des Spermas beinhalten im Allgemeinen die subjektive Schätzung der Spermienmotilität und die Ermittlung der Spermienkonzentration. Häufig findet auch noch der Anteil morphologisch normaler Spermien Beachtung. Diese Parameter sind nicht nur für eine Vorhersage der Fertilität, sondern auch für die Identifizierung subfertiler Ejakulate (Christensen et al. 1999, Gadea et al. 2004) ungenau und unzureichend. Diese Untersuchungen müssten mindestens am eingesetzten Besamungssperma vorgenommen werden und haben nur eine limitierte Aussagekraft über die wirkliche Fertilität des Spermas (Rodriguez-Martinez 2003). In den letzten Jahren kommen immer häufiger neue Methoden zum Einsatz, mit denen das Sperma objektiver und genauer untersucht werden kann. Dazu gehören z. B. die computergestützte Motilitätsanalyse (Davis und Katz 1992, Holt et al. 1994) oder die Durchflusszytometrie (Ericsson et al. 1989, Garner et al. 1994, 1997, Januskauskas et al. 2001). Mit Hilfe dieser neuen Methoden wird ein breites Spektrum funktioneller Parameter der Spermien untersucht und nach möglichen Zusammenhängen zur Fertilität gesucht. Solche sind z. B. die Viabilität der Spermien (Alm et al. 2001), der akrosomale Status (Blottner et al. 1998) und der DNA-Status (Ballachey et al. 1987, Januskauskas et al. 2001).

Die Bemühungen, anhand von spermatologischen Parametern Rückschlüsse auf die Fruchtbarkeit eines Vartieres zu ziehen, sind zahlreich. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen stehen z. T. im deutlichen Widerspruch zueinander (Baltissen 2007).

Korrelationen zwischen Parametern der Spermienmotilität und der Fertilität *in vivo* wurden in vielen Untersuchungen bestimmt, entweder subjektiv durch Schätzung des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien oder objektiv mit Hilfe des CASA-Systems. Die Ergebnisse variieren jedoch sehr stark. Die subjektiv geschätzte Spermienmotilität zeigte nicht immer eine signifikante Korrelation zu der Fertilität (Amann 1989, Söderquist et al. 1991). Dagegen fanden andere Autoren signifikante Zusammenhänge zwischen den beiden Parametern (Kjaestadt et al. 1993, Januskauskas et al. 2002, 2003). Zwischen der Motilität der Spermien, die mit dem CASA-System erfasst wurden, und den Befruchtungsergebnissen wurden von einigen Autoren auch signifikante Zusammenhänge gefunden (Baltissen 2007, Budworth et al. 1987, Farrell et al. 1998, Gillan et al. 2008, Januskauskas et al. 2001, 2003, Padrik und Jaakma 2004). Einige Autoren fanden Zusammenhänge zwischen der Fertilität und speziellen Parametern der Motilität, die nur mit Hilfe des CASA-Systems erfasst wurden. Diese sind die Linearität der

Spermienbewegung (Linearity) und verschiedene Spermengeschwindigkeiten wie Velocity average path (VAP) oder Velocity straight line (VSL) (Gillan et al. 2008, Farrell et al. 1998, Hallap et al. 2004). Höhere Zusammenhänge und eine bessere Vorhersage der Fertilität wurden durch Kombination von mehreren Parametern des CASA-Systems (Farrell et al. 1998) oder von Motilitätsparametern und anderen Qualitätsparametern der Spermien erreicht (Januskauskas et al. 2001). Eine Reihe von anderen Autoren fand dagegen keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Motilitätsparametern der Spermien und der Fertilität (Brandt 1999, Graham 1994, Volz 1990).

Ein anderer Parameter, der einen Zusammenhang zur Fertilität des Bullenspermas zeigte, ist die Plasmamembranintegrität der Spermien (Ericsson et al. 1993, Januskauskas et al. 2001, 2003, Kasimanickam et al. 2006). Baarz (2006) und Bollwein et al. (2004) fanden dagegen keine bedeutsamen Zusammenhänge zwischen der Plasmamembranintegrität der Spermien und der Fertilität.

Gill et al. (2000) und Thundathil et al. (1999) berichteten über niedrige, aber signifikante Zusammenhänge von nicht akrosomkapazitierten Spermien zu der Fertilität des untersuchten Bullenspermas. Dagegen konnten weder Cumming (1995) noch Brahmkshtri et al. (1999) eine signifikante Korrelation des Anteils akrosomintakter Spermien mit der Fertilität feststellen.

Die durchflusszytometrische Beurteilung der Chromatinstuktur der Spermien (SCSA[®]) war auch einer der Parameter, der mit der Fertilität korreliert (Ballachey et al. 1987, Evenson et al. 1994, Januskauskas et al. 2001, 2003, Kasimanickam et al. 2006). Andere Autoren wie Hallap et al. (2005) und Madrid-Burya et al. (2005) fanden dagegen keine direkten Zusammenhänge zwischen diesen Parametern.

Verschiedene Autoren (Graham 2001, Rodriguez-Martinez 2003) stellten fest, dass die Überprüfung nur eines Parameters zur präzisen Beurteilung der Fertilität von Sperma nicht ausreicht. Deshalb versuchten viele Autoren mehrere spermatologische Parameter zu kombinieren und mit Hilfe einer multilinenen Regressionsanalyse größere Zusammenhänge zu der Fertilität des Spermas festzustellen und eine bessere Vorhersage der Fertilität des untersuchten Spermas zu erreichen.

Zusammenfassend konnte in den angeführten Studien gezeigt werden, dass einzelne spermatologische Parameter unterschiedlich hoch mit der NRR korrelieren. Die Motilität stellt dabei

das am häufigsten untersuchte Merkmal dar. Seit der Einführung der CASA-Geräte wurden auch zunehmend weitere kinetische Parameter Bestandteil der Untersuchungen. Auch durchflusszytometrische Untersuchungen werden immer häufiger bei der Beurteilung des Spermas angewandt. Der Aufbau der einzelnen Arbeiten unterschied sich zum Teil sehr deutlich.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Versuchssperma

Zur Gewinnung des Versuchsspermas standen insgesamt 15 Bullen des Besamungsvereins Neustadt a. d. Aisch e.V. (BVN) zur Verfügung. Es handelte sich um geprüfte und ungeprüfte Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh und Deutsches Gelbvieh im Alter zwischen 2 und 11 Jahren. Die Bullen wurden unter einheitlichen, den spezifischen Anforderungen der Besamungsbullenstation entsprechenden Bedingungen gehalten und gefüttert. Die Tiere zeigten ein ungestörtes Allgemeinbefinden und wiesen keine Sexualstörungen oder Erkrankungen der Geschlechtsorgane auf.

Die Bullen wurden zwei bis dreimal pro Woche zur Spermagewinnung herangezogen. Der Samementnahmerhythmus war bullenabhängig. Er wurde von der Laborleiterin und dem Abteilungsleiter Tiergesundheitsdienst unter Berücksichtigung individueller Eigenheiten und des Spermabedarfs bestimmt.

Die Besamungsversuche wurden nur mit Besamungsdosen von zuchtwertgeprüften Bullen durchgeführt.

3.2 Grundsätzliche technologische Abläufe der Gefrierkonservierung von Bullensperma in der Besamungsbullenstation Neustadt a. d. Aisch

3.2.1 Spermagewinnung

Aus hygienischen und sicherheitstechnischen Gründen wurde die Spermagewinnung im sogenannten Sprungraum durchgeführt. Für den Aufsprung standen Unterstellbullen oder ein Phantom zur Verfügung. Die Spermagewinnung wurde nach mehreren „Blindsprüngen“ durchgeführt.

Für die Spermagewinnung wurde eine künstliche Vagina (KV), Modell „Neustadt/Aisch“ (Müller, Nürnberg, Deutschland) eingesetzt. Die KV wurden in einem Vaginenraum aufbewahrt, gewaschen, sterilisiert und vor der Nutzung in einem Brutschrank auf 40-42 °C vorgewärmt. Die Innentemperatur der KV wurde mit auf 42 °C erhitztem Wasser gewährleistet. Um die Stimulation zu optimieren, wurde zusätzlich Luft über ein Ventil in die künstliche Scheide eingeblasen. Die Öffnung und etwa das erste Drittel der inneren Wand der Vagina wurden mittels Vaseline gleitfähig gemacht.

Das Spermium wurde in einem Einwegkunststoffröhrchen (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) aufgefangen, welches an der KV befestigt war und in einem Schutzmantel steckte. Nach der Spermagewinnung wurde das Röhrchen von der KV gelöst und in ein auf 32 °C eingestelltes Temperiergerät (Kugelbad, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) gestellt.

Die eindeutige Identifikation des Ejakulats bzw. des verdünnten und portionierten Spermas wurde von dessen Gewinnung bis zur Lagerung durch eine individuelle Sprungkarte gewährleistet, die auch zur Dokumentation der zeitlichen Abläufe diente.

3.2.2 Spermabeurteilung

Im Anschluss an die Samengewinnung erfolgte die Spermabeurteilung der gewonnenen Ejakulate. Zunächst wurden visuell die Farbe, Konsistenz und Beimengungen bestimmt. Weiterverarbeitet wurden nur die Ejakulate, die frei von Schmutz, Harn oder Blut waren.

Das Ejakulatvolumen wurde mit einer Laborwaage (Typ Kern 527, Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) bestimmt. Zur Vereinfachung wurde davon ausgegangen, dass die durchschnittliche Dichte von Bullensperma 1,0 g/cm³ beträgt.

Der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im originären Sperma wurde durch die subjektive Schätzung des erfahrenen Laborpersonals ermittelt. Dafür fand ein Mikroskop mit beheizbarem Objektträgertisch und mit positivem Phasenkontrast (Dialux 20, Leitz, Wetzlar, Deutschland) bei einer Gesamtvergrößerung von 390 Verwendung. Für die Beurteilung wurden zwei kleine Tropfen des Ejakulates auf einen vorgewärmten Objektträger (37 °C) mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgebracht und mit je

einem Deckgläschen (18 x 18 mm) abgedeckelt. Ejakulate mit Schätzwerten unter 60 % wurden nicht weiterverarbeitet.

Bei einigen Versuchen wurde die Spermienmotilität in originärem Sperma auch mit Hilfe der computergestützten Motilitätsanalyse (CASA) untersucht. Dazu wurde das Messsystem SpermVision[®] (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland, siehe Pkt. 3.4.4) verwendet.

Die Spermienkonzentration der Ejakulate wurde mit Hilfe eines Photometers (SMD 5, Programm 4, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) bestimmt und in Milliarden pro Milliliter angegeben. Das Sperma wurde dazu mit 0,9 %iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:100 in den Einwegküvetten des Photometers verdünnt. Um Messfehler zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass die Außenseite der Pipettenspitze der verwendeten Eppendorf-Pipette mit einem Einweg-Reinigungstuch sorgfältig gesäubert wurde.

3.2.3 Spermaverdünnung und -gefrierkonservierung

Für die Verdünnung der Ejakulate wurden je nach Versuchsvariante der eidotterhaltige Verdüner Triladyl[®] (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) oder der eidotterfreie Verdüner BioX-cell[®] (IMV, L'Aigle, Frankreich) herangezogen. Die Verdünnung des Spermas erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die untersuchten Ejakulate bzw. Teilejakulate (falls Split-Sample-Verfahren) in einer Verdünnungsflasche mit 20 ml (konstante Verdünnermenge) auf 32 °C vorgewärmtem Verdüner vorverdünnt. Anschließend wurde diese Flasche in ein 23 °C warmes Wasserbad umgesetzt. Zwanzig Minuten nach der Spermagewinnung erfolgte bei 23 °C die Endverdünnung auf die gewünschte Spermienkonzentration. Die noch erforderliche Verdünnermenge wurde einem Verdünnervorratsgefäß, das auf 23 °C temperiert war, entnommen, in einem Standzylinder abgemessen und langsam in die Verdünnungsflasche gegeben. Das nun ausverdünnte Sperma wurde in der verschlossenen Verdünnungsflasche durch dreifaches vorsichtiges Schwenken (180 °) gemischt und zur Äquilibration in das Kühlkabinett verbracht.

Die Äquilibrationszeit betrug mindestens 3,5 Stunden. Innerhalb dieser Zeit kühlte das verdünnte Sperma von 23 °C auf 4 °C ab. Für einzelne Versuche wurde je nach Versuchsschema die Äquilibrationszeit verkürzt oder verlängert.

Nach der Äquilibrierungsphase fanden das Abfüllen (Konfektionieren) des verdünnten Spermias in Pailletten (Typ Mini Paillette, Einheit 0,25 ml, IMV, L`Aigle, Frankreich) und die Kennzeichnung (Bedrucken) der Pailletten statt. Das Abfüllen der Besamungsportionen erfolgte mit der auf 4 °C temperierten und im Kühlkabinett stehenden Abfüllmaschine MRS 3 (IMV, L`Aigle, Frankreich) mit integriertem Inkjet-Drucker Domino A200 (Domino, Mainz-Kastel, Deutschland). Nach dem Abfüllen wurden die Pailletten auf Rampen aufgelegt und visuell kontrolliert. Das Einfrieren der Besamungsportionen erfolgte im Stickstoffdampf bei -95 °C für 8 Minuten. Dazu wurden Einfriergeräte der Firma Nifa (Holland) verwendet, welche mit einer konstanten Einfriertemperatur arbeiten. Die Einfriergeräte wurden mit acht Rampen beschickt. Danach wurden die Pailletten ejakulatsweise in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196 °C in einem Biocontainer gelagert. Das gefrierkonservierte Sperma wurde zur Vermeidung seuchenhygienischer Risiken einer Quarantäne von 30 Tagen unterzogen und primär im sogenannten Quarantänecontainer gelagert. Am Ende der Quarantänezeit wurde das Sperma in die regulären Depot-Container umgelagert und später an die Außenstellen zur Besamung versandt.

3.3 Versuchsansätze

Die eigenen Studien gliederten sich in die vier nachfolgend aufgeführten Abschnitte:

- Analyse der Homogenität von Besamungsportionen eines Ejakulats aus der Routineproduktion hinsichtlich Spermienzahl und Spermaqualität
- Beobachtung variierender Temperatur- und Zeitregime bei der Spermaaufbereitung
- Untersuchung eines Antioxidanzienzusatzes bei der Spermakonservierung
- Experiment zur Fertilitätsprognose für gefrierkonservierte Bullenspermien

3.3.1 Untersuchung der Homogenität von Besamungsportionen gleicher Ejakulate hinsichtlich Spermienzahl und Spermaqualität

3.3.1.1 Vorversuch zum Sedimentationsverhalten von Bullenspermien im verdünnten Sperma

Im Rahmen eines Vorversuchs wurde zur Charakterisierung des Sedimentationsverhaltens von Bullenspermien in den verschiedenen Phasen der Spermaaufbereitung folgende Verfahrensweise gewählt:

- Das Bullensperma wurde entsprechend der in der BBS Neustadt a. d. Aisch üblichen Verfahrensweise für die Gefrierkonservierung aufbereitet (siehe Pkt. 3.2). Diese Verfahrensweise beinhaltet u. a. die Konfektionierung des verdünnten Spermas erst nach der Äquilibration. Damit steht bis zu dieser Phase der Spermaaufbereitung eine relativ große Menge verdünnten Spermas zur Verfügung. Die Äquilibration erfolgt über 160 Minuten bei 4 °C. Dies ist insbesondere der Zeitraum, in dem die immobilisierten Spermien sedimentieren können.
- Als Konservierungsmedium wurde in der ersten Versuchsserie der eidotterhaltige Verdünner Triladyl[®] und in der zweiten Versuchsserie der eidotterfreie Verdünner BioXcell[®] verwendet. Das Sperma wurde zweistufig so verdünnt, dass 14 Mio. Gesamtspermien/Paillette resultierten. Die Spermaaufbereitung erfolgte jedoch nur bis zum Ende der Äquilibrationsphase. In beide Versuchsserien wurden jeweils fünf Ejakulate einbezogen, die von drei Fleckviehbullen stammten.
- Für die Spermaaufbereitung wurde das originäre Sperma geteilt. Bei Teil I erfolgte das Vermischen nach Zugabe des Verdünners bzw. nach der Äquilibration durch fünfmaliges Schwenken eines verschlossenen Verdünnungsglases. Bei Teil II wurde das Durchmischen mittels Magnetrührer (Speedsafe[®], VWR, Darmstadt, Deutschland) (fünfminütiges Rühren) durchgeführt.
- Bei der Spermaaufbereitung wurden für die Endverdünnung und die Äquilibration Messzylinder (50 ml) als Verdünnungsgläser verwendet, die aufgrund ihres Durchmessers eine Befüllhöhe ermöglichten, die der in den üblichen Verdünnungsgläsern

für die Vorverdünnung entsprach. Nach der Vorverdünnung wurde das Sperma umgeschüttet.

- Aufgrund der vergleichbaren Befüllhöhe war es möglich, mit Hilfe einer markierten Paillette und angeschlossener Spritze aus dem oberen, mittleren und unteren Bereich der Verdünnungsgläser („Sedimentations-Messzylinder“) definierte Proben zur Spermienkonzentrationsbestimmung zu entnehmen.
- Die Probenentnahme erfolgte in folgenden Phasen der Spermaaufbereitung:
 - Vorverdünnung, unvermischt, ca. 15 min. bei 23 °C
 - Endverdünnung, vermischt bei 23 °C
 - Äquilibrierung über 160 min. bei 4 °C, ohne Mischung
 - Äquilibrierung über 160 min. bei 4 °C, mit Mischung
- In der Triladyl[®]-Variante wurde die Spermienkonzentration mittels Zählkammer ausgezählt. In der BioXcell[®]-Variante, bei welcher keine störenden Eidotterpartikel vorhanden waren, erfolgte eine indirekte Bestimmung mittels photometrischer Messung. Bei dieser Messung wurde nur der Extinktionswert registriert.

3.3.1.2 Versuch 1 - Einfluss von Konfektionierungsablauf, Verdünner und Verdünnungsgrad

Zielstellung des Versuchs 1 war die Kontrolle der Spermienzahlen pro Paillette und der Spermaqualität in Pailletten aus dem Routineablauf der Spermaproduktion. Dazu wurden in zwei Versuchsserien je 10 Ejakulate von fünf Fleckviehbullen und einem Gelbviehbullen einbezogen.

Von den Ejakulaten wurden zu folgenden Zeiten während der Konfektionierung je 15 Pailletten entnommen und getrennt gelagert sowie untersucht:

- am Anfang der Konfektionierung
- nach ca. einem Drittel der Konfektionierung
- nach ca. zwei Dritteln der Konfektionierung

- am Ende der Konfektionierung

Weiterhin waren folgende Varianten in den Versuch einbezogen:

- Verwendung des eidotterhaltigen Verdünners Triladyl[®] (Versuchsserie 1) und des eidotterfreien Verdünners BioXcell[®] (Versuchsserie 2)
- Anwendung von zwei Verdünnungsgraden in jeder Versuchsserie, so dass 14 und 7 Mio. Spermien pro Paillette resultierten

Die Spermaproduktion erfolgte unter den Routinebedingungen der BBS Neustadt a. d. Aisch (siehe Pkt 3.2). Nach der üblichen Untersuchung des originären Spermias wurde jedes Ejakulat geteilt und mit dem Verdünnern der jeweiligen Versuchsserie vorverdünnt. Die zweistufige Verdünnung ergab bei einer Hälfte 14 Mio. Gesamtspermien pro Paillette, die andere Hälfte enthielt 7 Mio. Gesamtspermien pro Paillette. Die Konfektionierung des verdünnten Spermias wurde nach einer Äquilibrierungszeit von ca. vier Stunden bei 4 °C durchgeführt. Pro Variante wurden mindestens 300 Pailletten konfektioniert. Dabei erfolgte entsprechend des oben angeführten Schemas die Absonderung von Pailletten, die dann separiert eingefroren wurden. Das Einfrieren erfolgte mit allen anderen Chargen des Ejakulats.

Für die Laboruntersuchungen wurden jeweils drei Pailletten pro Variante in einem Wasserbad bei 38 °C für zehn Sekunden aufgetaut. Die Pailletteninhalte wurden vereinigt, gemischt und bei 37 °C inkubiert.

Die gleiche Vorgehensweise beim Auftauen wurde für alle weiteren Versuche übernommen.

Es wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Ermittlung der Spermienkonzentration in aufgetautem Sperma mittels Zählkammer Thoma[®] neu (siehe Pkt. 3.4.1)
- Computergestützte Motilitätsanalyse, 30 und 120 Minuten nach dem Auftauen (siehe Pkt. 3.4.4)
- Ermittlung des Prozentsatzes lebender Spermien mit aktiven Mitochondrien, 30 Minuten nach dem Auftauen mittels durchflusszytometrischer Messung (PAS, Partec, Münster, Deutschland) nach Anfärbung der Spermien mit Rhodamin/Propidiumiodid (siehe Pkt. 3.4.5.2)

3.3.2 Untersuchungen zum Temperaturregime und zu den Zeitabläufen bei der Spermamaufbereitung von der Phase der Spermaverdünnung bis zur Phase des Einfrierens

In diesem Abschnitt wurden die Einflüsse verschiedener Temperaturregime von der Verdünnung des Spermas bis zum Einfrieren, verschiedener Konfektionierungsregime und der Äquilibrierungsdauer auf die Spermaqualität nach dem Auftauen untersucht. Dafür wurde das Sperma von vier Fleckviehbullen, zwei mit (empirisch festgestellten) guten Einfriereeigenschaften und zwei mit schlechten Einfriereeigenschaften, untersucht. Von jedem Bullen wurden zwischen vier und fünf Ejakulate verwendet.

Das Sperma wurde für alle Versuche dieses Abschnittes unter Routinebedingungen mit dem eidotterhaltigen Verdüner Triladyl[®] auf eine Endkonzentration von 12×10^6 Gesamtspermienzahl pro Paillette verdünnt.

Das Untersuchungsmaterial wurde hinsichtlich der Spermienmotilität mittels CASA-System SpermVision[®] 30 und 120 Minuten nach dem Auftauen (siehe Pkt. 3.4.4) untersucht.

Für den Versuch 4 wurden folgende weitere Untersuchungen durchgeführt:

- Spermienmotilität im Rahmen eines Thermoresistenztests bei 37 °C über einen Zeitraum von drei Stunden (siehe Pkt. 3.4.3)
- Akrosomstatus, durchflusszytometrische Messung (Epics XL[®], Beckmann-Coulter, Krefeld, Deutschland) mittels FITC/PNA/PI – Färbung (siehe Pkt. 3.4.5.1)
- Mitochondriale Aktivität der Spermien, Rhodamin/Propidiumiodid – Färbung, durchflusszytometrische Messung (PAS, Partec, Münster, Deutschland) (siehe Pkt. 3.4.5.2)

Die Temperaturverläufe wurden Variantenweise auch für die Versuche 2 und 3 erfasst (Druckermeßgerät Almemo[®] V₅, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland).

3.3.2.1 Versuch 2 - Einfluss von unterschiedlichen Bedingungen bei der Zweitverdünnung auf die Spermaqualität

Im Versuch 2 wurde untersucht, welchen Einfluss die Temperatur bei der Zweitverdünnung des Spermas auf die Vitalität der Spermien nach dem Auftauen hat. Jedes Ejakulat wurde in drei Teile geteilt und wie folgt aufbereitet:

- Variante A (BVN – Standard, siehe Pkt 3.2)

Nach der Erstverdünnung bei 32 °C wurde das primärverdünnte Sperma 15 Minuten bei 23 °C gehalten, dann erfolgte die Zweitverdünnung bei 23 °C. Das verdünnte Sperma wurde insgesamt 210 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgten die Konfektionierung des Spermas bei 4 °C und das Einfrieren in Stickstoffdampf.

- Variante B (Zweitverdünnung bei Raumtemperatur)

Nach der Erstverdünnung bei 32 °C wurde das primärverdünnte Sperma 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann erfolgte die Zweitverdünnung bei Raumtemperatur (ca. 21 °C). Das verdünnte Sperma wurde insgesamt 210 Minuten bei 4 °C gehalten. Anschließend folgten die Konfektionierung des Spermas bei 4 °C und das Einfrieren in Stickstoffdampf.

- Variante C (Zweitverdünnung mit Verdüner von 4 °C)

Nach der Erstverdünnung bei 32 °C wurde das primärverdünnte Sperma 15 Minuten bei Raumtemperatur gehalten, dann erfolgte die Zweitverdünnung mit Verdüner von 4 °C. Das verdünnte Sperma wurde insgesamt 210 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgten die Konfektionierung des Spermas bei 4 °C und das Einfrieren in Stickstoffdampf.

3.3.2.2 Versuch 3 – Einfluss von unterschiedlichen Bedingungen der Äquilibration und des Konfektionierungszeitpunktes auf die Spermaqualität

Im Versuch 3 wurde der Effekt des Abkühl- und des Konfektionierungsregimes auf die Spermienvitalität überprüft.

Erst- und Zweitverdünnung des Spermas erfolgten nach BVN – Standard, Versuch 2, Variante A). Danach wurde das ausverdünnte Sperma in vier Varianten wie folgt weiter aufbereitet:

- Variante A (BVN – Standard, Konfektionierung nach Äquilibration)

Verdünntes Sperma wurde insgesamt 210 Minuten bei 4 °C gehalten, dann erfolgten die Konfektionierung bei 4 °C und anschließend das Einfrieren

- Variante B (Zwischentemperierung, Konfektionierung nach Äquilibration)

Verdünntes Sperma wurde 60 Minuten bei 16 °C und anschließend noch weitere 150 Minuten bei 4 °C gehalten, dann erfolgten die Konfektionierung bei 4°C und das Einfrieren

- Variante C (Konfektionierung vor Äquilibration)

Nach der Zweitverdünnung wurde das Sperma 15 Minuten bei Raumtemperatur gehalten und dann bei Raumtemperatur (ca. 21 °C) konfektioniert, das konfektionierte Sperma wurde für 210 Minuten bei 4 °C gehalten und dann eingefroren

- Variante D (Zwischentemperierung, Konfektionierung vor Äquilibration)

Nach der Zweitverdünnung wurde das Sperma bei Raumtemperatur (ca. 21 °C) gehalten und dann konfektioniert, das konfektionierte Sperma wurde für 60 Minuten bei 16 °C und anschließend weitere 150 Minuten bei 4 °C gehalten, dann wurde es eingefroren.

3.3.2.3 Versuch 4 – Einfluss von Äquilibrationdauer auf die Spermaqualität

Im Versuch 4 wurde untersucht, welche Äquilibrationdauer vorteilhaft für die Vitalitätsparameter der Spermien nach dem Auftauen ist.

Für Versuch 4 wurden nur die Ejakulate verwendet, von denen über 700 Pailletten produziert werden konnten. Das Sperma wurde nach BVN – Standard (siehe Versuch 2, Variante A) aufbereitet. Das gesamte verdünnte Sperma wurde in den Verdünnungsgläsern bei 4 °C äquilibriert. Nach ein, zwei, drei, vier, fünf, 24, 28 und 48 Stunden wurden Anteile entnommen, konfektioniert und eingefroren.

3.3.3 Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree® Premix zum Verdünner

Ein neu auf den Markt gebrachter und bislang wenig geprüfter kommerzielle Verdünnerzusatz ist das Oxyfree Premix® (IMV, L'Aigle, Frankreich). Es enthält Antioxidanzien und soll die Fertilität des Bullenspermas fördern. Die genaue Zusammensetzung ist nicht publiziert. Um zu überprüfen welchen Einfluss der Verdünnerzusatz auf das konservierte Bullensperma hat wurde das Oxyfree® Premix in mehreren Versuchen getestet.

Als Vorversuch wurden sechs Ejakulate im Laborversuch getestet. Die Ejakulate wurden von fünf Fleckviehbullen gewonnen. Das Sperma wurde im Split-Sample-Verfahren mit und ohne Zusatz von Oxyfree® mit Triladyl®-Verdünner auf 15×10^6 Gesamtspermien pro Paillette verdünnt. Die Menge an Oxyfree® Premix entsprach den Herstellerangaben (25 ml in 1250 ml Verdünner). Die Spermaqualität wurde nach dem Auftauen mittels CASA-System SpermVision® (siehe Pkt. 3.4.4) 30 und 120 Minuten nach dem Auftauen bewertet.

3.3.3.1 Versuch 5 - Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree® Premix zu den Verdünnern Triladyl® und BioXcell®

Es wurden jeweils drei Ejakulate von vier zuchtwertgeprüften Fleckviehbullen in diesen Labor- und Feldversuch einbezogen. Das Sperma wurde unter Routinebedingungen aufbereitet. Als Verdünnungsmedien kamen der eidotterhaltige Verdünner Triladyl® und der eidotterfreie Verdünner BioXcell® zum Einsatz. Das Sperma wurde in vier Teile geteilt und mit folgenden Verdünnervarianten auf 10×10^6 Gesamtspermien pro Paillette verdünnt:

- Triladyl® ohne Zusatz von Oxyfree® Premix
- Triladyl® mit Zusatz von Oxyfree® Premix
- BioXcell® ohne Zusatz von Oxyfree® Premix
- BioXcell® mit Zusatz von Oxyfree® Premix

Die Qualität der eingefrorenen Spermachargen wurde vom Fachpersonal der BBS Neustadt a. d. Aisch innerhalb einer Woche nach der Produktion überprüft. Dafür wurden jeweils zwei

Pailletten pro Variante aufgetaut (10 sec, 38 °C). Bei einer Vorwärtsbeweglichkeit unterhalb von 40 % (subjektive Motilitätsschätzung) wurde die Spermacharge vom Besamungsversuch ausgeschlossen.

Für die Laboruntersuchung des aufgetauten Spermas wurden folgende Methoden eingesetzt:

- Motilitätsanalyse mittels CASA-System SpermVision[®] 30 und 120 Minuten nach dem Auftauen, Inkubation bei 37 °C (siehe Pkt. 3.4.4)
- Messung der Lipidperoxidation und des oxidativen Stresses mittels Durchflusszytometer nach DHR-, DCFH- und Bodipy-Färbung (siehe Pkt. 3.4.5.3 - 5)
- Messung des Akrosomstatus mittels Durchflusszytometer nach FITC-PNA/PI – Färbung (siehe Pkt. 3.4.5.1)

Die Spermachargen, die besamungstauglich waren, wurden an die Besamungstechniker und Tierärzte ausgeliefert. Diese sollten nach Möglichkeit vorwiegend zu Erstbesamungen bei Kühen (keine Kalbinnen) eingesetzt werden.

Für die Ermittlung des Besamungserfolges wurde das 90-Tage-Non-Return-Rate – Ergebnis (NRR) verwendet. Die NRR wurde Ejakulats- bzw. Variantenweise erfasst.

3.3.3.2 Versuch 6 - Ermittlung von Spermivitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree[®] Premix zum Triladyl[®]-Verdünner und Erhöhung des Verdünnungsgrades

Im Split-Sample-Verfahren wurden jeweils vier Ejakulate von sechs zuchtwertgeprüften Fleckviehbullen ohne und mit Zusatz von Oxyfree[®] Premix zum Triladyl[®]-Verdünner auf 14 bzw. 8×10^6 Gesamtspermien pro Paillette verdünnt. Pro Ejakulat resultierten damit vier Varianten.

Für die Laboruntersuchungen sowie für den Besamungsversuch wurden die gleichen Methoden eingesetzt wie im oben beschriebenen Versuch 5.

3.3.4 Untersuchungen zur Ermittlung des fertilitätsprognostischen Wertes der Parameter gefrierkonservierter Bullenspermien

Die Untersuchungen erfolgten mit folgender Zielsetzung:

- Entwicklung praxistauglicher Selektionskriterien für die Einsatzkontrolle gefrierkonservierten Bullenspermas auf Basis ausgewählter und gewichteter invitro-Parameter, vorrangig unter Nutzung der computergestützten Motilitätsanalyse
- Anwendung und Optimierung eines speziellen statistischen Modells zur Verrechnung der Beziehungen zwischen ausgewählten Vitalitätsparametern gefrierkonservierter Bullenspermien und den Non-Return-Raten der entsprechenden Ejakulate, Gewichtung der Parameter und Zusammenfassung in einem Index zur Spermaqualität

Es wurden 30 besamungstaugliche Ejakulate von 10 zuchtwertgeprüften Fleckviehbullen gewonnen. Das Sperma wurde im Routinebetrieb des BVN Neustadt a. d. Aisch e.V. aufbereitet und mit Triladyl[®]-Verdüner auf 10×10^6 Gesamtspermien pro Paillette verdünnt. Durch die verringerte Spermienzahl pro Besamungsportion sollte eine größere Varianz der Befruchtungsergebnisse zwischen den Bullen erzielt werden. Weiterhin konnte so pro Ejakulat eine größere Portionszahl als üblich zum Einsatz gebracht werden, wodurch die Sicherheit der Befruchtungsergebnisse erhöht werden sollte.

Für die Laboruntersuchungen des originären und gefrierkonservierten Spermas wurden folgende Methoden eingesetzt:

- originäres Sperma
 - Routineverfahren (Konzentration, Volumen, V %)
 - Motilitätsanalyse mittels CASA-System SpermVision[®] (siehe Pkt 3.4.4)
 - Messung der Lipidperoxidation und des oxidativen Stresses mittels Durchflusszytometer nach DHR-, DCFH- und Bodipy-Färbung (siehe Pkt 3.4.5.3 - 5)
 - Messung des Akrosomstatus mittels Durchflusszytometer nach FITC/PNA/PI-Färbung (siehe Pkt 3.4.5.1)
- gefrierkonserviertes Sperma
 - Geschätzte Vorwärtsbeweglichkeit (V %) nach 30 Minuten

- Spermienzahl pro Paillette, Messung mittels NucleoCounter[®] SP-100 (Chemometec, Allerød, Dänemark) (siehe Pkt 3.4.2)
- Motilitätsanalyse mittels CASA-System SpermVision[®] 30 und 120 Minuten nach dem Auftauen, Inkubation bei 37 °C (siehe Pkt 3.4.4)
- Messung der Lipidperoxidation und des oxidativen Stresses mittels Durchflusszytometer nach DHR-, DCFH- und Bodipy-Färbung 30 Minuten, zwei und vier Stunden nach dem Auftauen (siehe Pkt 3.4.5.3 - 5)
- Messung des Akrosomstatus mittels Durchflusszytometer nach FITC-PNA/PI-Färbung 30 Minuten nach dem Auftauen (siehe Pkt 3.4.5.1)
- Analyse der Spermienchromatinstruktur mittels Durchflusszytometer (SCSA[®]) (siehe Pkt 3.4.5.6)

Um in den Besamungseinsatz einbezogen zu werden, mussten die Ejakulate bei der Qualitätsprüfung mit mindestens 40 % vorwärtsbeweglichen Spermien (subjektive Schätzwerte) bewertet werden.

Für die Ermittlung des Besamungserfolges wurde das 90-Tage Non-Return-Rate – Ergebnis (NRR) verwendet. Die NRR wurde ejakulatsweise erfasst.

3.4 Untersuchungsmethoden zur Beurteilung der Spermaqualität

3.4.1 Ermittlung der Spermienkonzentration in aufgetautem Sperma mittels Zählkammer nach THOMA^{neu}

Für die Bestimmung der Spermienkonzentration mittels Zählkammer nach THOMA^{neu} wurden 100 µl aufgetautes Sperma mit 1,9 ml 3 %-iger NaCl-Lösung verdünnt und mit Hilfe eines Reagenzglasschüttlers (Reax top[®], VWR, Darmstadt, Deutschland) drei Minuten gemischt. Dann wurde ein Tropfen neben das Deckglas auf die Zählkammer gebracht. Nach fünfminütiger Absenkungszeit wurden mit Hilfe eines positiven Phasenkontrastmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland) unter 400-facher Vergrößerung die Spermienköpfe von fünf Gruppenquadraten ausgezählt. Die Konzentration pro Milliliter ergab sich durch Multiplikation der gezählten Spermien mit dem Zählkammerfaktor (25), dem Verdünnungsgrad (20) und dem Faktor 10³.

3.4.2 Ermittlung der Spermienkonzentration in aufgetautem Sperma mittels Nucleocounter[®]

Der Nucleocounter[®] SP-100 der Firma Chemometec, (Allerød, Dänemark) besteht aus einem Fluoreszenzmikroskop in Kombination mit einer CCD-Kamera sowie einem photometrischen Mikroskopbildanalyse-System und entsprechender Software.

Von den aufgetauten Proben wurden 50 µl Sperma mit 1,0 ml Aufschlusslösung (Chemometec, Dänemark) verdünnt. Durch die Aufschlusslösung wurden die Zellmembranen zerstört und die Zellkerne freigesetzt. Zur Messung wurden 50 µl der so vorbereiteten Messproben in die sogenannte NucleoCassette (Chemometec, Dänemark) gesaugt. Das Messvolumen wurde durch den Kolbenhub der Ansaugvorrichtung an der Kassette definiert. In dem Labyrinth der Kassette erfolgte eine Propidiumiodid-Färbung der Zellkerne. Die Messprobe wurde während der 30 Sekunden des Messzeitraumes durch eine weitere automatische Bewegung des Kolbens in die sogenannte Kassetten-Kammer gesaugt, in deren Bereich auch die fluoreszenzmikroskopische Analyse der rot gefärbten Zellkerne erfolgte. Die Auswertung des Mikroskopbildes erfolgte mit Hilfe der Nucleoview[®] Software (Chemometec, Dänemark).

3.4.3 Schätzung des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien im Thermoresistenztest nach dem Auftauen

Das aufgetaute Sperma wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäße (VWR, Darmstadt, Deutschland) eingefüllt und bei 37 °C im Blockheizer (HLC, Bovenden, Deutschland) für drei Stunden inkubiert und alle 30 Minuten untersucht. Dafür wurden mit einer Eppendorf-Pipette zweimal 8 µl des Spermas auf einem vorgewärmten Objektträger mit je einem Deckglaschen (18 x 18 mm) abgedeckt und durch ein Mikroskop mit positivem Phasenkontrast (Nikon Eclipse[®] E600, Japan) auf dem beheizten Tisch bei einer 200-fachen Vergrößerung betrachtet. Pro Präparat wurden mehrere Gesichtsfelder beurteilt (subjektive Schätzung) und das Mittel abgebildet. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien wurde als Prozentsatz ausgedrückt [V %].

3.4.4 Computergestützte Motilitätsanalyse

Ein großer Teil der Untersuchungen erfolgte mit Hilfe der computergestützten Motilitätsanalyse (computer assisted semen analysis – CASA, cell motion analysis - CMA), System SpermVision[®] (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland).

CASA-Systeme arbeiten objektiv und weitgehend automatisiert. Sie sind geeignet, das Motilitätsverhalten von Bullenspermien umfassend und reproduzierbar zu charakterisieren. Es werden Videosequenzen des mikroskopischen Bildes registriert. Nach Digitalisierung werden die Spermien anhand unterschiedlicher Grauwerte und Parametervorgaben erkannt. Für jede registrierte Spermienzelle werden Bewegungsform und Geschwindigkeit mittels einer speziellen Software ermittelt. Anhand weiterer Parametervorgaben können daraus eine Vielzahl von Spermienpopulationen (Spermiengruppen) definiert werden. Insbesondere das SpermVision[®]-System bietet dabei vielfältige Möglichkeiten eines nutzerdefinierten Datenmanagements, welches für einen differenzierten Einsatz im Routine- oder im Forschungsbereich von großer Bedeutung ist.

Das genutzte SpermVision[®]-System bestand aus einem Mikroskop (Olympus C x 31) mit negativem Phasenkontrast, das über eine Digitalkamera (60 Frames pro Sekunde, Olympus) mit einem Rechner (PC, Pentium[®] 4 Prozessor bei 2,0 GHz, 1 GB RAM, 40 GB ROM) mit aufgespielter SpermVision[®]- Software (Updates von 2006) verbunden wurde. Das Mikroskop war mit einem beheizbaren Kreuztisch und zusätzlich einer separaten, beheizten Arbeitsplatte ausgestattet.

Die SpermVision[®]- Software nimmt pro Gesichtsfeld innerhalb von 0,5 Sekunden eine Serie von 30 Bildern auf und beurteilt in jedem Bild die Partikel, die der Definition der Spermien entsprechen. Durch Vergleichen der 30 Bilder einer Serie werden die von den Spermien zurückgelegten Wegstrecken erkannt und hieraus alle Motilitätsparameter hinsichtlich der Bewegungsformen und -geschwindigkeiten errechnet. Das Ergebnis einer Messung errechnet sich aus den Mittelwerten aller Motilitätsdaten. Weiterhin werden Spermienkonzentrationswerte ausgewiesen.

Für die Messungen wurde als Messkammer eine sogenannte Leja-Kammer (LEJA, Niederlande) benutzt, die eine standardisierte Tiefe von 20 µm besitzt. Die Messkammer wurde mit

Hilfe einer variablen Eppendorf-Pipette mit 3,0 µl Sperma befüllt. Pro Probe wurden immer mindestens sechs Felder mit mehr als 700 Spermien ausgewertet.

3.4.5 Durchflusszytometrie

Die Untersuchungen zur Überprüfung der Lebensfähigkeit der Spermien, die Bestimmung der Chromatinstruktur der Spermien und die Messung der Lipidperoxidation wurden mit Hilfe durchflusszytometrischer Verfahren unter Verwendung spezifischer Färbemethoden durchgeführt.

Die eigenen Messungen erfolgten vorrangig an einem Durchflusszytometer Epics[®] XL (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland), das mit einem luftgekühlten Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm ausgestattet war. Für einen Teil der Untersuchungen (Rhodamin 123/Propidiumiodid-Färbung) wurde das Durchflusszytometer PAS[®] (Partec, Münster, Deutschland) benutzt, das mit gleicher Lichtquelle wie das Epics[®] XL ausgestattet war. Bei beiden Durchflusszytometern standen für die Messung vier verschiedene Filter zur Auswahl (Fl-1, Fl-2, Fl-3, Fl-4). Für die Steuerung des Gerätes war ein kompatibler Computer an das Durchflusszytometer angeschlossen. Die Bearbeitung und Auswertung der Daten erfolgte mit den Software-Programmen EXPO 32 ADC XL 4 Color[®] und Expo 32 Analysis[®] (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) sowie FloMax [160] (Partec, Münster, Deutschland). Die SCSA[®]-Daten wurden mit dem Software-Programm DAS[®], Version 4.40 (Beisker, 1994) ausgewertet.

Vor Beginn der Messungen wurden die Geräte zweimal mit einer Cleanse-Flüssigkeit (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) und zweimal mit bidestilliertem Wasser gespült. Zur Gerätejustierung kam die Flow-Check[®]-Flüssigkeit (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) zum Einsatz, welche fluoreszierende Latexkügelchen enthält. Dadurch wurden einheitliche Messeinstellungen der Geräte garantiert. Nach diesem Eichungsdurchlauf wurde mit der Messung der Proben begonnen.

Bei allen durchflusszytometrischen Analyseverfahren wurden 10.000 Spermien pro Probe analysiert.

Die angewendeten durchflusszytometrischen Methoden sind nachfolgend angeführt.

3.4.5.1 FITC-PNA/PI – Färbung

Der Farbstoff FITC-PNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, L-7381) besteht aus Arachis hypogaea-Lektin (PNA), das an Fluoreszein isothiocyanat (FITC) gekoppelt ist und dient zur Auswertung des akrosomalen Status der Spermien. Das Lektin bindet sich selektiv an die äußere Akrosommembran und emittiert in Verbindung mit dem FITC nach Laserlichtanregung grünes Licht. Ist die äußere Akrosommembran geschädigt, wirkt sich das auf die Grünfärbung aus. Der Farbstoff PI (Propidiumiodid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-4170) ist ein nicht membranpenetrierender Farbstoff (färbt den Zellkern nur bei Membranschäden) und dient zur Unterscheidung von toten und lebenden Spermien. Nach Anregung mit Laserlicht emittiert er Licht im roten Bereich.

Die eigenen Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an das bei Nagy et al. (2003) beschriebene Verfahren.

Für die Färbung wurde das originäre oder aufgetaute gefrierkonservierte Bullensperma mit Tyrode-Medium auf eine Endkonzentration von 5×10^6 Spermien/ml verdünnt. Für die Untersuchung wurden 500 μ l Sperma mit 5 μ l FITC-PNA (100 μ g/ml Aqua dest.) und 3 μ l PI (2,99 mM) gemischt und im Dunklen für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Messproben im Durchflusszytometer bei einer Durchflussrate von 100 bis 300 Spermien pro Sekunde gemessen. Für die FITC-PNA/PI-Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt.

Bei der Auswertung wurden die Spermien zum einen hinsichtlich ihrer Plasmamembranintegrität, zum anderen hinsichtlich der Akrosomintegrität in vier verschiedene Populationen wie folgt eingeteilt (Abbildung 1):

- vitale (membranintakte) Spermien mit intaktem Akrosom
- nicht vitale (membrangeschädigte) Spermien mit intaktem Akrosom oder völligem Verlust des Akrosoms
- nicht vitale Spermien mit geschädigtem Akrosom
- vitale Spermien mit akrosomaler Reaktion

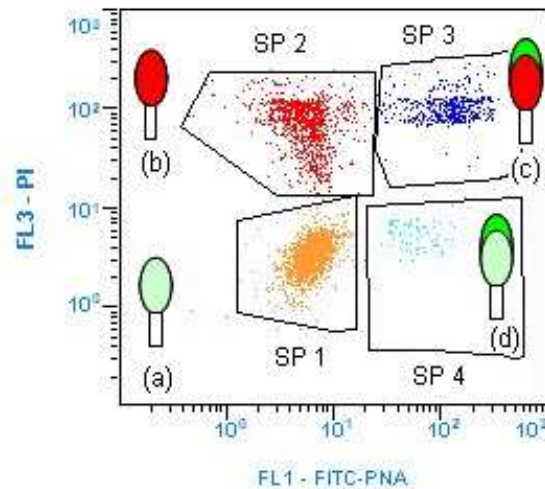


Abbildung 1: Punktwolkendiagramm der vier Spermienpopulationen nach FITC-PNA-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung
 Computerbild-Ausdruck: SP 1 = vitale Spermien mit intaktem Akrosom; SP 2 = membrangeschädigte Spermien mit intaktem Akrosom oder völligem Verlust des Akrosoms; SP 3 = membrangeschädigte Spermien mit geschädigtem Akrosom; SP 4 = vitale Spermien mit akrosomaler Reaktion
 Schematische Darstellung: a = vitale Spermien mit intaktem Akrosom, b = tote Spermien mit intaktem Akrosom, c = tote Spermien mit Akrosomenschädigung, d = vitale Spermien mit Akrosomenreaktion

3.4.5.2 Rhodamin 123/PI – Färbung

Die Rhodamin 123/PI-Färbung diente zur Charakterisierung der Mitochondrienaktivität. Lebende Spermien mit intakten Mitochondrien wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 (SERVA, Heidelberg, Deutschland; MG: 380,8) markiert. Intakte Mitochondrien schließen den Farbstoff ein, solange ihr Membranpotential aufrechterhalten bleibt. Parallel dazu wurde zur Markierung der toten Spermien der Farbstoff PI (Propidiumiodid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-4170) benutzt. Beide Farbstoffe besitzen unterschiedliche Anregungs- und vor allem Emissionsspektren. Lebende mitochondrienaktive Spermien fluoreszieren grün, tote Spermien rot.

Die hier beschriebene Methode lehnt sich an die von Graham et al. (1990) beschriebene Verfahrensweise an.

Für die Untersuchungen wurden die aufgetauten Spermaproben bei 38 °C im Verhältnis 1:5 mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung, pH 7,0 verdünnt. Zur 250 µl Messprobe wurden 10 µl Rhodamin 123 - Gebrauchslösung (0,13 mmol) und 2,5 µl Propi-diumiodid – Gebrauchslösung (1,5 mmol) gegeben. Dieses Gemisch wurde 20 Minuten bei 38 °C im Dunkeln inkubiert. Direkt vor der Durchführung der durchflusszytometrischen Messung wurden 10 µl gefärbter Messansatz in 2 ml 38 °C warme filtrierte pNaCl-Lösung gegeben, die sich bereits in dem Messröhrchen des Durchflusszytometers befand.

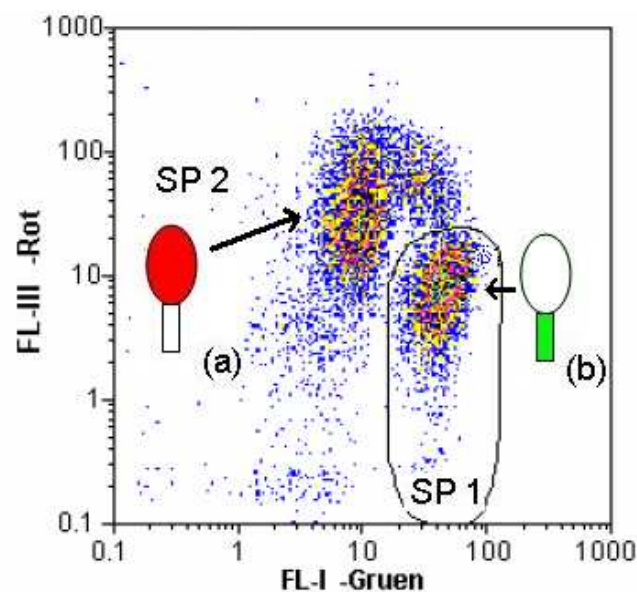


Abbildung 2: Punktwolkendiagramm der beiden Spermienpopulationen (SP) nach Rhodamin/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung
Computerbild-Ausdruck: SP 1 = vitale Spermien mit aktiven Mitochondrien;
SP 2 = nicht vitale Spermien
Schematische Darstellung: a = nicht vitale Spermien mit roter Kernfluoreszenz,
b = vitale Spermien mit verstärkter Grünfluoreszenz, d. h. aktive Mitochondrien

Die Messungen für diese Methode wurden am IFN Schönow e.V. mit dem Durchflusszytometer PAS[®] (Partec, Münster, Deutschland) durchgeführt. Messung und Auswertung erfolgten mit Hilfe des gerätinternen Rechners und dem Software-Programm FloMax [160] (Partec, Münster, Deutschland). Es wurde der Prozentsatz membranintakter mitochondrienaktiver Spermien ermittelt [% mitochondrienaktiv] (Abbildung 2).

3.4.5.3 Dihydrorhodamin 123 (DHR)/PI – Färbung

Der DHR-Test ermöglicht die quantitative Analyse der oxidativen Sauerstoffradikalfreisetzung. Durch Superoxid-Anionen erfolgt eine Umwandlung des (selbst nicht fluoreszierenden) fluorogenen Substrats DHR 123 in fluoreszierendes Rhodamin 123 (R123), das im grünen Bereich fluoresziert (ca. 536 nm). Die toten Spermien werden über die Einlagerung von PI (Rot-Fluoreszenz) in die DNA ausgeschlossen.

Zur Bestimmung der Peroxidation der Spermien wurden die Spermaproben nach dem bei Ostrovidov et al. (2000) beschriebenen Verfahren durchflusszytometrisch analysiert.

Für die DHR/PI-Färbung wurden die aufgetauten Spermaproben mit Tyrode-Medium auf 5×10^6 Spermien/ml verdünnt. Davon wurde 1 ml mit 5 μ l DHR-Gebrauchslösung (40 mM) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D 1054) versetzt und anschließend in vier Ansätze zu je 245 μ l aufgeteilt, die 0 (zweimal), 2 und 4 Stunden nach dem Auftauen untersucht wurden. Jeder Probe wurden zum entsprechenden Zeitpunkt 2,5 μ l PI-Gebrauchslösung (2,99 mM) zugesetzt. Einer der beiden Proben von 0 Stunden (0h+-Wert) wurden zur Stimulation der Bildung von ROS noch 2,5 μ l H₂O₂-Gebrauchslösung zugesetzt. Die Messung erfolgte dann nach 15 Minuten Inkubation bei 37 °C.

Zur Messung wurden der FL-1-Filter (grüne Fluoreszenz) sowie der FL-3-Filter (rote Fluoreszenz) verwendet. Während der Auswertung konnte zum einen aufgrund fehlender oder vorhandener Rotfluoreszenz zwischen vitalen und nicht vitalen Spermien unterschieden werden und zum anderen - bei verstärkter Grünfluoreszenz - auf vorhandene ROS geschlossen werden (Abbildung 3).

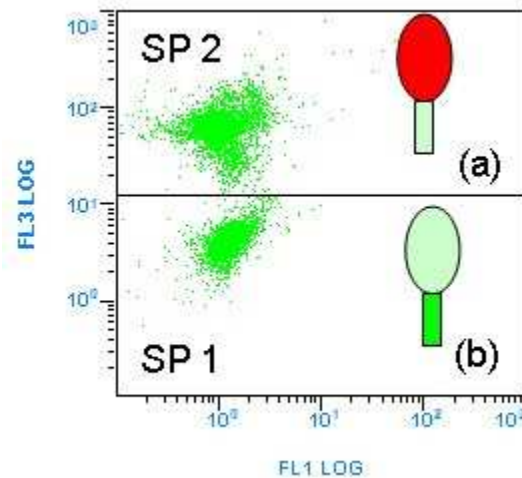


Abbildung 3: Punktwolkendiagramm der beiden Spermienpopulationen (SP) nach DHR/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung
Computerbild-Ausdruck: SP 1 = vitale Spermien mit ROS; SP 2 = nicht vitale Spermien
Schematische Darstellung: a = nicht vitale Spermien mit roter Kernfluoreszenz, b = vitale Spermien mit ausschließlicher Grünfluoreszenz

3.4.5.4 Dichlorofluoreszeindiacetat (DCFH)/PI – Färbung

Die nicht fluoreszierenden Moleküle von Dichlorofluoreszeindiacetat (DCFH) werden in Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies zu hochfluoreszierenden DCF oxidiert, das im grünen Bereich (ca. 525 nm) fluoresziert. Der DCFH-Test ist weniger empfindlich als der DHR-Test. Er wird bevorzugt durchgeführt, um den generalisierten oxidativen Stress der Zelle zu untersuchen.

Die hier beschriebene Methode lehnt sich an die von Halliwell u. Whiteman (2004) beschriebene Verfahrensweise an.

Für die DCFH/PI-Färbung wurden die aufgetauten Spermaproben mit Tyrode-Medium auf 5×10^6 Spermien/ml verdünnt. Je 1 ml der verdünnten Sperma wurde mit 5 μ l DCFH-Gebrauchslösung (10 mM) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D 6883) versetzt und anschließend in vier Ansätze zu je 250 μ l aufgeteilt, die 0 (zweimal), 2 und 4 Stunden nach dem Auftauen untersucht wurden. Jeder Probe wurden zum entsprechenden Zeitpunkt 2,5 μ l PI-Gebrauchslösung (2,99 mM) zugesetzt. Einer der beiden Proben von 0 Stunden (0h+-Wert)

wurden zur Stimulation der Bildung von ROS noch 2,5 µl H₂O₂-Gebrauchslösung zugesetzt. Die Messung erfolgte dann nach 15 Minuten Inkubation bei 37 °C.

Zur Messung wurden der FL-1-Filter (grüne Fluoreszenz) sowie der FL-3-Filter (rote Fluoreszenz) verwendet. Während der Auswertung konnte zum einen aufgrund fehlender oder vorhandener Rotfluoreszenz zwischen vitalen und nicht vitalen Spermien unterschieden werden, zum anderen bei verstärkter Grünfluoreszenz auf vorhandene reaktive Sauerstoffspezies geschlossen werden.

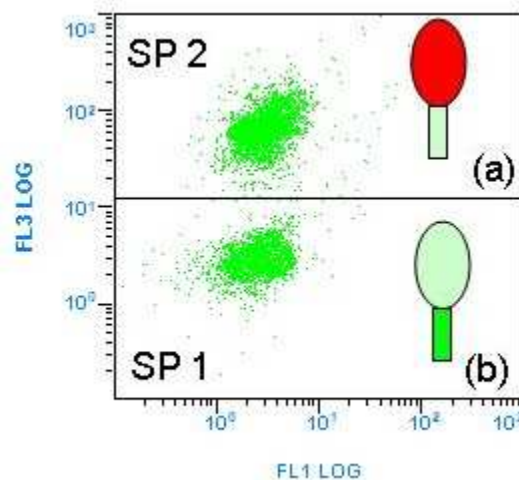


Abbildung 4: Punktwolkendiagramm der beiden Spermienpopulationen (SP) nach DCFH/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung
Computerbild-Ausdruck: SP 1 = vitale Spermien mit ROS; SP 2 = nicht vitale Spermien
Schematische Darstellung: a = nicht vitale Spermien mit roter Kernfluoreszenz, b = vitale Spermien mit ausschließlicher Grünfluoreszenz

3.4.5.5 C11-Bodipy^{581/591} (Bodipy)/PI – Färbung

C11-Bodipy ist eine fluoreszierende Fettsäure, die für den Nachweis der Lipidperoxidation in Zellmembranen lebender Zellen eingesetzt wird. Durch Oxidation wird ihr Fluoreszenzspektrum vom roten (595 nm) in den grünen (520 nm) Bereich verlagert. Bodipy zeigt sich sehr reaktiv gegenüber verschiedenen Oxy-Radikalen und Peroxinitriten, aber wenig erregbar von Superoxiden, Nitrit-Oxiden und Hydroperoxiden. Bodipy ist in der Lage, in die meisten Zellmembranen einzudringen, ohne dabei eine bestimmte Organelle zu bevorzugen. Mittels Bodi-

py-Färbung können Lipidperoxidationsvorgänge festgestellt und in ihrem Ausmaß beurteilt werden.

Die hier verwendete Methode lehnt sich an die von Gregor et al. (2002) beschriebene Verfahrensweise an.

Für die Bodipy/PI – Färbung wurden die aufgetauten Spermaproben mit Tyrode-Medium auf 5×10^6 Spermien/ml verdünnt. Je 1 ml der verdünnten Spermaproben wurde mit 5 μ l Bodipy-Gebrauchslösung (1000 μ M) (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, D 3861) versetzt und anschließend in vier Ansätze zu je 250 μ l aufgeteilt, die 0 (zweimal), 2 und 4 Stunden nach dem Auftauen untersucht wurden. Jeder Probe wurden zum entsprechenden Zeitpunkt 2,5 μ l PI-Gebrauchslösung (2,99 mM) zugesetzt. Einer der beiden Proben von 0 Stunden (0h+-Wert) wurden zur Stimulation der Lipidperoxidation noch 2,5 μ l Butylhydroperoxid-Gebrauchslösung zugesetzt. Die Messung erfolgte dann nach 15 Minuten Inkubation bei 37 °C.

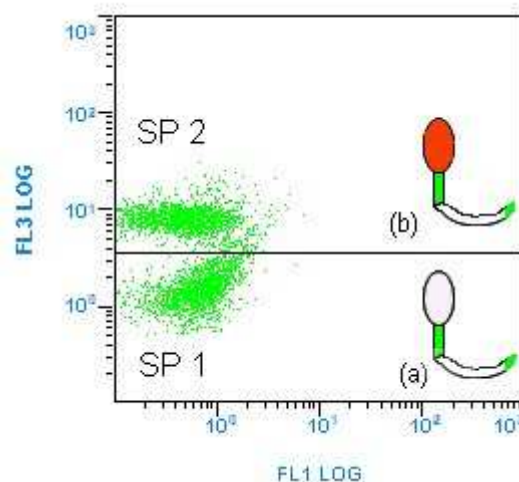


Abbildung 5 Punktwolkendiagramm der beiden Spermienpopulationen (SP) nach Bodipy/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung
Computerbild Ausdruck: SP 1 = vitale Spermien mit LPO; SP 2 = nicht vitale Spermien
Schematische Darstellung: a = vitale Spermien mit ausschließlicher Grünfluoreszenz, lipidperoxidationspositiv, b = nicht vitale Spermien mit roter Kernfluoreszenz

Zur Messung wurden der FL-1-Filter (grüne Fluoreszenz) sowie der FL-3-Filter (rote Fluoreszenz) verwendet. Während der Auswertung konnte zum einen aufgrund fehlender oder vorhandener Rotfluoreszenz zwischen vitalen und nicht vitalen Spermien unterschieden werden, zum anderen bei verstärkter Grünfluoreszenz auf vorhandene Lipidperoxidationsvorgänge geschlossen werden (Abbildung 5).

3.4.5.6 SCSA[®]-Färbung

Der Sperm Chromatin Structur Assay (SCSA[®]) basiert auf dem Prinzip, dass abnormal strukturiertes Chromatin in situ eine erhöhte Empfindlichkeit für eine physikalisch induzierte Denaturierung besitzt. Die Denaturierung der DNA, zum Beispiel durch Säure, führt teilweise zur Trennung der normalerweise doppelsträngig vorliegenden DNA-Moleküle in Einzelstränge. Nach der sich anschließenden Färbung mit Akridinorange kommt es zu einer Anlagerung des Farbstoffs an die gesamte DNA. Doppelsträngige DNA emittiert Licht im grünen Bereich und einzelsträngige DNA emittiert Licht im roten Bereich.

Bei der Durchführung des SCSA[®]-Tests erfolgte die Probenaufbereitung nach den Angaben von Evenson u. Jost (1994).

Für die SCSA[®]-Färbung wurden die Spermaproben mit TNE-Puffer (siehe Anhang) auf 2×10^6 Spermien/ml verdünnt. Davon wurden 200 µl zunächst mit 0,4 ml Säuredetergenzlösung versetzt und für 30 Sekunden auf dem Vortexer (Labdance, VWR, Darmstadt) vermischt. Anschließend wurden 1,2 ml Akridinorange-Gebrauchslösung (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, 0249.1) hinzugefügt. Nach einer dreiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung.

Zur Messung wurden der FL-1-Filter (grüne Fluoreszenz) und der FL-3-Filter (rote Fluoreszenz) verwendet. Zur Kalibration des Durchflusszytometers wurden vor Messbeginn und nach jeder fünften Probe Referenzproben eines Bullen mit bekannter Fluoreszenzintensität gemessen. Auf diese Weise konnten gleich bleibende Einstellungen garantiert werden.

Mit Hilfe einer computergestützten Auswertung der Punktwolkendiagramme wurde für jedes einzelne Spermium der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot und grün fluoreszierende Spermien) errechnet und als DFI (DNA-Fragmentationsindex) bezeichnet. Die gewonnenen DFI-Werte wurden in einem Histogramm dargestellt. Für die weitere Aus-

wertung mussten die Spermien mit erhöhtem DFI-Wert manuell von den Spermien mit niedrigem DFI-Wert getrennt werden. Das Computerprogramm errechnete auf dieser Basis den prozentualen Anteil der Spermien mit erhöhtem DFI-Werte an der Gesamtprobe.

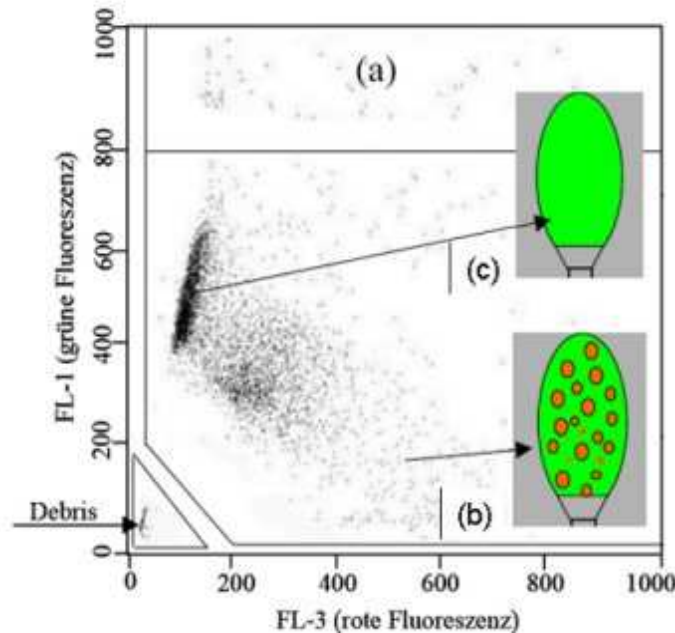


Abbildung 6 Auswertung der durchflusszytometrisch durchgeführten Spermachromatinstrukturanalyse (SCSA-Test)

(a) Punktwolkendiagramm

(b+c) Schematische Darstellung der Spermien mit erhöhter Rotfluoreszenz (b), d.h. mit vermehrt vorkommender einzelsträngiger DNA und Spermien mit grüner Fluoreszenz (c), d.h. doppelsträngiger DNA

3.5 Erfassung von Befruchtungsergebnissen bei Feldversuchen

Die für die eigenen Versuche gewonnenen gefrierkonservierten Spermaportionen wurden im Zeitraum von September 2006 bis Juli 2007 in Landwirtschaftsbetrieben des Einzugsgebiets des BVN eingesetzt. Die Spermaportionen der verschiedenen Bullen, Ejakulate und Varianten wurden so weit wie möglich gleichmäßig auf die zu betreuenden Rinderbestände verteilt, um mögliche Einflussfaktoren der verschiedenen Betriebe und Besamungstechniker auszuschließen.

Die in dieser Arbeit verwendete Non-Return-Rate (NRR) errechnete sich als prozentualer Anteil von erstbesamten Rindern, die bis zum neunzigsten Tag nicht wieder zur Besamung angemeldet wurden. Die 90-Tage-NRR wurde für jeden Versuch und jede Versuchsvariante pro Bulle und Ejakulat erfasst. Die Auswertung erfolgte über das Datenerfassungs- und Rechenzentrum des BVN.

3.6 Anwendung biostatistischer Verfahren bei der Versuchsauswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Microsoft[®] Excel[®] 2003 (Microsoft Corporation, USA) und SPSS[®] 15.0 (SPSS GmbH Software München). Es wurden deskriptive Statistiken (Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen) sowie Regressions-, Korrelations- (nach Pearson) und Varianzanalysen berechnet. Zur Analyse der Vergleichsstudien wurde eine Signifikanzanalyse (Wilcoxon - Test) für abhängige und für unabhängige (Mann-Whitney U – Test) Stichproben durchgeführt. Ein Unterschied wurde mit $p < 0,05$ als niedrig, mit $p < 0,01$ als signifikant und mit $p < 0,001$ als hoch signifikant bewertet.

Zur Ermittlung der fertilitätsprognostischen Werte wurde ein multiples lineares Regressionsmodell mit einer Linearkombination der n Merkmale (Variablen, Regressoren) x_1, \dots, x_n als Regressionsfunktion verwendet, wobei y (NRR) das Zielmerkmal (Regressand) war.

$$y = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n$$

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Homogenität von Besamungsportionen gleicher Ejakulate hinsichtlich Spermienzahl und Spermaqualität

4.1.1 Sedimentationsverhalten von Bullenspermien im verdünnten Sperma

Zielstellung der Untersuchungen (siehe Pkt. 3.3.1.1, Vorversuch) war die Charakterisierung des Sedimentationsverhaltens von Bullenspermien während der verschiedenen Phasen der Spermaaufbereitung. Dafür wurden zwei Verdüner und zwei Mischungsvarianten ausgewählt.

Für die Verfahrensschritte „Endverdünnung“ und „Äquilibrierung über 160 min. bei 4°C mit Mischung“ ergaben sich nach Auszählung bzw. fotometrischer Messung zwischen den Proben, die aus dem oberen, mittleren und unteren Bereich entnommen wurden, keine signifikante Unterschiede in der Spermienkonzentration (Tabelle 1). Auch die beiden Verdüner- und Mischungsvarianten ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen. Bei der Verfahrensvariante „Äquilibrierung über 160 min. bei 4°C ohne Mischung“ und der Verdünnervariante – Triladyl[®] waren signifikante ($p < 0,01$) Unterschiede zwischen den Proben aus dem oberen, mittleren und unteren Bereich erkennbar. Auch die beiden Mischungsvarianten ließen signifikante Unterschiede erkennen. Bei der gleichen Verfahrensvariante waren die Unterschiede bei der BioXcell[®] –Verdünnervariante, zwischen dem oberen und mittleren Bereich niedrig signifikant ($p < 0,05$) und signifikant ($p < 0,01$) zwischen dem mittleren und unteren Bereich (Tabelle 1).

Bei der Verfahrensvariante „Äquilibrierung über 160 min. bei 4°C ohne Mischung“ lagen alle Ejakulate in dem gleichen Wertebereich. Zwischen Ejakulaten, die mit BioXcell[®] verdünnt wurden, war die Streuung größer als bei den Ejakulaten, die mit Triladyl[®] verdünnt worden waren.

Zwischen den beiden Mischungsverfahren (fünfmaliges Schwenken des Verdünnungsglases bzw. Rühren mittels Magnetprüher) sowie zwischen den Verdünnervarianten wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Tabelle 1: Sedimentationsverhalten von Bullenspermien bei den Verfahrensschritten der Gefrierkonservierung (n=5 Ejakulate)

Misch-Variante	Verfahrensschritt	Ort der Probenentnahme	Verdüner Triladyl®		Verdüner BioXcell®		
			Zählkammer-Zählung		Fotometrische Messung		
			[10 ⁶ /ml]		Extinktion		
Mischen durch Schwenken	Endverdünnung vermischt bei 23 °C	Oben	61,4	± 5,4	0,069	± 0,010	
		Mitte	61,4	± 4,3	0,070	± 0,008	
		Unten	62,0	± 4,3	0,070	± 0,009	
	Äquibrierung über 160 min. bei 4 °C ohne Mischung	Oben	53,2	± 1,8	0,072	± 0,008	
		Mitte	59,6	± 3,8	0,076	± 0,010	
		Unten	66,2	± 1,8	0,082	± 0,009	
	Äquibrierung über 160 min. bei 4 °C mit Mischung	Oben	61,4	± 5,3	0,076	± 0,007	
		Mitte	61,4	± 4,8	0,075	± 0,007	
		Unten	61,6	± 4,4	0,076	± 0,009	
	Mischen durch Rühren	Endverdünnung vermischt bei 23 °C	Oben	63,2	± 5,4	0,075	± 0,009
			Mitte	63,6	± 5,0	0,075	± 0,010
			Unten	63,0	± 5,3	0,075	± 0,009
Äquibrierung über 160 min. bei 4 °C ohne Mischung		Oben	56,6	± 3,9	0,072	± 0,007	
		Mitte	61,4	± 6,0	0,077	± 0,006	
		Unten	69,2	± 5,7	0,083	± 0,004	
Äquibrierung über 160 min. bei 4 °C mit Mischung		Oben	62,4	± 5,4	0,076	± 0,004	
		Mitte	62,0	± 4,7	0,075	± 0,004	
		Unten	62,2	± 5,0	0,076	± 0,005	

4.1.2 Einfluss unterschiedlicher Konfektionierungsabläufe, Verdüner und Verdünnungsgrade auf die Homogenität von Besamungsportionen

Zielstellung der Untersuchungen (siehe Pkt. 3.3.1.2, Versuch 1) war die Kontrolle der Spermienzahlen pro Paillette und der Spermaqualität in Pailletten aus dem Routineablauf der Spermaproduktion unter variierten Bedingungen der Spermaaufbereitung (zwei Verdüner, zwei Verdünnungsgrade pro Ejakulat).

Hinsichtlich der Spermienzahl pro Paillette wurden bei der Verdünnervariante Triladyl[®] (Vv-Triladyl[®]) keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Konfektionierungsabläufen gefunden (Tabelle 2). Das galt sowohl für die Konzentrationsvariante 7 Mio. Gesamtspermien/Paillette (Kv-7) als auch für die Konzentrationsvariante 14 Mio. Gesamtspermien/Paillette (Kv-14).

Tabelle 2: Spermienkonzentration pro Paillette (in Mio.) in der Verdünnervariante Triladyl[®] in Abhängigkeit vom Konfektionierungsablauf

Konfektionierungsablauf	Methode	n	7 Millionen Gesamtspermien/Paillette		14 Millionen Gesamtspermien/Paillette	
			MW	SD	MW	SD
Anfang			7,64	± 0,62	15,43	± 1,30
Erstes Drittel			7,68	± 0,61	15,47	± 1,28
Zweites Drittel	Zähl- kammer	10	7,64	± 0,63	15,47	± 1,28
Ende			7,64	± 0,69	15,46	± 1,22
Mittelwert			7,65	± 0,64	15,46	± 1,27
Anfang			8,78	± 1,01	18,42	± 1,69
Erstes Drittel			8,83	± 0,99	17,89	± 1,53
Zweites Drittel	Nucleo- counter [®]	5	8,59	± 0,83	18,20	± 1,60
Ende			8,73	± 0,90	17,59	± 1,52
Mittelwert			8,74	± 0,87	18,03	± 1,49

Die Unterschiede der Mittelwerte von 1,09 Mio./Paillette bei Kv-7 bzw. 2,57 Mio./Paillette bei Kv-14 wurden bei den zwei Untersuchungsmethoden (Zählkammer, Nucleocounter[®]) statistisch als niedrig signifikant befunden ($p=0,043$ bzw. $p=0,043$). Entsprechend streute der

Korrelationskoeffizient (r) zwischen den Untersuchungsmethoden bei der Kv-7 im Bereich von 0,338 ($p > 0,05$) bis 0,893 ($p = 0,041$) und bei der Kv-14 im Bereich von 0,490 ($p > 0,05$) bis 0,986 ($p = 0,002$).

Obwohl eine Spermienzahl von 7 Mio. bzw. 14 Mio./Paillette erwartet wurde, zeigten die Ergebnisse bei der Auszählung mit der Zählkammer einen Durchschnitt von 7,65 Mio./Paillette (7,13 - 9,43 Mio./Paillette) bzw. 15,46 Mio./Paillette (14,22 - 18,36 Mio./Paillette).

Bei der Verdünnervariante BioXcell[®] (Vv-BioXcell) zeigten die Proben hinsichtlich der Spermienzahl pro Paillette ebenfalls eine hohe Homogenität (Tabelle 3), insbesondere bei der Auszählung mit der Zählkammer. Aufgrund einer etwas höheren Standardabweichung war der Unterschied von 0,09 Mio. zwischen dem Anfang und dem ersten Drittel in der Kv-14 statistisch jedoch als niedrig signifikant einzuordnen ($p = 0,041$).

Bei der Kv-7 wurden die Unterschiede zwischen Anfang und erstem Drittel (0,04 Mio.) sowie zwischen Anfang und Ende (0,04 Mio.) aus der Nucleocounter[®]-Auswertung statistisch auch als niedrig signifikant ($p = 0,043$) eingeordnet (Tabelle 3). Der Korrelationskoeffizient zwischen Zählkammer- und Nucleocounter[®]-Ergebnissen lag hier im Bereich von 0,668 ($p > 0,05$) bis 0,956 ($p = 0,01$) für Kv-7 bzw. 0,548 ($p > 0,05$) bis 0,778 ($p > 0,05$) für Kv-14.

Tabelle 3: Spermienkonzentration pro Paillette (in Mio.) in der Verdünnervariante BioXcell[®] in Abhängigkeit vom Konfektionierungsablauf

Konfektionierungsablauf	Methode	n	7 Millionen		14 Millionen	
			Gesamtspermien/Paillette		Gesamtspermien/Paillette	
			MW	SD	MW	SD
Anfang	Zählkammer	10	7,21	± 0,15	14,56	± 0,53
Erstes Drittel			7,24	± 0,14	14,65	± 0,46
Zweites Drittel			7,21	± 0,15	14,57	± 0,49
Ende			7,21	± 0,11	14,55	± 0,48
Mittelwert			7,22	± 0,13	14,59	± 0,49
Anfang	Nucleocounter [®]	5	8,00	± 0,60	16,21	± 0,77
Erstes Drittel			7,68	± 0,42	15,95	± 2,07
Zweites Drittel			7,83	± 0,70	15,71	± 1,13
Ende			7,65	± 0,76	16,28	± 2,44
Mittelwert			7,79	± 0,60	16,03	± 1,61

Die Durchschnittswerte nach der Zählkammer-Auszählung lagen bei Vv-BioXcell® bei 7,22 Mio./Paillette (6,82 - 7,51 Mio./Paillette) bzw. 14,59 Mio./Paillette (13,95 - 15,64 Mio./Paillette). Es zeigte sich eine Übereinstimmung mit den Erwartungswerten.

Hinsichtlich der erfassten Motilitätsparameter bewegten sich die Unterschiede zwischen Proben der verschiedenen Konfektionierungsabläufe in den Grenzen der vertretbaren Toleranz von $\pm 10\%$ (Tabelle 4 und 5). Es wurden nur wenige statistisch signifikante Unterschiede ermittelt, z. B. bei dem Anteil motiler Spermien (% motil) wurde der Unterschied von 4,3 Prozentpunkten (8,5 %) zwischen dem zweiten Drittel und dem Ende der Vv-Triladyl®, Kv-7 als niedrig signifikant ($p=0,022$) befunden.

Tabelle 4: Motilitätswerte gefrierkonservierter Bullenspermien in Abhängigkeit vom Konfektionierungsablauf und Verdünnungsgrad, Verdünnervariante Triladyl® (10 Ejakulate)

Konfektionierungsablauf	Zeit (min.)	Parameter	7 Mio. Gesamtspermien/Paillette		14 Mio. Gesamtspermien/Paillette	
			MW	SD	MW	SD
Anfang	30	% motil	50,3	$\pm 9,4$	60,1	$\pm 11,1$
		% prog.motil	39,1	$\pm 10,9$	49,5	$\pm 12,5$
	120	% motil	41,4	$\pm 12,5$	48,1	$\pm 17,4$
		% prog.motil	31,9	$\pm 13,8$	38,1	$\pm 19,0$
Erstes Drittel	30	% motil	50,1	$\pm 11,6$	58,7	$\pm 12,7$
		% prog.motil	40,2	$\pm 11,6$	49,6	$\pm 13,3$
	120	% motil	38,6	$\pm 10,3$	48,1	$\pm 18,6$
		% prog.motil	28,2	$\pm 11,3$	37,5	$\pm 20,2$
Zweites Drittel	30	% motil	50,2	$\pm 13,1$	62,6	$\pm 11,1$
		% prog.motil	40,7	$\pm 13,1$	52,6	$\pm 11,7$
	120	% motil	39,3	$\pm 10,6$	47,9	$\pm 16,2$
		% prog.motil	26,9	$\pm 12,3$	37,7	$\pm 16,8$
Ende	30	% motil	45,9	$\pm 11,4$	59,1	$\pm 11,3$
		% prog.motil	35,7	$\pm 11,6$	49,3	$\pm 11,6$
	120	% motil	37,7	$\pm 11,1$	44,0	$\pm 15,6$
		% prog.motil	26,3	$\pm 11,5$	32,4	$\pm 16,9$

% motil – Anteil motiler Spermien; % prog. motil – Anteil progressiv motiler Spermien

Tabelle 5: Motilitätswerte gefrierkonservierter Bullenspermien in Abhängigkeit vom Konfektionierungsablauf und Verdünnungsgrad, Verdünnervariante BioXcell® (10 Ejakulate)

Konfektionierungsablauf	Zeit (min.)	Parameter	7 Mio. Gesamtspermien/Paillette		14 Mio. Gesamtspermien/Paillette	
			MW	SD	MW	SD
Anfang	30	% motil	50,4	± 15,2	58,3	± 14,8
		% prog.motil	47,2	± 14,8	52,2	± 14,3
	120	% motil	33,2	± 14,6	50,9	± 17,2
		% prog.motil	29,7	± 14,3	46,6	± 16,2
Erstes Drittel	30	% motil	52,2	± 14,9	62,4	± 16,6
		% prog.motil	49,1	± 15,1	57,1	± 16,3
	120	% motil	33,8	± 15,2	56,8	± 17,9
		% prog.motil	30,4	± 15,1	52,1	± 17,6
Zweites Drittel	30	% motil	52,6	± 14,7	61,1	± 13,4
		% prog.motil	49,1	± 14,8	56,1	± 13,2
	120	% motil	37,0	± 18,2	54,1	± 17,5
		% prog.motil	33,6	± 18,4	49,2	± 17,1
Ende	30	% motil	48,8	± 15,8	61,3	± 15,8
		% prog.motil	45,2	± 15,8	56,7	± 15,9
	120	% motil	35,3	± 17,7	53,5	± 14,0
		% prog.motil	32,0	± 17,1	48,8	± 14,3

% motil – Anteil motiler Spermien; % prog. motil – Anteil progressiv motiler Spermien

Bezüglich der Motilität traten die größten Unterschiede zwischen den Konzentrationsvarianten mit 7 und mit 14 Mio./Paillette auf (Tabelle 4 und 5). Bei der Verdünnervariante Triladyl® lagen die Motilitätswerte bei der Kv-14 im Durchschnitt um 11,0 Prozentpunkte ($p=0,005$) höher als die Werte bei der Kv-7. Bei der Verdünnervariante BioXcell® bewegten sich die Unterschiede durchschnittlich um 9,7 Prozentpunkte ($p=0,009$). Die Werte für den Anteil progressiv motiler Spermien verhielten sich gleich.

Hinsichtlich des Anteils plasmamembranintakter Spermien mit aktiven Mitochondrien wurde bei den Unterschieden zwischen den verschiedenen Konfektionierungsabläufen die 10 % Toleranz ebenfalls nicht überschritten (Tabelle 6). Der Unterschied von 8,8 % zwischen dem

zweiten Drittel und dem Ende der Konfektionierung bei der Vv-Triladyl[®], Kv-14 wurde statistisch als niedrig signifikant befunden (p=0,022).

Tabelle 6: Anteil plasmamembranintakter Spermien mit aktiven Mitochondrien in Abhängigkeit vom Konfektionierungsablauf, Verdünnervariante und Konzentrationsvariante (10 Ejakulaten)

Konfektionierungsablauf	Verdünnervariante Triladyl [®]				Verdünnervariante BioXcell [®]			
	7 Millionen		14 Millionen		7 Millionen		14 Millionen	
	Gesamtspermien/ Paillette		Gesamtspermien/ Paillette		Gesamtspermien/ Paillette		Gesamtspermien/ Paillette	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Anfang	11,6	± 4,1	23,2	± 9,4	21,5	± 11,4	23,8	± 10,7
Erstes Drittel	11,8	± 4,4	22,1	± 9,4	21,8	± 10,7	24,6	± 11,0
Zweites Drittel	11,7	± 4,0	23,7	± 8,9	22,0	± 10,5	24,8	± 10,8
Ende	10,7	± 3,9	21,6	± 8,3	20,2	± 10,8	23,7	± 10,0

Mittelwerte in %; Rodamin/Propidiumiodid-Färbung; Durchflusszytometrische Messung

Bei den Proben der Vv-Triladyl[®] wurde ebenfalls ein signifikanter (p<0,01) Unterschied zwischen den Kv-7 und Kv-14 festgestellt. In der Vv-BioXcell[®] bestand dieser Unterschied nicht.

4.2 Untersuchungen zum Temperaturregime und zu den Zeitabläufe bei der Spermaaufbereitung von der Phase der Spermaverdünnung bis zur Phase des Einfrierens

4.2.1 Einfluss unterschiedlicher Bedingungen bei der Zweitverdünnung auf die Spermaqualität

Mit diesem Versuch wurde der Einfluss von verschiedenen Temperaturregimen bei der Zweitverdünnung auf die Qualität des gefrierkonservierten Bullenspermas überprüft (siehe Pkt. 3.3.2.1).

In der Abbildung 7 sind die Temperaturverläufe im Bereich zwischen 30 und 4 °C bei der Spermaaufbereitung entsprechend der drei Varianten des Versuches dargestellt. Die Tempera-

turverläufe unterscheiden sich zwischen den Varianten A (BVN-Standard, siehe Pkt. 3.3.2.1) und B (Zweitverdünnung bei Raumtemperatur, siehe Pkt. 3.3.2.1) nur unerheblich. In der Variante A war die Zwischentemperierung im Wasserbad bei 23 °C deutlich daran zu erkennen, dass das vorverdünnte Sperma schneller abkühlte.

Bei der Variante C (Zweitverdünnung mit Verdüner auf 4 °C, siehe Pkt. 3.3.2.1) wurde das verdünnte Sperma durch den Zusatz des auf 4 °C gekühlten Verdünners eine schneller abgekühlt.

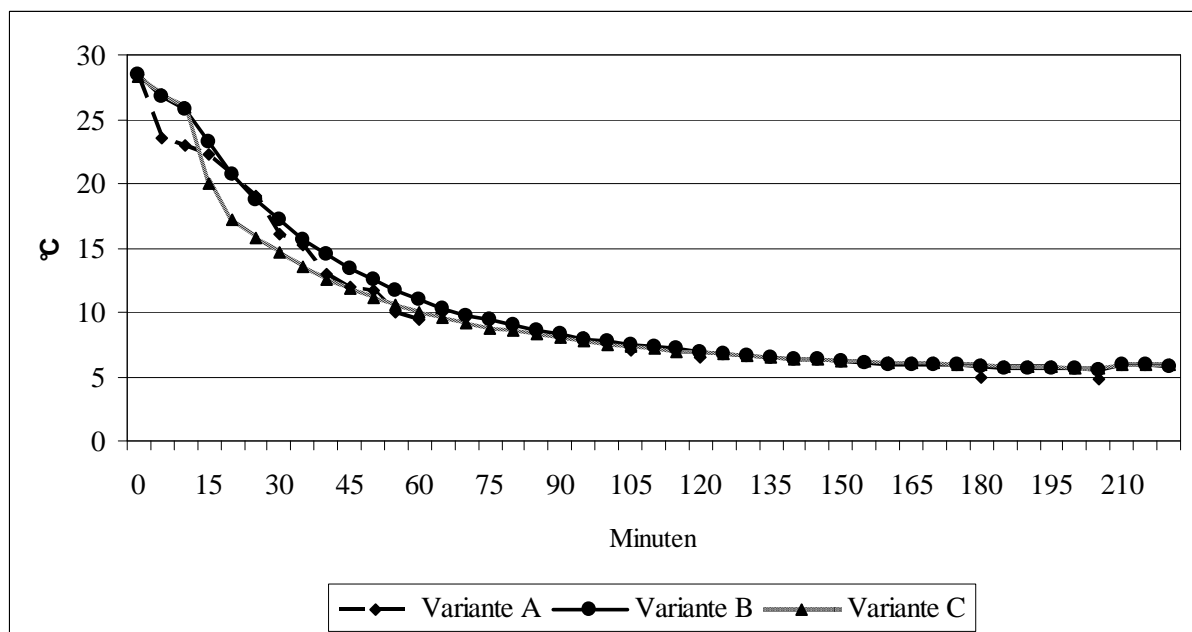


Abbildung 7: Temperaturverläufe im Bereich zwischen 30 und 4 °C bei der Spermaaufbereitung entsprechend den Temperierungsvarianten A, B und C (n = 20 Ejakulate)
 Variante A (BVN – Standard): Erstverdünnung bei 32 °C – 15 Minuten bei 23 °C – Zweitverdünnung bei 23 °C – verdünntes Sperma insgesamt 210 Minuten bei 4 °C – Konfektionieren bei 4 °C – Einfrieren
 Variante B (Zweitverdünnung bei Raumtemperatur): Erstverdünnung bei 32 °C – 15 Minuten bei Raumtemperatur – Zweitverdünnung bei Raumtemperatur (ca. 21 °C) – Lagerung des verdünnten Sperma für 210 Minuten bei 4 °C – Konfektionierung bei 4 °C – Einfrieren
 Variante C (Zweitverdünnung mit Verdüner bei 4 °C): Erstverdünnung bei 32 °C – 15 Minuten bei Raumtemperatur – Zweitverdünnung mit Verdüner auf 4 °C – Lagerung des verdünnten Spermas für 210 Minuten bei 4 °C – Konfektionierung bei 4 °C – Einfrieren

Die verschiedenen Temperaturregime bei der Zweitverdünnung des Spermas hatten im Durchschnitt keinen erheblichen Einfluss auf das Motilitätsverhalten der gefrierkonservierten

Spermien nach dem Auftauen (Tabelle 7). Die Unterschiede zwischen den Varianten waren nicht signifikant. Die Variante A zeigte mit 42,1 % progressiv motilen Spermien höhere Werte gegenüber den beiden anderen Varianten. Die Variante C erzielte mit 37,8 % progressiv motilen Spermien die niedrigsten Ergebnisse. Der Vergleich der Werte bei 30 und 120 Minuten nach dem Auftauen zeigte, dass sich der Anteil progressiv motiler Spermien bei allen drei Varianten um durchschnittlich 13,1 Prozentpunkte verringerte.

Tabelle 7: Motilitätswerte gefrierkonservierter Bullenspermien bei unterschiedlicher Spermaaufbereitung (20 Ejakulate von 4 Bullen, Varianten siehe Abbildung 7)

Variante	Zeit [min.]	% motil		% prog. Motil		VAP ($\mu\text{m/s}$)	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
A	30	48,9	$\pm 11,0$	42,1	$\pm 11,2$	65,6	$\pm 6,2$
	120	36,2	$\pm 14,4$	28,9	$\pm 14,6$	54,9	$\pm 4,7$
B	30	47,7	$\pm 11,2$	40,6	$\pm 11,2$	64,4	$\pm 6,3$
	120	35,1	$\pm 10,1$	27,5	$\pm 10,0$	54,4	$\pm 3,9$
C	30	45,6	$\pm 12,7$	37,8	$\pm 12,7$	65,5	$\pm 6,4$
	120	31,4	$\pm 13,2$	24,7	$\pm 12,6$	53,8	$\pm 3,9$

% motil – Anteil motiler Spermien; % prog. motil – Anteil progressiv motiler Spermien, VAP - mittlere Bahngeschwindigkeit

Die getrennte Analyse der Ergebnisse der zwei Bullengruppen, Gruppe 1 Bullen mit empirisch „guten“ Einfriereigenschaften und Gruppe 2 Bullen mit empirisch „schlechten“ Einfriereigenschaften, zeigte insbesondere in der Gruppe 2 etwas abweichende Ergebnisse (Tabelle 8). Die Durchschnittswerte der Einfriereigenschaften zeigten Vorteile bei der Gruppe 1. Für die Variante A wurden bei allen erfassten Motilitätsparametern signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Die Varianten B und C ließen nach 30 Minuten signifikante ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$) Unterschiede zwischen den Gruppen nur für den Parameter VAP (mittlere Bahngeschwindigkeit) erkennen. Einzeln zeigten die Ergebnisse der Gruppe 1 die gleiche Anordnung der Werte wie bei der Zusammenfassung beider Gruppen. Variante A mit 48,6 % progressiv motilen Spermien war auch hier die beste Variante. Der niedrigste Wert lag wiederum in Variante C (38,9 % progressiv motile Spermien) vor. Für die Gruppe 2

zeigte mit 38,9 % progressiv motilen Spermien die Variante B einige Vorteile gegenüber den Varianten C und A. Die Variante A ergab hier den niedrigsten Wert. Die Unterschiede zwischen den Varianten waren bei der Gruppe 2 jedoch weniger deutlich als bei der Gruppe 1. Während einer zweistündigen Inkubation nach dem Auftauen deutete sich ein höherer Motilitätsverlust bei der Gruppe 2 (44 % bzw. 23 % bei Gruppe 1, im Durchschnitt) an.

Tabelle 8: Motilitätswerte gefrierkonservierter Bullenspermien bei unterschiedlicher Spermaaufbereitung getrennt in zwei Gruppen (4 Bullen mit je 5 Ejakulaten, Varianten siehe Abbildung 7)

Gruppe	Variante	Zeit (min.)	% motil		% prog. motil		VAP ($\mu\text{m/s}$)	
			MW	SD	MW	SD	MW	SD
1	A	30	55,6	$\pm 8,7$	48,6	$\pm 9,7$	69,4	$\pm 5,8$
		120	46,6	$\pm 12,5$	39,3	$\pm 13,3$	55,7	$\pm 4,0$
	B	30	49,8	$\pm 11,2$	42,3	$\pm 11,6$	67,8	$\pm 5,3$
		120	37,9	$\pm 10,2$	30,8	$\pm 10,6$	54,8	$\pm 2,9$
	C	30	47,6	$\pm 11,2$	38,9	$\pm 12,2$	70,1	$\pm 3,9$
		120	36,2	$\pm 13,7$	30,0	$\pm 13,1$	54,5	$\pm 3,2$
2	A	30	42,2	$\pm 8,9$	35,5	$\pm 8,7$	61,7	$\pm 3,8$
		120	25,8	$\pm 6,6$	18,5	$\pm 6,1$	54,0	$\pm 5,4$
	B	30	45,6	$\pm 11,3$	38,9	$\pm 11,2$	60,9	$\pm 5,3$
		120	32,3	$\pm 9,8$	24,3	$\pm 8,8$	54,1	$\pm 4,8$
	C	30	43,7	$\pm 14,4$	36,7	$\pm 13,7$	60,8	$\pm 4,8$
		120	26,5	$\pm 11,3$	19,5	$\pm 10,1$	53,2	$\pm 4,6$

% motil – Anteil motiler Spermien; % prog. motil – Anteil progressiv motiler Spermien, VAP - mittlere Bahngeschwindigkeit

4.2.2 Einfluss unterschiedlicher Bedingungen der Äquilibration und des Konfektionierungszeitpunktes auf die Spermaqualität

In diesem Versuch sollte der Effekt des Abkühl- und des Konfektionierungsregimes bei der Spermaaufbereitung auf die Qualität des gefrierkonservierten Bullensperma überprüft werden.

Die Temperaturverläufe für die vier Varianten (siehe Pkt. 3.3.2.2) sind in Abbildung 8 dargestellt. Die Abkühlung des verdünnten Spermias im Bereich zwischen 23 und 16 °C sowie zwischen 16 und 4 °C wurde im Vergleich zur Äquilibration nach der Konfektionierung, d.h. in Pailletten langsamer, wenn das verdünnte Sperma im Pool äquilibriert war.

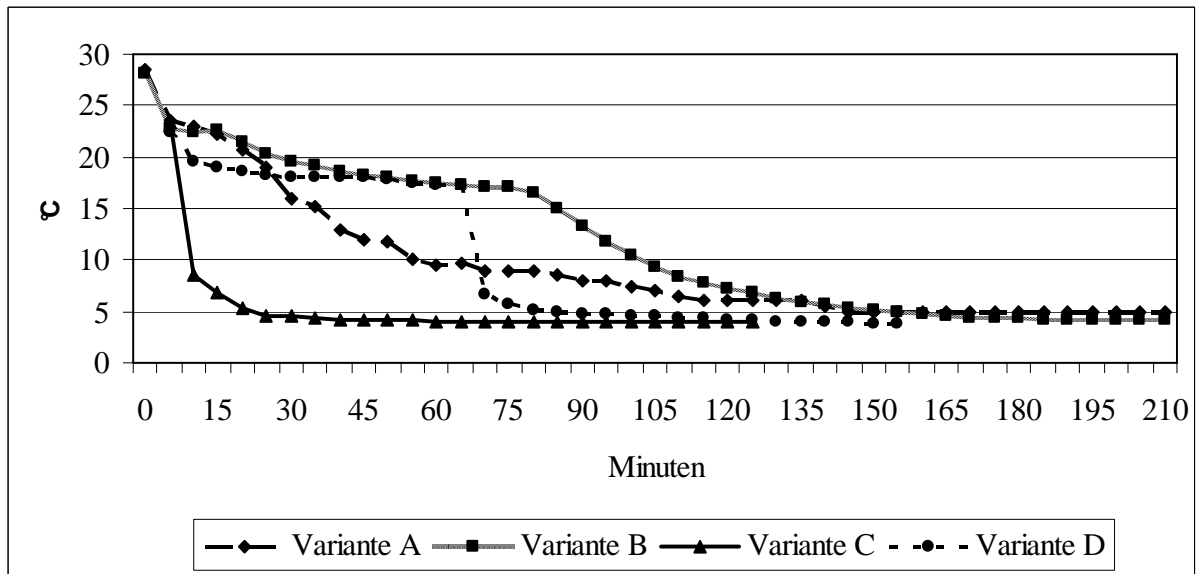


Abbildung 8: Temperaturverläufe im Bereich zwischen 30 und 4 °C bei der Spermaaufbereitung entsprechen den vier Varianten eines modifizierten Abkühl- und Konfektionierungsregime (20 Ejakulate)

Variante A (BVN – Standard, Konfektionierung nach Äquilibration): Lagerung des verdünnten Spermias für 210 Minuten bei 4 °C – Konfektionierung bei 4 °C – Einfrieren

Variante B (Zwischentemperierung, Konfektionierung nach Äquilibration): Lagerung des verdünnten Spermias für 60 Minuten bei 16 °C – weitere 150 Minuten bei 4 °C – Konfektionierung bei 4 °C – Einfrieren

Variante C (Konfektionierung vor Äquilibration): verdünntes Sperma 15 Minuten bei Raumtemperatur – Konfektionierung bei Raumtemperatur – Lagerung des konfektionierten Spermias für 210 Minuten bei 4 °C – Einfrieren

Variante D (Zwischentemperierung, Konfektionierung vor Äquilibration): verdünntes Sperma 15 Minuten bei Raumtemperatur – Konfektionierung bei Raumtemperatur – Lagerung des konfektionierten Spermias für 60 Minuten bei 16 °C – weitere 150 Minuten bei 4 °C – Einfrieren

Als beste Variante erwies sich die Variante A (BVN-Standard ohne Zwischentemperierung und mit Konfektionierung bei 4 °C nach der Äquilibration). Bei der Variante A betrug der Anteil progressiv motiler Spermien 39,3 % im Durchschnitt bei allen 20 Ejakulaten und lag damit am höchsten (Tabelle 9). Der niedrigste Wert wurde bei der Variante C mit 26,4 % pro-

gressiv motilen Spermien erreicht. Bei den Varianten B und D betrug der Anteil progressiv motiler Spermien 30,2 % bzw. 33,3 %. Zwischen allen Varianten gab es statistische Unterschiede ($p < 0,05$) beim Anteil motiler und progressiv motiler Spermien.

Der Abfall des Anteils progressiv motiler Spermien betrug während der zweistündigen Inkubation 27,4 % bei der Variante B und 43,5 % bei der Variante D. Bei den Varianten A und C verminderte sich der Anteil progressiv motiler Spermien um 33,5 % bzw. 41,6 %.

Tabelle 9: Motilitätswerte gefrierkonservierter Bullenspermien bei unterschiedlichen Äquilibrierungs- und Konfektionierungsbedingungen (20 Ejakulate von 4 Bullen, Varianten siehe Abbildung 8)

Variante	Zeit (min.)	% motil		% prog. motil		VAP ($\mu\text{m/s}$)	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
A	30	47,1	$\pm 11,7$	39,3	$\pm 11,5$	63,4	$\pm 6,0$
	120	33,1	$\pm 9,4$	26,1	$\pm 9,1$	52,8	$\pm 3,9$
B	30	37,7	$\pm 8,9$	30,2	$\pm 8,7$	63,5	$\pm 5,1$
	120	29,1	$\pm 7,5$	21,9	$\pm 6,4$	52,3	$\pm 4,3$
C	30	33,2	$\pm 9,9$	26,4	$\pm 9,3$	63,0	$\pm 6,1$
	120	21,9	$\pm 5,9$	15,4	$\pm 5,6$	53,0	$\pm 4,1$
D	30	40,9	$\pm 8,9$	33,3	$\pm 9,1$	63,3	$\pm 5,1$
	120	25,8	$\pm 7,6$	18,8	$\pm 7,3$	52,0	$\pm 4,6$

% motil – Anteil motiler Spermien; % prog. motil – Anteil progressiv motiler Spermien, VAP - mittlere Bahngeschwindigkeit

Bei der getrennten Analyse der Ergebnisse der zwei Bullengruppen, Bullen mit empirisch „guten“ Einfriereigenschaften (Gruppe 1) und Bullen mit empirisch „schlechten“ Einfriereigenschaften (Gruppe 2), wurde das gleiche Ergebnis festgestellt: Die Variante A mit 41,6 % (Gruppe 1) bzw. 37,0 % (Gruppe 2) progressiv motiler Spermien ergab die höchsten Werte und die Variante C mit 29,6 % bzw. 23,3 % progressiv motilen Spermien die niedrigsten Werte (Tabelle 10). Statistische Unterschiede ($p < 0,05$) im Anteil motiler und progressiv motiler Spermien gab es zwischen den Varianten A und B und C, bei der Gruppe 1 und bei der Gruppe 2 bei allen Varianten.

Zwischen den beiden Gruppen wurden statistische Unterschiede ($p < 0,01$) nur für den Parameter VAP festgestellt. Das galt für alle Varianten.

Tabelle 10: Motilitätswerte gefrierkonservierter Bullenspermien bei unterschiedlichen Äquibrierungs- und Konfektionierungsbedingungen getrennt für die zwei Gruppen (4 Bullen mit je 5 Ejakulaten, Varianten siehe Abbildung 8)

Gruppe	Variante	Zeit (min.)	% motil		% prog. motil		VAP ($\mu\text{m/s}$)	
			MW	SD	MW	SD	MW	SD
1	A	30	49,0	$\pm 13,6$	41,6	$\pm 13,2$	67,0	$\pm 4,1$
		120	35,0	$\pm 9,0$	28,6	$\pm 8,9$	52,8	$\pm 2,9$
	B	30	37,9	$\pm 9,4$	31,1	$\pm 9,3$	66,3	$\pm 5,3$
		120	29,9	$\pm 8,7$	23,4	$\pm 7,5$	52,5	$\pm 3,3$
	C	30	36,3	$\pm 10,7$	29,6	$\pm 10,3$	67,1	$\pm 5,0$
		120	24,4	$\pm 6,4$	18,2	$\pm 5,9$	54,5	$\pm 2,5$
	D	30	43,6	$\pm 10,2$	36,1	$\pm 10,8$	66,8	$\pm 3,3$
		120	28,6	$\pm 8,8$	22,0	$\pm 8,6$	53,1	$\pm 3,5$
2	A	30	45,3	$\pm 9,7$	37,0	$\pm 9,6$	59,8	$\pm 5,5$
		120	31,5	$\pm 9,9$	23,7	$\pm 9,2$	52,8	$\pm 4,9$
	B	30	37,5	$\pm 8,9$	29,4	$\pm 8,4$	60,6	$\pm 3,1$
		120	28,4	$\pm 6,6$	20,3	$\pm 5,0$	52,1	$\pm 5,3$
	C	30	30,0	$\pm 8,4$	23,3	$\pm 7,4$	59,0	$\pm 4,3$
		120	19,3	$\pm 4,2$	12,6	$\pm 3,9$	51,4	$\pm 4,8$
	D	30	38,2	$\pm 7,1$	30,4	$\pm 6,2$	59,8	$\pm 4,2$
		120	23,1	$\pm 5,3$	15,7	$\pm 4,3$	50,9	$\pm 5,5$

% motil – Anteil motiler Spermien; % prog. motil – Anteil progressiv motiler Spermien, VAP - mittlere Bahngeschwindigkeit

4.2.3 Einfluss der Äquibrierungsdauer auf die Spermaqualität

Mit diesem Versuch wurde untersucht, wie sich die Äquibrierungsdauer auf die Spermaqualität nach dem Auftauen auswirkt (siehe Pkt. 3.3.2.3).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Im Durchschnitt stiegen alle erfassten Motilitätsparameter von der Variante 1 Stunde Äquibrierungsdauer bis zur Variante 48 Stunde Äquibrierungsdauer kontinuierlich. Der Anteil progressiv motiler Spermien stieg von der Variante 1 Stunde Äquibrierungsdauer (18,4 %) um 10,1 Prozentpunkte auf 28,5 %

($p = 0,002$) bei der Variante 3 Stunden Äquilibrationsdauer und um weitere 7,4 Prozentpunkte bei der Variante 4 Stunden Äquilibrationsdauer ($35,9\%$, $p = 0,001$). Zwischen den Varianten 4 und 5 Stunden Äquilibrationsdauer blieb der Anteil progressiv motiler Spermien gleich. Bei der Variante 24 Stunden Äquilibrationsdauer stieg er jedoch um weitere 9,3 Prozentpunkten auf $45,0\%$ ($p = 0,005$) gegenüber der Variante 5 Stunden Äquilibrationsdauer. Bis zur Variante 48 Stunden Äquilibrationsdauer stieg der Anteil progressiv motiler Spermien noch einmal um 7,4 Prozentpunkte auf $52,4\%$ ($p = 0,017$) und erreichte damit den höchsten Wert.

Bezüglich der mittleren Bahngeschwindigkeit VAP wurde ein Anstieg um $6,0\ \mu\text{m/s}$ ($p = 0,01$) von $61,5\ \mu\text{m/s}$, Variante 1 Stunde Äquilibrationsdauer auf $67,5\ \mu\text{m/s}$ in Variante 24 Stunden Äquilibrationsdauer ermittelt. Der VAP-Wert blieb dann auch bei den Varianten 28 und 48 Stunden Äquilibrationsdauer gleich.

Der Anteil progressiv motiler Spermien verminderte sich während einer zweistündigen Inkubation nach dem Auftauen um $19,8\%$ am wenigstens bei der Variante 5 Stunden Äquilibrationsdauer und am stärksten um $44,0\%$ bei der Variante 1 Stunde Äquilibrationsdauer.

Bezüglich des Anteils lebender Spermien mit intaktem Akrosom, zeigte sich die gleiche Tendenz wie bei den Motilitätsparametern (Tabelle 12). Die Werte bewegen sich im Bereich von $24,7\%$ (Variante 1 Stunde Äquilibrationsdauer) bis $52,8\%$ (Variante 48 Stunden Äquilibrationsdauer, $p < 0,001$). Hier lassen sich signifikante Unterschiede zwischen den Varianten 1 und 3 Stunden Äquilibrationsdauer ($p < 0,001$), zwischen den Varianten 5 und 24 Stunden Äquilibrationsdauer ($p = 0,001$) und zwischen den Varianten 24 und 48 Stunden Äquilibrationsdauer ($p = 0,002$) feststellen.

Tabelle 11: Motilitätswerte gefrierkonservierter Bullenspermien nach unterschiedlicher Äquilibriumsdauer (16 Ejakulate von 4 Bullen)

Variante	Zeit (min.)	% motil		% prog. motil		VAP ($\mu\text{m/s}$)	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
1	30	26,3	$\pm 12,4$	18,4	$\pm 11,3$	61,5	$\pm 7,0$
	120	16,8	$\pm 8,8$	10,3	$\pm 7,2$	50,1	$\pm 8,1$
2	30	34,5	$\pm 15,9$	26,5	$\pm 15,7$	63,0	$\pm 6,5$
	120	24,0	$\pm 11,7$	17,0	$\pm 10,4$	52,6	$\pm 4,3$
3	30	37,3	$\pm 13,0$	28,5	$\pm 12,7$	64,7	$\pm 6,8$
	120	29,1	$\pm 10,8$	20,6	$\pm 9,6$	53,7	$\pm 5,0$
4	30	45,4	$\pm 11,5$	35,9	$\pm 11,9$	64,5	$\pm 5,5$
	120	34,2	$\pm 10,3$	26,0	$\pm 10,5$	53,2	$\pm 4,8$
5	30	45,0	$\pm 12,8$	35,7	$\pm 12,6$	65,3	$\pm 6,6$
	120	36,5	$\pm 11,0$	28,6	$\pm 10,3$	53,6	$\pm 4,6$
24	30	55,0	$\pm 11,5$	45,0	$\pm 12,4$	67,5	$\pm 5,5$
	120	39,8	$\pm 12,1$	31,3	$\pm 11,6$	54,2	$\pm 5,8$
28	30	57,9	$\pm 10,4$	48,1	$\pm 10,7$	67,3	$\pm 6,6$
	120	40,9	$\pm 14,0$	32,4	$\pm 13,8$	52,0	$\pm 6,6$
48	30	61,9	$\pm 12,3$	52,4	$\pm 13,1$	67,2	$\pm 5,9$
	120	43,6	$\pm 13,6$	34,3	$\pm 13,5$	52,3	$\pm 5,8$

% motil – Anteil motiler Spermien; % prog. motil – Anteil progressiv motiler Spermien, VAP - mittlere Bahngeschwindigkeit

Der gleiche positive Effekt im Vergleich zwischen der Variante mit 1 Stunde Äquilibriumsdauer (16,1 %) und der Variante mit 48 Stunden Äquilibriumsdauer (53,4 %) zeigte sich auch im Anteil plasmamembranintakter Spermien mit aktiven Mitochondrien (Tabelle 12).

Tabelle 12: Membran-, Akrosomen- und Mitochondrienzustand gefrierkonservierter Bullenspermien nach unterschiedlicher Äquilibrierungsdauer (16 Ejakulate von 4 Bullen)

Variante Äquilibrierungsdauer (h)	% lebende Spermien mit intaktem Akrosom		% lebende Spermien mit aktiven Mitochondrien	
	MW	SD	MW	SD
1	24,7	± 7,0	16,1	± 9,1
2	28,3	± 9,5	20,1	± 8,5
3	31,8	± 5,2	26,2	± 8,1
4	34,7	± 6,4	28,3	± 6,0
5	36,1	± 7,1	30,3	± 9,4
24	45,8	± 6,3	41,2	± 8,3
28	46,9	± 6,5	42,9	± 9,9
48	52,8	± 7,1	53,4	± 12,1

Zwischen den Anteilen motiler und progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen, Anteilen plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom und den Anteilen plasmamembranintakter Spermien mit aktiven Mitochondrien wurden hohe Korrelationen im Bereich von $r = 0,767$ bis $r = 0,889$ ($p < 0,01$) gefunden.

Betrachtet man die zwei Bullengruppen wieder getrennt voneinander, so lässt sich die gleiche Wirkung der Äquilibrierungsdauer wie bei den zusammengefassten Werten erkennen (Anhang 1 und 2). Unterschiede zwischen den Gruppen traten bezüglich VAP bei den Varianten mit 3 ($p = 0,001$), 4 ($p = 0,046$), 5 ($p = 0,027$), 28 ($p = 0,001$) und 48 Stunden Äquilibrierungsdauer ($p = 0,016$) auf.

Bezüglich des Anteils plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom und des Anteils plasmamembranintakter Spermien mit aktiven Mitochondrien wurden Unterschiede ($p < 0,05$) bei der Variante 48 Stunden Äquilibrierungsdauer festgestellt.

4.3 Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree® Premix zum Verdüner

4.3.1 Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree® Premix zu den Verdünnern Triladyl® und BioXcell®

In diesem Versuch wurden die Einflüsse des Verdünerzusatzes Oxyfree® auf Vitalitäts- und Fertilitätsparameter gefrierkonservierten Bullenspermas unter Verwendung von zwei Verdünnern (BioXcell® und Triladyl®) getestet (siehe Pkt. 3.3.3.1). Aus der Durchführung einer „Oxyfree“-freien Kontrolle und der eigentlichen Testvariante mit „Oxyfree®“ unter Verwendung des eidotterhaltigen Verdüners Triladyl® einerseits sowie des eidotterfreien Verdüners BioXcell® andererseits resultierten die vier folgenden Varianten:

- Triladyl® ohne Zusatz von Oxyfree® Premix (Variante 1)
- Triladyl® mit Zusatz von Oxyfree® Premix (Variante 2)
- BioXcell® ohne Zusatz von Oxyfree® Premix (Variante 3)
- BioXcell® mit Zusatz von Oxyfree® Premix (Variante 4)

Die Ergebnisse der Laborversuche sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Der Vergleich der vier Varianten miteinander ergab hinsichtlich des Anteils motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen einen signifikanten Unterschied ($p=0,013$) nur zwischen Variante 1 (43,3 %) und 2 (51,7 %). Der gleiche Parameter ergab 46,7 % für die Varianten 3 und 48,1 % für die Variante 4. Bezüglich des Anteils progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen war der Unterschied von 8,6 Prozentpunkten ($p=0,013$) zwischen Variante 1 (40,4 %) und Variante 2 (49,0 %) deutlicher als zwischen Variante 3 (45,0 %) und Variante 4 (46,8 %). Während einer zweistündigen Inkubation nach dem Auftauen verminderte sich der Anteil progressiv motiler Spermien hoch signifikant ($p\leq 0,001$) bei den Varianten 1, 2 und 3 (um 21,2 %; 25,5 % bzw. 21,7 %) und signifikant ($p=0,013$) bei der Variante 4 (um 9,1 %). Im Vergleich zwischen den Varianten war der Abfall signifikant ($p<0,01$) zwischen der Variante 4 und den anderen Varianten.

Betrachtet man den Parameter VAP (mittlere Bahngeschwindigkeit), so fällt auf, dass die Varianten 2 und 4 (mit Zusatz von Oxyfree[®]) im Vergleich zu den Varianten 1 und 3 (ohne Zusatz von Oxyfree[®]) eine deutlich höhere ($p=0,002$) Spermengeschwindigkeit zeigten (Tabelle 14).

Tabelle 13: Motilitätswerte gefrierkonservierten Bullensperma nach Verdünnung mit den Verdünnern Triladyl[®] und BioXcell[®], ohne und mit Zusatz von Oxyfree[®] (13 Ejakulate von 4 Bullen)

Variante	Zeit (min.)	% motil		% prog. motil	
		MW	SD	MW	SD
1 (Triladyl [®] ohne Oxyfree [®])	30	43,3	± 9,9	40,4	± 9,5
	120	33,8	± 11,8	31,8	± 11,5
2 (Triladyl [®] mit Oxyfree [®])	30	51,7	± 12,0	49,0	± 12,0
	120	38,8	± 16,4	36,5	± 15,9
3 (BioXcell [®] ohne Oxyfree [®])	30	46,7	± 11,4	45,0	± 11,6
	120	36,6	± 10,8	35,2	± 10,4
4 (BioXcell [®] mit Oxyfree [®])	30	48,1	± 11,3	46,8	± 11,1
	120	43,7	± 11,3	42,5	± 11,0

% motil – Anteil motiler Spermien; % prog. motil – Anteil progressiv motiler Spermien

Ebenfalls zeigten die Varianten 3 und 4 (BioXcell[®]) höhere Werte in der VAP als die Varianten 1 und 2 (Triladyl[®]). Die VAP-Werte zwischen den Varianten 2 (72,2 $\mu\text{m/s}$) und 4 (84,2 $\mu\text{m/s}$) unterschieden sich hoch signifikant ($p=0,001$). Die VAP-Werte verminderten sich während der zweistündigen Inkubation nach dem Autauen stärker ($p<0,01$) bei der Verdünnervariante Triladyl[®] als bei der Verdünnervariante BioXcell[®].

Der Parameter ALH (Amplitude of Lateral Head displacement, seitliche Kopfauslenkung) betrug bei den Varianten 1 und 3 (ohne Zusatz von Oxyfree[®]) 3,3 μm bzw. 2,9. Bei den Varianten 2 und 4 (mit Zusatz von Oxyfree[®]) stieg der ALH-Wert signifikant ($p<0,001$) auf 3,8 μm bzw. 4,1 μm (Tabelle 14). Der Vergleich der Variante 2 mit der Variante 4 ergab keinen signifikanten Unterschied. Ein deutlicher Abfall ($p<0,01$) des ALH-Wertes wurde wäh-

rend der zweistündigen Inkubation nach dem Auftauen nur bei der Variante 1 auffällig. Bei den anderen Varianten blieben die Werte unverändert.

Zwischen den Varianten 1 und 2 (Verdünnervariante Triladyl®) war hinsichtlich des BCF Parameters (Beat Cross Frequency, Häufigkeit der Überschreitung der mittleren Bahn) kein Unterschied erkennbar (27,9 µm bzw. 27,8 µm). Die Varianten 3 und 4 (Verdünnervariante BioXcell®) zeigten signifikant höhere ($p < 0,001$) BCF-Werte (34,3 µm bzw. 31,3 µm) als die Varianten 1 und 2. Die Differenz im Vergleich miteinander (Variante 3 und 4) war ebenfalls signifikant ($p = 0,011$) (Tabelle 14).

Tabelle 14: Geschwindigkeits- und Beweglichkeitsparameter gefrierkonservierten Bullenspermien nach Verdünnung mit den Verdünnern Triladyl® und BioXcell®, sowie ohne und mit Zusatz von Oxyfree® (13 Ejakulate von 4 Bullen)

Variante	Zeit (min.)	VAP (µm/s)		ALH (µm)		BCF (Hz)	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
1	30	64,6	± 7,1	3,3	± 0,4	27,9	± 1,1
	120	53,7	± 6,3	2,6	± 0,2	27,0	± 1,6
2	30	72,2	± 7,5	3,8	± 0,4	27,8	± 0,8
	120	66,1	± 8,7	3,6	± 0,3	27,5	± 1,2
3	30	68,6	± 12,9	2,9	± 0,6	34,3	± 3,0
	120	67,9	± 9,4	2,9	± 0,3	32,8	± 2,8
4	30	84,2	± 8,8	4,1	± 0,6	31,3	± 1,2
	120	83,5	± 7,5	4,1	± 0,3	30,3	± 0,9

VAP – Velocity averaged path, mittlere Bahngeschwindigkeit; ALH – Amplitude of Lateral Head Displacement, seitliche Kopfauslenkung; BCF – Beat Cross Frequency, Häufigkeit der Überschreitung der mittleren Bahn

In Bezug auf den Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom waren die Unterschiede von 4,7 Prozentpunkten zwischen Variante 1 (47,4 %) und 2 (52,1 %) sowie von 2,0 Prozentpunkten zwischen Variante 3 (44,4 %) und 4 (46,4 %) nicht signifikant (Tabelle 15). Ein signifikanter Unterschied ($p = 0,013$) wurde zwischen den Varianten 2 und 4 festgestellt. Zwischen dem Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom und dem Anteil motiler und progressiv motiler Spermien bestand eine hohe Korrelation ($r > 0,745$; $p < 0,01$).

Die Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach Bodipy-Färbung (pmiBodipy) zeigte eine steigende Tendenz während der vierstündigen Inkubation nach dem Auftauen bei alle vier Varianten (Tabelle 16). Der Unterschied zwischen den 15 Minuten-Werten und den 4 Stunden-Werten wurde nur bei Variante 3 als nicht signifikant befunden ($p > 0,05$). Die Varianten 3 und 4 (Verdünnervariante BioXcell[®]) wiesen höhere pmiBodipy-Werte ($p < 0,05$) auf als die Varianten 1 und 2 (Verdünnervariante Triladyl[®]). Analoge signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) bestanden hinsichtlich des Stimulationsindex (Differenz zwischen Fluoreszenzintensität mit und ohne Stimulation der Lipidperoxidation). Der Vergleich zwischen den Varianten 1 und 2 bzw. den Varianten 3 und 4 ergab in Bezug auf die pmiBodipy-Werte keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 15: Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom in gefrierkonserviertem Bullensperma nach Verdünnung mit den Verdünnern Triladyl[®] und BioXcell[®] ohne und mit Zusatz von Oxyfree[®] (13 Ejakulate von 4 Bullen)

Variante	% plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom	
	MW	SD
1 (Triladyl [®] ohne Oxyfree [®])	47,4	± 8,8
2 (Triladyl [®] mit Oxyfree [®])	52,1	± 9,4
3 (BioXcell [®] ohne Oxyfree [®])	44,4	± 8,9
4 (BioXcell [®] mit Oxyfree [®])	46,4	± 8,5

Die DCFH-Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien (pmiDCFH) stieg während der vierstündige Inkubation stetig. Bei alle vier Varianten wurden signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen dem 15-Minuten-pmiDCFH-Wert und dem 4-Stunden-pmiDCFH-Wert festgestellt (Tabelle 16). Wurde H₂O₂ zugesetzt stieg die pmiDCFH Fluoreszenzintensität signifikant ($p < 0,001$) im Vergleich zum Ausgangswert. Das wurde deutlicher bei den Varianten 3 (36,09) und 4 (29,19) im Vergleich zu den Varianten 1 (3,40) und 2 (4,07). Bezüglich des Fluoreszenzindex wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Verdünnervarianten Triladyl[®] (Varianten 1 und 2) und den Verdünnervarianten BioXcell[®] (Varianten 3 und 4) festgestellt, wobei auch hier in dem eidotterfreien Verdünner erheblich höhere Werte auftraten. Der Vergleich der Varianten mit (Varianten 2 und 4) und ohne Zusatz von Oxyfree[®] (Varianten 1 und 3) ergab keine signifikanten Unterschieden. Auffällig war,

dass bei der Variante 4 im Vergleich mit der Variante 3 niedrigere pmiDCFH-Werte auftraten, besonders bei den Messungen 15 Minuten mit Stimulation (36,09 bzw. 29,19; $p < 0,001$) und 4 Stunden (5,33 bzw. 3,88; $p < 0,01$).

Auch bei der DHR-Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien deuteten sich höhere Werte ($p < 0,01$) bei den Varianten 3 und 4 (Verdünnervariante BioXcell[®]) im Vergleich zu den Varianten 1 und 2 (Verdünnervariante Triladyl[®]) an (Tabelle 16). Zwischen den Varianten mit (Varianten 2 und 4) und ohne Zusatz von Oxyfree[®] (Varianten 1 und 3) bestanden bezüglich der pmiDHR-Werte keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 16: Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach Bodipy-, DCFH- und DHR-Färbung in gefrierkonserviertem Bullensperma nach Verdünnung mit den Verdünnern Triladyl® und BioXcell®, sowie ohne und mit Zusatz von Oxyfree® (13 Ejakulate von 4 Bullen)

Variante	Messzeit	pmiBodipy		pmiDCFH		pmiDHR	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
1	15 min.	0,64	± 0,05	0,75	± 0,06	0,80	± 0,30
	2 h	0,78	± 0,04	1,40	± 0,64	1,07	± 0,46
	4 h	0,83	± 0,06	1,73	± 0,92	1,00	± 0,41
	15 min +	0,90	± 0,06	3,40	± 0,91	1,87	± 0,67
	Index	0,26	± 0,05	2,65	± 0,88	1,07	± 0,51
2	15 min.	0,67	± 0,06	0,85	± 0,19	0,84	± 0,22
	2 h	0,84	± 0,10	1,33	± 0,70	1,10	± 0,35
	4 h	0,81	± 0,08	1,66	± 1,11	1,03	± 0,26
	15 min +	0,99	± 0,11	4,07	± 1,14	2,05	± 0,33
	Index	0,32	± 0,09	3,22	± 1,16	1,20	± 0,26
3	15 min.	1,09	± 0,44	2,47	± 0,23	1,87	± 0,59
	2 h	1,09	± 0,17	4,00	± 1,08	3,12	± 0,77
	4 h	1,17	± 0,15	5,33	± 1,16	4,18	± 0,68
	15 min +	2,75	± 0,82	36,09	± 8,46	7,63	± 2,21
	Index	1,66	± 0,94	33,62	± 8,45	5,75	± 1,82
4	15 min.	0,82	± 0,14	2,32	± 0,35	1,85	± 0,51
	2 h	1,08	± 0,23	3,47	± 1,27	3,00	± 0,59
	4 h	1,19	± 0,26	3,88	± 0,79	4,26	± 1,12
	15 min +	2,73	± 0,87	29,19	± 9,51	7,16	± 1,55
	Index	1,91	± 0,94	26,87	± 9,51	5,31	± 1,26

Messzeit: 15 min. – 15 Minuten Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermproben; 2 h – zwei Stunden Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermproben; 4 h – vier Stunden Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermproben; 15 min. + – 15 Minuten Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermproben mit Stimulation der ROS-Bildung durch Zusatz von Wasserstoffperoxid oder Butylhydroperoxid (für Bodipy-Färbung); Index – Fluoreszenzindex bzw. Differenz zwischen Fluoreszenzintensität mit und ohne Stimulation der ROS-Bildung

In einem mit gleichen Ejakulaten durchgeführten Besamungsversuch ließ sich kein deutlicher ($p > 0,05$) Einfluss des Oxyfree[®]-Zusatzes nachweisen (Tabelle 17). Es wurden insgesamt 2530 Erstbesamungen (EB) durchgeführt. Wegen einer zu geringen Zahl an Besamungen konnte bei dem Bullen D für die Variante 4 keine NRR90 ermittelt werden.

Tabelle 17: Befruchtungsergebnisse (NRR90) aus dem Besamungseinsatz von gefrierkonserviertem Bullensperma nach Verdünnung mit den Verdünnern Triladyl[®] und BioXcell[®], sowie ohne und mit Zusatz von Oxyfree[®] (10 Ejakulate von 4 Bullen)

Bulle	EB	Variante 1 Triladyl [®]	Variante 2 Triladyl [®] +Oxyfree [®]	Variante 3 BioXcell [®]	Variante 4 BioXcell [®] +Oxyfree [®]
A	701	61,8 %	62,1 %	60,0 %	61,4 %
B	911	73,9 %	71,5 %	68,5 %	63,5 %
C	630	66,3 %	60,2 %	59,8 %	57,8 %
D	288	67,6 %	47,6 %	61,1 %	-
Gesamt	2530	68,1 %	64,1 %	62,9 %	61,2 %

EB= Erstbesamung

Die höchste NRR90 wurde in der Variante 1 mit 68,1 % und die niedrigste in der Variante 4 mit 61,2 % erreicht. Die erfassten NRR90 für die Varianten 2 und 3 betragen 64,1 % bzw. 62,9 %. Zwischen den vier Varianten wurde kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der EB sowie NRR90 festgestellt. Die Varianten mit Zusatz von Oxyfree[®] zeigten etwas niedrigere NRR90-Ergebnisse, aber die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. Das galt für beide Verdünnervarianten.

Wie aus der Tabelle 17 weiterhin deutlich wird, liegen in der Verdünnervariante BioXcell[®] die erzielten NRR90 niedriger als in der Verdünnervarianten Triladyl[®]. Die Unterschiede sind aber statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Betrachtet man die NRR90 für die einzelnen Ejakulate, so konnte hinsichtlich der Varianten keine einheitliche Tendenz erkannt werden. Ursache dafür könnte die hohe Streuung der NRR90 zwischen den Ejakulaten sein, die von 47,2 % bis 75,9 % reichte (Anhang 3). Dazu passt auch, dass keine Korrelationen zwischen den NRR90 pro Ejakulat und den erfassten Parameter festgestellt werden konnten.

4.3.2 Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparameter nach Zusatz von Oxyfree® Premix zum Triladyl®-Verdünner und der Erhöhung des Verdünnungsgrades

In diesem Versuch wurde der Einfluss des Zusatzes von Oxyfree® Premix bei einer Erhöhung des Verdünnungsgrades auf die Vitalitäts- und Fertilitätsparameter gefrierkonservierten Bullenspermas untersucht (siehe Pkt. 3.3.3.2). Die Verdünnung erfolgte mit Triladyl®-Verdünner. Es wurden die beiden Verdünnungsvarianten 14 und 8 Millionen Gesamtspermien/Paillette miteinander verglichen. Daraus resultierten die vier folgenden Varianten:

- 14 Millionen Gesamtspermien/Paillette ohne Zusatz von Oxyfree® Premix (Variante 1)
- 8 Millionen Gesamtspermien/Paillette ohne Zusatz von Oxyfree® Premix (Variante 2)
- 14 Millionen Gesamtspermien/Paillette mit Zusatz von Oxyfree® Premix (Variante 3)
- 8 Millionen Gesamtspermien/Paillette mit Zusatz von Oxyfree® Premix (Variante 4)

Der Anteil motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen lag zwischen 43,6 % bei der Variante 2 und 54,2 % bei der Variante 3 (Tabelle 18). Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) bezüglich des Anteils motiler Spermien wurden zwischen der Variante 2 und allen anderen Varianten festgestellt.

Hinsichtlich des Anteils progressiv motiler Spermien erreichte die Variante 3 mit 49,9 % den höchsten Wert. Für die Varianten 1 und 4 lagen die gleiche Parameter bei 48,0 % bzw. 46,0 %. Der niedrigste Wert des Anteils progressiv motiler Spermien wurde in der Variante 2 (39,3 %) erzielt (Tabelle 18). Die Unterschiede von 8,7 Prozentpunkten zwischen den Varianten 1 und 2 und von 6,7 Prozentpunkten zwischen den Varianten 2 und 4 waren signifikant ($p < 0,001$). Zwischen den Varianten 1 und 3 und zwischen den Varianten 3 und 4 wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Während einer zweistündigen Inkubation nach dem Auftauen verminderte sich der Anteil progressiv motiler Spermien um 7,4 % bei der Variante 3 ($p = 0,024$) und um ca. 21 % bei den anderen Varianten ($p < 0,001$).

Tabelle 18: Motilitätswerte gefrierkonservierten Bullenspermien nach Verdünnung mit Triladyl® auf 14 bzw. 8 Millionen Gesamtspermien/Paillette ohne und mit Zusatz von Oxyfree® (6 Bullen, 24 Ejakulate)

Variante	Zeit (min.)	% motil.		% prog. motil	
		MW	SD	MW	SD
1 14 Mio. ohne	30	52,0	± 8,8	48,0	± 9,5
	120	43,0	± 11,5	39,3	± 11,8
2 8 Mio. ohne	30	43,6	± 8,8	39,3	± 8,9
	120	35,1	± 11,0	31,0	± 11,4
3 14 Mio. mit	30	54,2	± 9,2	49,9	± 9,5
	120	49,8	± 12,5	46,2	± 12,3
4 8 Mio. mit	30	51,0	± 9,9	46,0	± 9,8
	120	40,5	± 12,2	35,9	± 11,6

% motil – Anteil motiler Spermien; % prog. motil – Anteil progressiv motiler Spermien

Hinsichtlich der mittleren Bahngeschwindigkeit der Spermien (VAP) wiesen die Varianten 3 und 4 (mit Zusatz von Oxyfree®) signifikant ($p < 0,001$) höhere Werte auf als die Varianten 1 und 2 (ohne Zusatz von Oxyfree®) (Tabelle 19). Die Varianten 2 und 4 (8 Millionen Spermien/Paillette) zeigten generell höhere VAP-Werte als die Varianten 1 und 3 (14 Millionen Spermien/Paillette). Ein signifikanter ($p = 0,026$) Unterschied wurde nur zwischen den Varianten 3 und 4 festgestellt. Während einer zweistündigen Inkubation nach dem Auftauen stieg der VAP-Wert bei der Variante 3 leicht und sank nicht signifikant ($p > 0,05$) bei der Variante 4 und signifikant ($p \leq 0,001$) bei den Varianten 1 und 2 (ohne Zusatz von Oxyfree®).

Bezüglich der seitlichen Kopfauslenkung der Spermien (ALH) ergab der Vergleich der Varianten 1 und 2 (ohne Zusatz von Oxyfree®) mit den Variante 3 und 4 (mit Zusatz von Oxyfree®) signifikante ($p \leq 0,001$) Unterschiede (Tabelle 19). Die Variante 4 unterschied sich auch signifikant ($p < 0,01$) von der Variante 3. Zwischen den Varianten 1 und 2 wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Der ALH-Wert verminderte sich während einer zweistündigen Inkubation nach dem Auftauen deutlich ($p \leq 0,01$) bei den Varianten 1, 2 und 4 und stieg geringfügig bei der Variante 3.

Die Häufigkeit der Überschreitung der mittleren Bahn der Spermien (BCF) blieb bei allen vier Varianten fast konstant (Tabelle 19).

Tabelle 19: Geschwindigkeits- und Beweglichkeitsparameter gefrierkonservierten Bullenspermien nach Verdünnung mit Triladyl® auf 14 bzw. 8 Millionen Gesamtspermien/Paillette ohne und mit Zusatz von Oxyfree® (6 Bullen, 24 Ejakulate)

Variante	Zeit (min.)	VAP ($\mu\text{m/s}$)		ALH (μm)		BCF (Hz)	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
1 14 Mio. ohne	30	59,8	$\pm 5,3$	3,4	$\pm 0,2$	27,4	$\pm 1,8$
	120	54,8	$\pm 7,0$	2,9	$\pm 0,3$	26,4	$\pm 1,3$
2 8 Mio. ohne	30	62,0	$\pm 7,4$	3,3	$\pm 0,3$	27,5	$\pm 1,7$
	120	53,7	$\pm 8,4$	2,8	$\pm 0,4$	26,3	$\pm 2,0$
3 14 Mio. mit	30	67,1	$\pm 6,2$	3,7	$\pm 0,3$	27,6	$\pm 1,4$
	120	68,2	$\pm 7,4$	3,8	$\pm 0,3$	26,3	$\pm 1,2$
4 8 Mio. mit	30	70,7	$\pm 8,4$	3,9	$\pm 0,3$	27,7	$\pm 1,8$
	120	65,1	$\pm 12,4$	3,5	$\pm 0,4$	26,3	$\pm 3,2$

VAP – Velocity averaged path, mittlere Bahngeschwindigkeit; ALH – Amplitude of Lateral Head Displacement, seitliche Kopfauslenkung; BCF – Beat Cross Frequency, Häufigkeit der Überschreitung der mittleren Bahn

Der Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom streute zwischen 50,5 % bei der Variante 1 und 52,3 % bei der Variante 3 (Tabelle 20). Die Varianten 3 und 4 zeigten jedoch etwas höhere Werte als die Varianten 1 und 2. Zwischen den vier Varianten wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Zwischen dem Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom und dem Anteil motiler Spermien wurde eine Korrelation von $r = 0,779$ ($p < 0,001$) berechnet.

Tabelle 20: Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom in gefrierkonserviertem Bullensperma nach Verdünnung mit Triladyl® auf 14 bzw. 8 Millionen Gesamtspermie/Paillette ohne und mit Zusatz von Oxyfree® (6 Bullen, 24 Ejakulate)

Variante	% plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom	
	MW	SD
1 (14 Mio. ohne Oxyfree®)	50,5	$\pm 10,4$
2 (8 Mio. ohne Oxyfree®)	51,6	$\pm 7,9$
3 (14 Mio. mit Oxyfree®)	52,3	$\pm 9,4$
4 (8 Mio. mit Oxyfree®)	52,0	$\pm 10,3$

Der Vergleich der Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach Bodipy-Färbung (pmiBodipy) der vier Varianten ergab keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 21). Der pmiBodipy-Wert stieg während einer vierstündigen Inkubation nach dem Auftauen bei allen vier Varianten stetig ($p < 0,05$). Durch Stimulation der Lipidperoxidation mittels Butylhydroperoxid wurde der pmiBodipy-Wert bei allen Varianten deutlich erhöht ($p < 0,01$). Signifikante Unterschiede hinsichtlich des Fluoreszenzindex (Differenz mit und ohne Stimulation der Lipidperoxidation) wurden zwischen den Varianten 1 und 2 ($p = 0,036$) und zwischen den Varianten 2 und 4 ($p = 0,008$) festgestellt.

Es konnten keine Korrelationen zwischen der Spermienkonzentration und den pmiBodipy-Werten sowie zwischen der Behandlung (mit und ohne Zusatz von Oxyfree[®]) und den pmiBodipy-Werten festgestellt werden.

Wie aus der Tabelle 21 zu ersehen ist, nahm der Fluoreszenzindex der plasmamembranintakten Spermien nach DCFH-Färbung (pmiDCFH) während einer vierstündigen Inkubation nach dem Auftauen deutlich zu ($p \leq 0,001$). Signifikante ($p < 0,001$) Unterschiede wurden bei allen Varianten auch zwischen den pmiDCFH-Werten ohne und mit Stimulation der ROS-Bildung mittels Wasserstoffperoxid gefunden. Bezüglich des pmiDCFH-Fluoreszenzindex wurden signifikante ($p < 0,01$) Unterschiede zwischen den Varianten 1 und 2, zwischen den Varianten 3 und 4 sowie zwischen den Varianten 2 und 4 festgestellt.

Zwischen dem pmiDCFH-Fluoreszenzindex und der Spermienkonzentration pro Paillette konnte eine positive Korrelation ($r = 0,421$; $p < 0,001$) festgestellt werden. Zwischen dem gleichen Parameter und der Behandlung (mit und ohne Zusatz von Oxyfree[®]) wurde eine niedrigere Korrelation ($r = 0,255$; $p = 0,013$) ermittelt.

Die Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach DHR-Färbung zeigte signifikante ($p < 0,01$) Unterschiede zwischen den Varianten 1 und 2 und zwischen den Varianten 3 und 4 und nur geringfügige Unterschiede zwischen den Varianten 1 und 3 und zwischen den Varianten 2 und 4 (Tabelle 21). Während der ersten zweistündigen Inkubation nach dem Auftauen nahm der pmiDHR-Wert bei allen Varianten signifikant ($p < 0,01$) zu. Der 4 Stunden-pmiDHR-Wert stieg bei der Variante 1 und sank bei den anderen Varianten. Der Unterschied zwischen der pmiDHR-Fluoreszenzintensität mit und ohne Stimulation der ROS-Bildung mittels Wasserstoffperoxyd war bei allen vier Varianten signifikant ($p < 0,001$). Bezüglich des pmiDHR-Fluoreszenzindex wurden signifikante ($p < 0,01$) Unterschiede zwischen den Varianten 1 und 2 und zwischen den Varianten 2 und 4 festgestellt. Positive Korrelationen konnten

zwischen dem pmiDHR-Fluoreszenzindex und der Spermienkonzentration pro Paillette ($r = 0,301$; $p=0,003$) sowie zwischen dem pmiDHR-Fluoreszenzindex und der Behandlung (mit und ohne Zusatz von Oxyfree[®]) ($r = 0,289$; $p=0,005$) festgestellt werden.

Tabelle 21: Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach Bodipy-, DCFH- und DHR-Färbung in gefrierkonserviertem Bullensperma nach Verdünnung mit Triladyl[®] auf 14 bzw. 8 Millionen Gesamtspermien/Paillette ohne und mit Zusatz von Oxyfree[®] (6 Bullen, 24 Ejakulate)

Variante	Messzeit	pmiBodipy		pmiDCFH		pmiDHR	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
1 14 Mio. ohne	15 min.	0,88	± 0,37	0,98	± 0,29	1,70	± 0,66
	2 h	1,12	± 0,42	1,84	± 1,00	2,30	± 0,85
	4 h	1,32	± 0,56	2,22	± 1,16	2,54	± 1,47
	15 min. +	1,31	± 0,39	3,64	± 1,34	3,99	± 1,24
	Index	0,42	± 0,20	2,66	± 1,31	2,29	± 0,84
2 8 Mio. ohne	15 min.	0,81	± 0,23	0,87	± 0,31	1,29	± 0,58
	2 h	1,01	± 0,34	1,35	± 0,58	2,40	± 1,42
	4 h	1,13	± 0,23	1,58	± 0,63	1,87	± 0,92
	15 min. +	1,05	± 0,25	2,25	± 1,00	2,56	± 1,01
	Index	0,23	± 0,34	1,37	± 0,91	1,26	± 0,83
3 14 Mio. mit	15 min.	0,87	± 0,33	0,82	± 0,13	1,72	± 0,62
	2 h	1,10	± 0,45	1,44	± 0,63	2,67	± 1,45
	4 h	1,31	± 0,45	2,57	± 3,80	2,35	± 1,15
	15 min. +	1,32	± 0,42	3,94	± 1,17	4,69	± 2,19
	Index	0,45	± 0,43	3,11	± 1,13	2,96	± 1,98
4 8 Mio. mit	15 min.	0,85	± 0,21	0,78	± 0,17	1,33	± 0,37
	2 h	1,03	± 0,34	1,36	± 0,65	2,40	± 1,31
	4 h	1,22	± 0,37	1,56	± 0,54	1,86	± 0,69
	15 min. +	1,32	± 0,34	3,04	± 1,10	3,59	± 1,27
	Index	0,47	± 0,32	2,25	± 0,97	2,25	± 1,13

Messzeit: 15 min. – 15 Minuten Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermaproben; 2 h – zwei Stunden Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermaproben; 4 h – vier Stunden Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermaproben; 15 min. + – 15 Minuten Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermaproben mit Stimulation der ROS-Bildung durch Zusatz von Wasserstoffperoxid oder Butylhydroperoxid (für Bodipy-Färbung); Index – Fluoreszenzindex bzw. Differenz zwischen Fluoreszenzintensität mit und ohne Stimulation der ROS-Bildung

In einem mit den gleichen Ejakulaten durchgeführten Besamungsversuch ließ sich kein Einfluss der Versuchsvarianten nachweisen (Tabelle 22). Für diesen Versuch wurden insgesamt 5769 Erstbesamungen (EB) durchgeführt. Für diese EB wurde die Non-Return-Rate (NRR90 in %) pro Bulle und Variante errechnet. Die Anzahl der EB pro Bulle streute dabei von 147 EB bei dem Bullen A und bis 1754 EB bei dem Bullen D.

Im Durchschnitt der vier untersuchten Ejakulate lag die NRR90 zwischen 53,1 % bei dem Bullen A Variante 1 (14 Millionen Spermien/Paillette ohne Zusatz von Oxyfree®) und 70,6 % bei dem Bullen F Variante 2 (8 Millionen Spermien/Paillette ohne Zusatz von Oxyfree®) und Variante 3 (14 Millionen Spermien/Paillette mit Zusatz von Oxyfree®). Obwohl bei vier von sechs Bullen bei der Variante 2 (8 Millionen Spermien/Paillette ohne Zusatz von Oxyfree®) etwas bessere NRR90 als bei der Variante 1 (14 Millionen Spermien/Paillette ohne Zusatz von Oxyfree®) erzielt wurden, waren die Unterschiede zwischen den Varianten nicht signifikant.

Es konnten keine Korrelationen zwischen der NRR90 pro Ejakulat und den anderen untersuchten Parametern festgestellt werden.

Tabelle 22: Befruchtungsergebnisse (NRR90) aus dem Besamungseinsatz von gefrierkonserviertem Bullensperma nach Verdünnung mit den Verdünnern Triladyl® auf 14 bzw. 8 Millionen Gesamtspermien/Paillette ohne und mit Zusatz von Oxyfree® (6 Bullen, 20 Ejakulate)

Bulle	EB	Variante 1 14 Mio. ohne Oxyfree®	Variante 2 8 Mio. ohne Oxyfree®	Variante 3 14 Mio. mit Oxyfree®	Variante 4 8 Mio. mit Oxyfree®
A	147	53,1 %	67,5 %	55,3 %	61,2 %
B	810	63,4 %	66,1 %	65,1 %	62,2 %
C	853	63,4 %	68,6 %	64,5 %	66,3 %
D	1754	59,2 %	59,7 %	55,5 %	55,3 %
E	784	65,7 %	61,1 %	61,5 %	67,2 %
F	1421	68,6 %	70,6 %	70,6 %	68,2 %
Gesamt	5769	63,5 %	64,8 %	62,6 %	63,0 %

4.4 Untersuchungen zur Ermittlung des fertilitätsprognostischen Wertes der spermatischen Parameter der gefrierkonservierten Bullenspermien

Ziel dieses Versuches war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Motilitätsverhalten, dem Lipidperoxidationsstatus und anderen Vitalitätsparametern des gefrierkonservierten Bullenspermas und der Non-Return-Rate aufzuzeigen. Dafür wurden insgesamt 30 besamungstaugliche Ejakulate von zehn Bullen mit Triladyl[®]-Verdünner auf zehn Millionen Gesamtspermien pro Paillette verdünnt, tiefgefroren und für Laboruntersuchungen und Besamungsversuche verwendet (siehe Pkt. 3.3.4).

Für diese Versuche wurden die Primärdaten des CASA-Systems (SpermVision[®]) so umgerechnet und neu definiert, dass Motilitätswerte pro Spermienpopulationen resultierten.

In Tabelle 23 sind die Motilitätsparameter des originären und gefrierkonservierten Bullenspermas dargestellt. Die Werte der erfassten Motilitäts- und Geschwindigkeitsparameter lagen – mit Ausnahme der Anteile lokal motiler und kreisförmig progressiv motiler Spermien – bei dem gefrierkonservierten Sperma signifikant ($p \leq 0,036$) unter den Werten des originären Spermas. Nach dem Einfrieren und Auftauen stieg der Anteil lokal motiler Spermien signifikant ($p \leq 0,003$) und der Anteil kreisförmig progressiv motiler Spermien nicht signifikant ($p > 0,05$). Während einer zweistündigen Inkubation nach dem Auftauen sanken die dargestellten Werte der Motilitäts- und Geschwindigkeitsparameter signifikant ($p \leq 0,008$).

Der Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom lag nach Einfrieren und Auftauen deutlich ($p < 0,001$) unter dem Wert des originären Spermas (Tabelle 24). Der Anteil toter Spermien mit geschädigtem Akrosom stieg in gefrierkonserviertem Sperma um 37,6 Prozentpunkte ($p < 0,001$) und der Anteil toter Spermien mit intaktem Akrosom um 11,5 Prozentpunkte ($p < 0,001$).

Der Anteil plasmamembranintakter Spermien mit aktiven Mitochondrien betrug in gefrierkonserviertem Sperma nach dem Auftauen 33,1 % und der Anteil plasmamembranintakter Spermien (nach Propidiumiodid-Färbung und Messung mit NucleoCounter[®]) 48,8 % (Tabelle 24).

Tabelle 23: Motilitäts- und Geschwindigkeitsparameter in originärem und gefrierkonserviertem Bullensperma (10 Bullen, 30 Ejakulate)

Parameter	Zeit (min.)	Originäres Sperma		Gefrierkonserviertes Sperma	
		MW	SD	MW	SD
Mot_P (%)	30	74,7	± 11,1	47,5	± 11,7
	120	-	-	40,4	± 11,4
Mot_VAP (µm/s)	30	115,5	± 15,3	51,6	± 8,5
	120	-	-	36,6	± 7,2
Lok_Mot_P (%)	30	1,5	± 1,2	8,8	± 4,8
	120	-	-	14,4	± 4,7
Lok_Mot_VAP (µm/s)	30	22,9	± 13,9	16,3	± 3,1
	120	-	-	13,7	± 2,7
Prog_P (%)	30	73,2	± 11,0	38,6	± 12,0
	120	-	-	26,0	± 10,0
Prog_VAP (µm/s)	30	117,4	± 15,2	60,2	± 6,8
	120	-	-	49,7	± 6,2
Prog_VSL (µm/s)	30	99,6	± 15,7	45,2	± 5,1
	120	-	-	34,6	± 4,4
Prog_ALH (µm)	30	4,2	± 0,7	3,7	± 0,3
	120	-	-	3,4	± 0,3
Prog_BCF (Hz)	30	39,1	± 3,6	25,7	± 2,3
	120	-	-	22,4	± 3,1
Lin_P (%)	30	62,7	± 13,1	29,8	± 9,1
	120	-	-	19,6	± 7,7
Lin_VAP (µm/s)	30	118,9	± 15,5	62,1	± 7,4
	120	-	-	50,1	± 7,0
Kreis_P (%)	30	3,6	± 2,6	3,9	± 1,9
	120	-	-	3,1	± 1,7
Hyper_P (%)	30	6,7	± 6,5	2,2	± 1,5
	120	-	-	0,6	± 0,5

Mot_P – Anteil motiler Spermien; Prog_P – Anteil progressiv motiler Spermien; Lin_P – Anteil linear progressiv motiler Spermien; Kreis_P – Anteil kreisförmig progressiv motiler Spermien; Hyper_P – Anteil hyperaktiv progressiv motiler Spermien; VAP – Velocity averaged path, mittlere Bahngeschwindigkeit der jeweiligen Spermienpopulation; ALH – Amplitude of Lateral Head Displacement, seitliche Kopfauslenkung der jeweiligen Population ; BCF – Beat Cross Frequency, Häufigkeit der Überschreitung der mittleren Bahn der jeweiligen Population

Zwischen dem Anteil plasmamembranintakter Spermien, dem Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom und dem Anteil plasmamembranintakter Spermien mit aktiven Mitochondrien wurden signifikante ($p < 0,001$) Unterschiede festgestellt. Kein signifikanter Unterschied ließ sich zwischen dem Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom und dem Anteil plasmamembranintakter Spermien mit aktiven Mitochondrien ermitteln.

Tabelle 24: Membran-, Akrosomen- und Mitochondrienzustand gefrierkonservierten Bullenspermas (10 Bullen, 30 Ejakulaten)

Parameter	Originäres Sperma		Gefrierkonserviertes Sperma	
	MW	SD	MW	SD
Leb_Int_Ak (%)	73,9	± 11,9	29,6	± 5,4
Tot_Int_Ak (%)	8,1	± 6,1	19,6	± 6,4
Tot_Ges_Ak (%)	12,8	± 6,4	50,4	± 7,3
Leb_Mito_Ak (%)	-	-	33,1	± 10,7
Membran Intakt (%)	-	-	48,8	± 12,9

Leb_Int_AK – Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom; Tot_Int_Ak – Anteil toter Spermien mit intaktem Akrosom; Tot_Ges_Ak – Anteil toter Spermien mit geschädigtem Akrosom; Leb_Mito_Ak – Anteil plasmamembranintakter Spermien mit aktiven Mitochondrien

In gefrierkonserviertem Sperma lagen die Werte der Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach Bodipy- und DHR-Färbung signifikant ($p < 0,05$) unter den Werten im originären Sperma und nach DCFH-Färbung war das nicht der Fall (Tabelle 25). Während einer vierstündigen Inkubation nach dem Auftauen stieg die Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien bei allen drei Färbungen signifikant ($p \leq 0,001$). Der Anstieg der Fluoreszenzintensität wurde auch nach Stimulation der ROS-Bildung mittels Wasserstoff- oder Butylhydroperoxid deutlich ($p \leq 0,001$).

Der DNA-Fragmentationsindex (DFI) in aufgetautem Sperma betrug im Durchschnitt für alle Ejakulate 7,9 % und schwankte zwischen 3,1 % und 17,8 % (Tabelle 25).

Tabelle 25: Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach Bodipy-, DCFH- und DHR-Färbung und Chromatinstrukturstatus (DFI) in gefrierkonserviertem Bullensperma (10 Bullen, 30 Ejakulate)

Parameter	Messzeit	Originäres Sperma		Gefrierkonserviertes Sperma	
		MW	SD	MW	SD
pmiBodipy	15 min.	1,37	± 1,11	0,75	± 0,20
	2 h	-	-	0,86	± 0,17
	4 h	-	-	0,96	± 0,14
	15 min. +	-	-	0,98	± 0,22
	Index	-	-	0,23	± 0,21
pmiDCFH	15 min.	1,13	± 0,45	1,04	± 0,36
	2 h	-	-	1,53	± 0,81
	4 h	-	-	2,13	± 0,79
	15 min. +	-	-	3,34	± 1,18
	Index	-	-	2,29	± 1,15
pmiDHR	15 min.	1,82	± 1,26	1,34	± 0,59
	2 h	-	-	1,79	± 0,57
	4 h	-	-	2,11	± 0,71
	15 min. +	-	-	3,26	± 1,16
	Index	-	-	1,91	± 0,77
DFI (%)	30 min	-	-	7,9	± 4,3

Messzeit: 15 min. – 15 Minuten Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermaproben; 2 h – zwei Stunden Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermaproben; 4 h – vier Stunden Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermaproben; 15 min. + – 15 Minuten Inkubation bei 37 °C nach dem Auftauen der Spermaproben mit Stimulation der ROS-Bildung durch Zusatz von Wasserstoffperoxid oder Butylhydroperoxid (für Bodipy-Färbung); Index – Fluoreszenzindex bzw. Differenz zwischen Fluoreszenzintensität mit und ohne Stimulation der ROS-Bildung; DFI – DNA-Fragmentationsindex

In einem mit den gleichen Ejakulaten durchgeführten Besamungsversuch wurden insgesamt 11.967 Erstbesamungen (EB) durchgeführt (Tabelle 26). Die Anzahl der durchgeführten EB pro Ejakulat streute zwischen 189 und 711. Die erfasste Non-Return-Rate nach 90 Tagen (NRR90) pro Bulle streute zwischen 56,5 % (Bulle C) und 68,1 % (Bulle E). Die höchste NRR90 pro Ejakulat wurde mit 69,2 % vom Bullen E und die niedrigste NRR90 mit 54,3 % vom Bullen C erreicht. Die durchschnittliche NRR90 für alle 30 Ejakulate betrug 61,7 %. Hinsichtlich der NRR90 wurde ein signifikanter ($p=0,008$) Unterschied zwischen den Bullen

festgestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Ejakulaten eines Bullen festgestellt.

Tabelle 26: Befruchtungsergebnisse (NRR90) aus dem Besamungseinsatz von gefrierkonserviertem Bullensperma nach Verdünnung mit dem Verdünner Triladyl[®] auf 10 Millionen Gesamtspermien/Paillette (10 Bullen, 30 Ejakulate)

Bulle	Anzahl Erstbesamungen	NRR90
A	1023	63,3 %
B	1496	65,4 %
C	1188	56,5 %
D	906	60,7 %
E	1373	68,1 %
F	650	62,7 %
G	1268	63,2 %
H	1312	60,1 %
I	1113	60,4 %
J	1638	56,7 %
Gesamt	11967	61,7 %

Die signifikanten Korrelationen, die zwischen der NRR90 und den spermatologischen Merkmalen gefunden wurden, sind in der Tabelle 27 dargestellt. Von den Parametern, die am originären Sperma erhoben wurden, korrelierte nur der Parameter VAP für die gesamte Spermienpopulation mit der NRR90 ($r = 0,386$; $p = 0,035$). Die Parameter Linearity (LIN; VSL/VCL), Straightness (STR; VSL/VAP) und Wobble (WOB; VAP/VCL) der progressiv motilen Spermien, die vom gefrierkonservierten Sperma 30 Minuten nach dem Auftauen erfasst wurden, korrelierten negativ mit NRR90. Die höchsten Korrelationskoeffizienten wurden zwischen NRR90 und dem Anteil der nichtlinearen progressiv motilen Spermien ($r = 0,508$; $p = 0,004$) sowie der Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach DCFH-Färbung nach 15 Minuten Inkubation ($r = 0,478$; $p = 0,008$) ermittelt.

Tabelle 27: Korrelationen (r) zwischen spermatologischen Parameter und der Non-Return-Rate (NRR90) (10 Bullen, 30 Ejakulate)

Parameter	Korrelationskoeffizient (r)	Signifikanzniveau (p)
Gesamt VAP_originär	0,386	0,035
Prog_VAP_30	0,408	0,025
Prog_VCL_30	0,466	0,010
Prog_LIN_30	- 0,445	0,014
Prog_STR_30	- 0,413	0,023
Prog_WOB_30	- 0,367	0,046
Lin_VAP_30	0,440	0,015
NotLin_P_30	0,508	0,004
Kreis_P_30	0,424	0,020
Prog_BCF_120	0,394	0,031
Kreis_P_120	0,393	0,032
pmiDCFH_15	0,478	0,008

VAP – velocity averaged path der jeweiligen Spermienpopulation; VCL - velocity curvilinear path der jeweiligen Spermienpopulation; BCF – Beat Cross Frequency der jeweiligen Spermienpopulation; LIN – Linearity VSL/VCL; STR – Straightness VSL/VAP; WOB – Wobble VAP/VCL; Prog_ –progressiv motiler Spermien; Lin_ – linear progressiv motiler Spermien; NotLin_P – Anteil nichtlinear progressiv motiler Spermien; Kreis_P – Anteil kreisförmig progressiv motiler Spermien; pmiDCFH – Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach DCFH-Färbung; _15 – nach 15 Minuten Inkubation nach dem Auftauen; _30 – nach 30 Minuten Inkubation nach dem Auftauen; _120 – nach 120 Minuten Inkubation nach dem Auftauen; _originär – originäres Sperma

Im Folgenden wurde in einem multiplen linearen Regressionsmodell geprüft, welche Spermaqualitätsparameter entsprechend dem mathematischen Modell den größten Einfluss auf die Befruchtungsdaten haben und welche Kombinationen von Variablen eine maximale Vorhersage der Fertilität (NRR) ermöglicht. Für das Regressionsmodell wurde die Methode „Stepwise“ verwendet. In diesem Modell werden die Variablen schrittweise auf ihre Eignung für die Schätzung der abhängigen Variablen überprüft. Auf jeder Stufe wird für die neu aufgenommene Variable und für die bereits im Modell befindlichen Variablen das Signifikanzkriterium für Aufnahme (SLENTY – level) und Ausschluss (SLSTAY – level) geprüft. Dieser Prozess wird so lange fortgesetzt, bis keine Variable mehr aufgenommen bzw. ausgeschlossen werden kann. Die Vorhersagewahrscheinlichkeit sollte dann mindestens 65 % betragen.

Für die Motilitätsparameter des originären Spermias konnte auf diese Weise kein geeignetes Modell gefunden werden.

Bei Anwendung auf das gefrierkonservierte Sperma erwiesen sich drei Modelle als geeignet. In das erste Regressionsmodell wurden alle mittels CASA – System erfassten Parametern mit einbezogen. Das Signifikanzniveau wurde bei 0,10 für SLENTY und 0,15 für SLSTAY festgelegt. Als signifikante Prädiktoren (Variablen) gingen in diese Analyse folgende Parameter ein: ALH der progressiv motilen Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen (Prog_ALH_30); Anteil nichtlinear progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen (NotLin_P_30); Anteil kreisförmig progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen (Kreis_P_30); Anteil hyperaktiv progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen (Hyper_P_30); Wobble (VAP/VCL) progressiv motiler Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen (Prog_WOB_120) und VAP der linear progressiv motilen Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen (Lin_VAP_120). Anhand der Regressionsanalyse ließ sich eine Schätzformel zur Bestimmung der NRR erstellen.

$$\begin{aligned} \text{NRR (geschätzt)} = & 71,878 + 7,152 \times \text{Prog_ALH_30} + 4,071 \times \text{NotLin_P_30} + \\ & 1,287 \times \text{Kreis_P_30} - 2,881 \times \text{Hyper_P_30} - 37,076 \times \\ & \text{Prog_WOB_120} - 0,326 \times \text{Lin_VAP_120} \end{aligned}$$

Die Differenz zwischen der NRR90 und der mittels dieser Formel geschätzten NRR blieb unter 5 Prozentpunkten (0,01 % – 4,74 %) bei einer Vorhersageleistung von 66,3 % (korrigiertes R², p<0,001).

In einem weiteren Modell mit den gleichen Parametern bei einem Signifikanzniveau von 0,15 für SLENTY und 0,20 für SLSTAY blieben 14 Parameter in der Schätzformel. Die Differenz zwischen der NRR90 und der mit der neuen Formel geschätzten NRR blieb unter zwei Prozentpunkten (0,02 % - 1,88 %) bei einer Vorhersageleistung von 93,2 % (korrigiertes R², p<0,001). In diesem Modell blieben letztlich folgende Parameter übrig: Anteil progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; ALH der progressiv motilen Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; Straightness (STR) der progressiv motilen Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; Anteil linear progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; Anteil nichtlinear progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; Anteil kreisförmig progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; Anteil hyperaktiv progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; VAP der lokal motilen Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; VCL der progressiv motilen Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen; Wobble (WOB) der progressiv motilen Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen; Anteil lokal motiler Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen; VAP der lokal

motilen Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen; Anteil nichtlinear progressiv motiler Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen und VAP der nichtlinear progressiv motilen Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen.

$$\begin{aligned} \text{NRR (geschätzt)} = & 55,183 - 1,325 \times \text{Prog_P_30} + 7,602 \times \text{Prog_ALH_30} + \\ & 85,362 \times \text{Prog_STR_30} + 1,092 \times \text{Lin_P_30} + 6,986 \times \\ & \text{NotLin_P_30} + 3,258 \times \text{Kreis_P_30} - 2,738 \times \text{Hyper_P_30} + \\ & 0,640 \times \text{LokMot_VAP_30} - 0,242 \times \text{Prog_VCL_120} - 97,965 \times \\ & \text{Prog_WOB_120} - 0,226 \times \text{LokMot_P_120} - 0,818 \times \\ & \text{LokMot_VAP_120} + 1,789 \times \text{NotLin_P_120} + 0,062 \times \\ & \text{NotLin_VAP_120} \end{aligned}$$

In einem dritten Modell wurden alle für dieses Versuchssperma erfassten Parameter einbezogen. In dieser Analyse blieben letztlich folgende 14 Parameter übrig: Straightness (STR) der progressiv motilen Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; Anteil linear progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; VAP der nichtlinear progressiv motilen Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; VAP der kreisförmig progressiv motilen Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen; VAP der hyperaktiv progressiv motilen Spermien; Anteil progressiv motiler Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen; Straightness (STR) der progressiv motilen Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen; BCF der progressiv motilen Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen; ALH der progressiv motilen Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen; Anteil linear progressiv motiler Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen; Anteil kreisförmig progressiv motiler Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen; Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach DHR-Färbung nach fünfzehnminütiger Inkubation nach dem Auftauen; Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach DCFH-Färbung nach zweistündiger Inkubation nach dem Auftauen und Fluoreszenzindex nach DCFH-Färbung.

Die Schätzformel für diese Regressionsgleichung lautet:

$$\begin{aligned} \text{NRR (geschätzt)} = & 69,788 - 37,154 \times \text{Prog_STR_30} - 0,311 \times \text{Lin_P_30} - 0,095 \times \\ & \text{NotLin_VAP_30} + 0,128 \times \text{Kreis_VAP_30} - 0,040 \times \\ & \text{Hyper_VAP_30} - 1,433 \times \text{Prog_P_120} + 42,051 \times \\ & \text{Prog_STR_120} + 0,978 \times \text{Prog_BCF_120} - 5,509 \times \\ & \text{Prog_ALH_120} + 1,323 \times \text{Lin_P_120} + 3,242 \times \text{Kreis_P_120} - \end{aligned}$$

$$2,170 \times \text{DHR}_{15} + 2,826 \times \text{DCFH}_2 - 1,633 \times \text{DCFH_Index}$$

Die Differenz zwischen der NRR90 und der anhand der dritten Formel geschätzten NRR streute zwischen 0,04 und 3,5 Prozentpunkte bei einer Vorhersageleistung von 79,7 % (korrigiertes R^2 , $p < 0,001$).

5 Diskussion

5.1 Untersuchung der Homogenität von Besamungsportionen gleicher Ejakulate hinsichtlich Spermienzahl und Spermaqualität

Ziel des ersten Abschnitts dieser Arbeit war es, die Homogenität von Besamungsportionen aus dem Routineablauf einer Bullenbesamungsstation hinsichtlich Spermienzahl und Spermiovitalität zu prüfen. Grund waren einige Literaturangaben (Bollwein 2005, 2007), welche auf mögliche Inhomogenitäten hinwiesen. Die immer wieder in der Besamungspraxis beobachtete Problematik, dass bei der routinemäßigen Spermauntersuchung Pailletten unterschiedlicher Qualität gefunden werden oder schwankende Befruchtungsergebnisse auftreten, sind andere Gründe für diesen Abschnitt.

Von den möglichen Ursachen für Inhomogenitäten hinsichtlich der Spermienzahl pro Paillette stehen der Vermischungsprozess bei der Spermaverdünnung und eventuelle Sedimentationseffekte im verdünnten Sperma in Vordergrund. Die bei den eigenen Versuchen bzw. in der Besamungsstation Neustadt a. d. Aisch routinemäßig angewendete Äquilibration des verdünnten Spermas „im Pool“ bei 4 °C über mehrere Stunden, d. h. also unter Bedingungen, unter denen es durchaus zu einer Sedimentation der temperaturimmobilisierten Spermien (Appell et al. 1977) kommen kann, ist wenig verbreitet. Das kann der Grund sein, warum zum Sedimentationsverhalten von Bullenspermien während der verschiedenen Phasen der Spermaaufbereitung keine Literatur gefunden wurde. In der Literatur ist die Spermis sedimentation nur als Methode zur Isolierung der Spermien für IVF oder andere spezielle Untersuchungen beschrieben (Gledhill 1988, Kobayashi et al. 2004, Krzanowski 1970, Risopatrón et al. 1996).

Anhand des durchgeführten Versuchs konnte belegt werden, dass Bullenspermien während der Äquilibrationszeit bei 4 °C sedimentieren können. Nach einem sorgfältigen Durchmischen, das üblicherweise erfolgt, konnte die Inhomogenität beseitigt werden. Dadurch wird die Prämisse für die gleiche Spermienzahl in alle Besamungsportionen geschaffen. Die Art des Durchmischens spielte dabei keine Rolle. Der Sedimentationseffekt wurde in beiden genutzten Verdünnern, die sich im Eidottergehalt unterschieden, festgestellt. Aufgrund der verschiedenen Messverfahren bzw. Messeinheiten bei der Kontrolle der Spermienzahlen konnten

die zwei Verdüner jedoch hinsichtlich des Grades der Sedimentation nicht miteinander verglichen werden.

In dem Hauptversuch dieses Abschnittes (siehe Pkt. 3.3.1.2 und Pkt. 4.1.2) konzentrierte sich die Untersuchung auf die Unterschiede zwischen den Besamungsportionen eines Ejakulates und weniger auf die Unterschiede zwischen den Ejakulaten. Die Spermienzahl pro Paillette wurde anhand einer klassischen (Zählung mittels Thoma-Zählkammer) und einer modernen Methode (elektronische Zellzählung, NucleoCounter[®] SP 100) bestimmt. Bei keiner der Verdünnungs- (7 Millionen/Paillette bzw. 14 Millionen/Paillette) und Verdünnervarianten (Triladyl[®] bzw. BioXcell[®]) traten zwischen den Pailletten eines Ejakulates Unterschiede auf, die eine 10 % Toleranz überschritten. Der Toleranzbereich resultierte aus Erfahrungswerten der Routine von Besamungsstationen.

Anzumerken ist, dass es sich um Untersuchungsmaterial aus einer Bullenbesamungsstation handelte. Bollwein (2007) fand höhere Unterschiede hinsichtlich der Spermienzahl pro Paillette zwischen den Besamungsportionen eines Ejakulates (Variationskoeffizient 23,1 %), die allerdings abhängig von der Bullenbesamungsstation waren.

Die Spermaqualität nach dem Auftauen wurde durchflusszytometrisch und mittels CASA-System erfasst. Es wurden hinsichtlich der Spermaqualität keine Unterschiede zwischen den Besamungsportionen eines Ejakulates gefunden, die sich nicht in den Grenzen der vertretbaren Toleranz von $\pm 10\%$ bewegten. Zwischen den zwei Verdünnern, Triladyl[®] bzw. BioXcell[®] konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Das Hauptergebnis dieses Abschnittes ist der Beweis, dass bei ordnungsgemäßer Aufbereitung des Spermas die Qualität der Pailletten eines Ejakulates hinsichtlich Spermienzahl und Vitalität der aufgetauten Spermien homogen ist. Bei keinem erfassten Parameter traten Differenzen zwischen Varianten auf, die aus unterschiedlichen Zeiträumen des Konfektionierungsablaufes resultierten. Dieses galt sowohl für die Aufbereitung in dem eidotterhaltigen Verdüner Triladyl[®], als auch für die Aufbereitung in dem eidotterfreien Verdüner BioXcell[®], sowie für Verdünnungsgrade, die zu 14 oder 7 Millionen Gesamtspermien/Paillette führten.

Geht man davon aus, dass – so wie es bei den eigenen Versuchen der Fall war – Einfrier- und Auftaubedingungen standardisiert sind, kann sichergestellt werden, dass von den Besamungsstationen qualitativ einheitliche Ejakulatschargen für die Besamungspraxis zur Verfügung gestellt werden können.

Hinsichtlich der erfassten Vitalitätsparameter wurden, insbesondere bei Ejakulaten, die von verschiedenen Bullen gewonnen waren, Unterschiede zwischen den Ejakulaten nachgewiesen. Da die Ergebnisse sich mit einigen früheren Arbeiten (Köss et al 2005, Prathalingam et al. 2006) deckten, wurde die Untersuchung in diese Richtung nicht weiter verfolgt. Wie erwartet ergab die Messung der Spermienmotilität nach 120 Minuten niedrigere Werte als nach 30 Minuten.

Die größten Unterschiede traten zwischen den Varianten mit 14 bzw. 7 Millionen Spermien/Paillette auf. Das betraf sowohl die Motilität als auch die Zellmembranintegrität sowie die Mitochondrienaktivität. Erwartungsgemäß lagen die Vitalitätswerte bei der Variante mit 7 Millionen Spermien/Paillette z. T. deutlich unter denen der Variante mit 14 Millionen Spermien/Paillette. Dabei wurde der Einfluss des Verdünners bei der Ermittlung des Prozentsatzes plasmamembranintakter Spermien besonders deutlich. Dagegen fanden Prathalingam et al. (2006) keine signifikanten Unterschiede zwischen Spermaproben mit 10 bzw. 60 Millionen Spermien/Paillette hinsichtlich der Zellmembranintegrität und des Osmotikresistenztests.

Bei den Proben, die mit dem eidotterhaltigen Verdünner Triladyl[®] verdünnt worden waren, wurde ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Proben mit 7 Millionen bzw. 14 Millionen Spermien/Paillette gefunden. Beim eidotterfreien Verdünner BioXcell[®] lagen die Unterschiede zwischen den Proben mit 7 bzw. 14 Millionen Spermien/Paillette dagegen im Mittel nur bei 2,9 %. Die Unterschiede zwischen den Verdünnervarianten lassen sich mit der Beeinträchtigung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen durch Eidotterpartikel erklären. Bei den Motilitätswerten war der Verdünnereinfluss nicht so ausgeprägt. Es deuteten sich jedoch auch hier etwas bessere Werte für die BioXcell[®]-Variante an. Insgesamt entsprachen die Differenzen zwischen den beiden Verdünnungsvarianten und der Einfluss der Verdüner den Ergebnissen früherer Untersuchungen (Nehring und Rothe 2003, Sehner 2005).

5.2 Untersuchungen zum Temperaturregime und zu den Zeitabläufen bei der Spermamaufbereitung von der Phase der Spermaverdünnung bis zur Phase des Einfrierens

5.2.1 Einfluss unterschiedlicher Bedingungen bei der Zweitverdünnung auf die Spermaqualität

Es ist bekannt, dass die Abkühlungsrate des verdünnten Spermas von ca. 30 °C auf 4 °C ein wichtiger Faktor bei der Gefrierkonservierung von Bullensperma ist (Chaveiro et al. 2006, Woelders und Malva 1998, Woelders und Chaveiro 2004). In diesem Abschnitt wurde der Effekt verschiedener Abkühlungsraten während des Routineablaufes der Bullenspermproduktion untersucht. Weitere Versuche galten dem Einfluss des Konfektionierungszeitpunktes und der Äquilibrierungsdauer bei 4 °C auf die Vitalität der Spermien nach dem Auftauen.

Die geprüften unterschiedlichen Temperaturregime bei der Zweitverdünnung des Spermas hatten keinen erheblichen Einfluss auf die Spermiovitalität nach dem Auftauen. Alle Differenzen zwischen den Varianten waren nicht signifikant. Die Variante mit einer definierten stufenweisen Abkühlung (von 32 °C auf 23 °C und Zweitverdünnung bei 23 °C) zeigte jedoch leichte Vorteile gegenüber den beiden anderen Varianten. Eine Zwischentemperierung bei Raumtemperatur, wie sie in vielen Besamungsstationen angewandt wird, erscheint aber auch vertretbar. Auch andere Arbeiten (Chaveiro et al. 2006, Dhimi et al. 1992, Januskauskas et al. 1999, Woelders und Chaveiro 2004) belegen, dass in diesem Temperaturbereich eine langsame Abkühlung des verdünnten Spermas Vorteile gegenüber einer schnelleren Abkühlung zeigt. Die Variante, bei der die Abkühlung des verdünnten Spermas bereits durch eine Zweitverdünnung mit einem auf 4 °C gekühlten Verdüner eingeleitet war, ergab die schlechtesten Ergebnisse und erscheint damit ungeeignet.

Eine schnellere Abkühlung des vorverdünnten Spermas im Bereich von 32 °C bis 23 °C, die im Wasserbad bei 23 °C erreicht wurde, zeigte einige Vorteile gegenüber einer etwas langsameren Abkühlung, die bei Raumtemperatur erreicht wurde. Diese Ergebnisse spiegeln die optimale Abkühlungskurve, die von Woelders und Chaveiro (2004) dargestellt wurde, wieder. Die eigenen Laboruntersuchungen weisen darauf hin, dass die Proben von verschiedenen Bullen unterschiedlich auf die Abkühlungsrate im Bereich von 32 °C bis 23 °C reagieren. So kann die Abkühlung des Spermas zwischen Vor- und Endverdünnung bei Raumtemperatur

leichte Vorteile bezüglich der Spermiovitalität nach dem Auftauen für einigen Bullen mit empirisch „schlechten“ Einfriereigenschaften bringen.

5.2.2 Einfluss unterschiedlicher Bedingungen der Äquilibration und des Konfektionierungszeitpunktes auf die Spermaqualität

Im zweiten Teil dieses Abschnittes konnte gezeigt werden, dass eine Konfektionierung des verdünnten Spermas nach der Äquilibration bei 4 °C bessere Motilitätswerte nach dem Auftauen erbringt als die Abfüllung in Pailletten bereits vorher bei Raumtemperatur. Begründung für diesen Befund könnte die schnellere Abkühlgeschwindigkeit des verdünnten Spermas in Pailletten sein. In Gegensatz zu den Ergebnissen von Chaveiro et al. (2006) waren in den eigenen Untersuchungen die Unterschiede der Spermiovitalität nach dem Auftauen zwischen langsamerer und schnellerer Abkühlung deutlicher ausgeprägt.

Eine Zwischentemperierung von 60 Minuten in dem kritischen Temperaturbereich um 16 °C hat widersprüchliche Ergebnisse erbracht. Die Äquilibration in Pailletten hatte in diesem Fall eine leicht positive Tendenz auf die Spermienmotilität nach dem Auftauen. Die Motilitätswerte des aufgetauten Spermas aus den beiden Varianten mit Zwischentemperierung bei 16 °C blieben jedoch insgesamt signifikant unter den Werten aus der Variante Konfektionierung nach Äquilibration ohne Zwischentemperierung. Dies bestätigten die Ergebnisse anderer Arbeiten, welche ebenfalls feststellten, dass eine sehr schnelle Abkühlung (Abkühlrate über 1 °C/Minute), sowie eine sehr langsame Abkühlung (Abkühlrate unter 0,2 °C/Minute) des verdünnten Bullensperma einen deutlich negativen Effekt auf die Spermienmotilität nach dem Auftauen hat (Chaveiro et al. 2006, Dhimi et al. 1992, Januskauskas et al. 1999, Woelckers und Chaveiro 2004).

5.2.3 Einfluss der Äquilibrationdauer auf die Spermaqualität

Neben der Abkühlung des verdünnten Spermas auf 4 °C ist die Äquilibration bei 4 °C für mehrere Stunden vor dem Einfrieren ein weiterer wichtiger Punkt der Gefrierkonservierung des Bullenspermas. Die Dauer der Äquilibration ist immer wieder sowohl unter biologischen

als auch arbeitsorganisatorischen Gesichtspunkten ein kontroverses Thema (Dhami et al. 1992; Vishwanath und Shannon 2000). Die meist benutzten Protokolle der Gefrierkonservierung von Bullensperma beinhalten eine Äquilibrierungsdauer von drei bis vier Stunden. Die Empfehlungen einer optimalen Äquilibrierungsdauer variieren zwischen zwei (Wiggin und Almquist 1975) und 18 Stunden (Foote und Kaproth 2002; Muiño et al. 2007). Die am meisten benutzten Gefrierkonservierungsprotokolle beinhalten eine Äquilibrierungsdauer von drei bis vier Stunden (Kupferschmied 1993).

Bei den eigenen Versuchen wurden acht Varianten mit Äquilibrierungszeiten von einer bis 48 Stunden miteinander verglichen. Es soll noch einmal darauf verwiesen werden, dass die Äquilibrierung des verdünnten Spermias im „Pool“ erfolgte und die Gesamtspermienzahl/Paillette 12 Millionen betrug. Alle ausgewerteten Vitalitätsparameter zeigten in Übereinstimmung, dass mit zunehmender Dauer der Äquilibrierung bei 4 °C die Vitalitätswerte der gefrierkonservierten Spermien nach dem Auftauen ansteigen.

Obwohl die Streuungen zwischen den Varianten und den Ejakulaten hoch sind und die verschiedenen Vitalitätsparameter sich nicht immer gleich verhalten, lassen sich hinsichtlich der Äquilibrierungsdauer einige Schlussfolgerungen ziehen. Bei der Gefrierkonservierung von Bullensperma beeinflusst die Äquilibrierungsdauer die Motilität der Spermien und die Intaktheit von Zell- und Akrosomenmembran lebender Spermien nach dem Auftauen. Die Werte steigen zwischen eine Stunde und 48 Stunden Äquilibrierungsdauer an. Eine Äquilibrierungsdauer unterhalb von zwei Stunden ist zu kurz, um optimale Auftauwerte zu erhalten. Im Bereich zwischen drei bis fünf Stunden Äquilibrierungsdauer gibt es leicht ansteigende Auftauwerte. Die Differenzen sind gering, allerdings nur z. T. statistisch gesichert. Die übliche Verfahrensweise, die von einer Mindestäquilibrierungsdauer von drei Stunden ausgeht, ist damit bestätigt. Auch nach einer Äquilibrierung über 24 – 48 Stunden lassen sich noch gute Auftauwerte erzielen.

Foote und Kaproth (2002) fanden kleine, aber signifikant bessere Auftauwerte nach 18 Stunden Äquilibrierungsdauer im Vergleich zu einer vierstündigen Äquilibrierungsdauer. Im Feldversuch wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der NRR56 zwischen den beiden Äquilibrierungsvarianten festgestellt. Für die Versuche benutzten die Autoren einen vollmilchhaltigen Verdünner.

Die Glycerolaufnahme durch die Spermien erfolgt sehr schnell (Berndtson und Foote 1969, De Leeuw et al. 1993). Da Muiño et al. (2007) feststellten, dass im Fall eines eidotterfreien

Verdünners eine längere Äquilibrierungsdauer nicht den gleichen positiven Effekt hatte, scheint die Wechselwirkung der Lipoproteine des Eidotters mit der Spermienmembran möglicherweise der entscheidende zeitabhängige Effekt zu sein.

In wieweit der positive Effekt einer längeren Äquilibrierungsdauer sich auch positiv auf die Besamungserfolge auswirkt, ist in weiteren Untersuchungen zu klären.

5.3 Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree[®] Premix zum Verdünner

Die Anwesenheit und Bildung von „reaktiven Sauerstoff-Spezies“ (Sauerstoffradikale, ROS) spielen eine wichtige Rolle für die Spermienphysiologie und die Befruchtungsfähigkeit. Man ist sich darüber einig, dass die ROS in physiologischen Konzentrationen an der Spermienkapazitation und Auslösung der Akrosomreaktion beteiligt sind (Aitken 1995, O`Flaherty et al. 1999; Rivlin et al. 2004; Stefanov et al. 2004). In erhöhten Konzentrationen führen die ROS zu Funktionseinschränkungen der Spermien, vor allem zu Motilitätsverlusten und verminderter Fertilität (Aitken 1994, Aitken et al. 1996, Armstrong et al. 1999, Bilodeau et al. 2000; Breininger et al. 2005, Brouwers und Gadella 2003, O`Flaherty et al. 1999). Während der Gefrierkonservierung von Bullensperma, insbesondere während des Einfrierens und Auftauens, steigt die ROS-Konzentration im Sperma (Chatterjee und Gagnon 2001; Morani et al. 2004). Um Spermien gegen eine Schädigung durch ROS während des Gefrierkonservierungsprozesses zu schützen, versucht man seit einigen Jahre, den Verdünnungsmedien Antioxidantien zu zusetzen (Bilodeau et al. 2001, 2002, Borges et al. 2004, Foote et al. 2002, Sehner 2005). Da milchhaltige Verdünner weniger verbreitet sind und hier ein Antioxidanzienzusatz auch keine Verbesserung der Qualität bringt (Foote et al. 2002), konzentrierte man sich mehr auf eidotterhaltige Verdünner, die laut Bilodeau et al. (2002) eine eingeschränkte antioxidative Kapazität besitzen.

5.3.1 Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparameter nach Zusatz von Oxyfree® Premix zu den Verdünnern Triladyl® und BioXcell®

In eigenen Versuchen wurde das neu auf dem Markt eingeführte antioxidantienhaltige Premix (Oxyfree® Premix, IMV Frankreich) für Bullensamen verwendet. Im ersten Teil dieses Abschnitts liegt das Hauptaugenmerk auf der Fragestellung, inwieweit ein Zusatz von Oxyfree® Premix eine bessere Spermaqualität nach dem Auftauen bedingt. Außerdem wurde untersucht, ob die Befunde sich bei Verwendung eidotterhaltiger oder eidotterfreier Verdüner unterscheiden.

Der dazu durchgeführte eigene Laborversuch bestätigte die in anderen Studien beschriebene (Bilodeau et al. 2001; Stefanov et al. 2004) Steigerung der Spermienmotilität durch einen Zusatz von Antioxidantien. Der Anstieg des Anteils motiler und progressiv motiler Spermien war beim eidotterhaltigen Verdüner Triladyl® deutlicher. Beim eidotterfreien Verdüner BioXcell® war der Motilitätsanstieg nach Zusatz von Oxyfree® nicht signifikant. Das steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Gerard et al. (2007). Diese fanden einen signifikanten Motilitätsanstieg nach Zusatz von Oxyfree® nur im Fall des Verdüners BioXcell® und nicht signifikant bei einem eidotterhaltigen Verdüner. In Übereinstimmung mit Gerard et al. (2007) wurden durch Zusatz von Oxyfree® die Spermigeschwindigkeit und die seitliche Kopfauslenkung unabhängig vom Verdüner signifikant erhöht. Der Oxyfree®-Zusatz zeigte einen positiven Effekt auch hinsichtlich des Anteils plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom. Dieser Effekt war wiederum bei dem Verdüner Triladyl® deutlicher.

Der Zusatz von Antioxidantien brachte bessere Auftauwerte auch bei Schafbock- (Santiani et al. 2004) und Hundesperma (Michael et al. 2007). Baumber et al. (2005) fanden dagegen keine Verbesserung der Auftauwerte des Pferdspermas nach Zusatz von Antioxidantien.

Durch weitere Laboruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass während einer vierstündigen Inkubation des aufgetauten Spermas, der oxidative Stress und die Lipidperoxidation kontinuierlich steigen. Zu gleichen Ergebnissen kamen auch Baarz (2006), Ball et al. (2001a), Heczko (2004) und Sreejith et al. (2006). Durch den Zusatz von Oxyfree® konnte der Anstieg von oxidativem Stress und Lipidperoxidation bei dem Verdüner BioXcell® geringfügig gedämpft werden. Bei der Verdünnervariante Triladyl® hatte der Zusatz von Oxyfree® nicht den gleichen Effekt. Hier stiegen die Werte im Vergleich zur Kontrollvariante ohne Oxyfree® so-

gar leicht an. Generell zeigen die BioXcell[®]-Varianten höhere Werte für oxidativen Stress und Lipidperoxidation als die Triladyl[®]-Varianten.

Unabhängig von dem Antioxidanzienzusatz konnte bezüglich des Vergleichs zwischen einem eidotterhaltigen und einem eidotterfreien Verdüner noch einmal belegt werden, dass die Anteile motiler und progressiv motiler Spermien und die Spermengeschwindigkeit in einem eidotterfreien Verdüner höher sind (Aires et al. 2003, Gil et al. 2000, Janett et al. 2005, Nehring und Rothe 2003, Sehner 2005). So ermittelten Amirat et al. (2005) höhere Spermengeschwindigkeiten in Proben, die mit einem eidotterhaltigen Verdüner verdünnt waren. Thun et al. (2002) beobachteten bei allen untersuchten Laborparametern bessere Ergebnisse in der eidotterhaltigen Variante als in einer eidotterfreien Variante. Die eigenen Untersuchungen belegen ebenfalls, dass die Spermien der eidotterhaltigen Verdünnervariante eine größere seitliche Kopfauslenkung und somit ein vergleichsweise verändertes Bewegungsmuster haben.

Der Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom war höher in der Verdünnervariante Triladyl[®]. Das stimmt überein mit den Ergebnissen von Janett et al. (2005), Muiño et al. (2005), Thun et al. (2002). Herold et al. (2003) und Sehner (2005) beobachteten dagegen keinen Unterschied zwischen eidotterhaltigen und eidotterfreien Verdünnern hinsichtlich des Anteils lebender Spermien.

Der eidotterhaltige Verdüner Triladyl[®] zeigte eine höhere antioxidative Kapazität im Vergleich zum eidotterfreien Verdüner BioXcell[®]. Die Werte für oxidativen Stress und Lipidperoxidation waren in der Verdünnervariante Triladyl[®] niedriger signifikant als in der Verdünnervariante BioXcell[®]. Eine Stimulation des oxidativen Stresses mittels Wasserstoffperoxid bzw. Butylhydroperoxid wurde im Verdüner Triladyl[®] besser kompensiert.

Der Feldversuch zeigte, dass zwischen den Varianten ohne und mit Zusatz von Oxyfree[®] hinsichtlich des Befruchtungserfolges kein signifikanter Unterschied bestand. Bei den Varianten mit Zusatz von Oxyfree[®] war im Vergleich zu den Kontrollvarianten ein niedrigerer Befruchtungserfolg zu erkennen. Nur bei einem von vier Bullen zeigte sich eine kleine Verbesserung im Besamungserfolg bei den Varianten mit Zusatz von Oxyfree[®]. Gerard et al (2007) hatten über etwas bessere Befruchtungsergebnisse nach Verwendung von Oxyfree[®] berichtet. In dieser Arbeit konnte bei zwei von acht Bullen die Non-Return-Rate nach 90 Tagen (NRR90) durch Zusatz von Oxyfree[®] signifikant verbessert werden. Bei den anderen Bullen waren die Unterschiede zwischen den Varianten mit und ohne Zusatz von Oxyfree[®] nicht signifikant, wobei auch hier bei drei Bullen niedrigere NRR90 auftraten. Es soll auch darauf hingewiesen

werden, dass in der genannten Studie mit Bullen der Rasse Holstein gearbeitet wurde und die Befruchtungserfolge im Mittel unterhalb von 60 % NRR90 lagen. Dabei hatte der Bulle mit der niedrigsten NRR90 in der Kontrollvariante die höchste NRR-Steigerung nach Behandlung des verdünnten Spermias mit Oxyfree[®]. Dies stimmt mit den eigenen Ergebnissen überein. Der einzige Bulle, der eine leichte Verbesserung der NRR90 nach Zusatz von Oxyfree[®] zeigte, erzielte die niedrigste NRR90 in den Kontrollvarianten. Diese Ergebnisse bestätigen die kürzlich veröffentlichte Herstellerangabe (IMV, Frankreich), die eine Verbesserung der NRR nur von Bullen mit schlechter oder mittelmäßiger Fertilität zusagt.

Die im eigenen Versuch erzielte NRR90 liegt bei der Verdünnervariante BioXcell[®] niedriger als bei der Verdünnervariante Triladyl[®]. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erfahrungen einiger Autoren (Hurtado 1998, Schneider et al. 2002, Sehner 2005) überein, steht aber gleichzeitig auch im Widerspruch zu den Veröffentlichungen von Aires (2003). Gil et al. (2000) fanden keinen Unterschied im Befruchtungserfolg zwischen Besamungsdosen, die mit eidotterhaltigen bzw. eidotterfreien Verdünnern verdünnt waren. Thun et al. (2002) fanden bessere NRR nach Verwendung von eidotterhaltigen Verdünnern für Bullen der Rasse Simmental und bei eidotterfreien Verdünnern für Bullen der Rasse Holstein. Hier muss darauf hingewiesen werden, dass die Versuche z. T. mit Verdünnern unterschiedlicher Zusammensetzung von unterschiedlichen Herstellern durchgeführt wurden. Außerdem wurde im eigenen Versuch von einer Spermienkonzentration von 10 Millionen Gesamtspermien/Paillette ausgegangen. Somit sind direkte Vergleiche nicht immer möglich.

Es ist weitestgehend akzeptiert, dass 15 Millionen Gesamtspermien/Paillette ausreichen, um einen zufriedenstellenden Befruchtungserfolg zu erzielen. Voraussetzung dafür ist, dass etwa 50 % der Spermien den Einfrier-Auftau-Prozess überleben (Shannon und Vishwanath 1995, Vishwanath und Shannon 2000). Im Sinne der züchterischen und ökonomischen Effektivität und um ausreichend Besamungsdosen von Spitzenbullen zu produzieren, sind die Besamungsstationen an einer Reduzierung der Spermienzahl/Besamungsportion interessiert. Das kann jedoch mit Risiken verbunden sein und erscheint nur vertretbar, wenn das Befruchtungsergebnis stabil bleibt. Um eventuellen Qualitäts- und Fruchtbarkeitsverlusten durch Erhöhung des Verdünnungsgrades vorzubeugen, können verschiedene Schutzmittel wie z. B. Antioxidantien angewendet werden.

5.3.2 Ermittlung von Spermiovitalitäts- und Fertilitätsparametern nach Zusatz von Oxyfree[®] Premix zum Triladyl[®]-Verdüner und der Erhöhung des Verdünnungsgrades

In diesem Abschnitt wurde weiter untersucht, welchen Effekt der Zusatz von Oxyfree[®] bei einem erhöhten Verdünnungsgrad auf gefrierkonserviertes Bullensperma hat.

Eine Reduzierung der Gesamtspermiezahl/Paillette hatte einen deutlichen Motilitätsverlust (siehe auch Pkt. 5.1) zur Folge. Auf ähnliche Ergebnisse kamen auch Ballester et al. (2007) und Nehring und Rothe (2003). Letztere wiesen allerdings auf bullenspezifische Effekte hin. Bei den eigenen Versuchen unterschied sich die Spermengeschwindigkeit bei den Varianten mit niedriger Spermienzahl nicht signifikant von den Varianten mit normaler Spermienzahl. Der Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom nach dem Auftauen zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Verdünnungsvarianten. Das widerspricht den Ergebnissen von Ballester et al. (2007), die signifikante Unterschiede zwischen den Verdünnungsvarianten fanden. Allerdings wurde hier mit einer niedrigeren Gesamtspermienzahl/Besamungsportion gearbeitet als im eigenen Versuch.

Durch Zusatz von Oxyfree[®] konnte der Motilitätsverlust, der bei der Kontrollvariante mit niedrigerer Spermienzahl auftrat, aufgehoben werden. Zwischen der Kontrollvariante mit normaler Spermienzahl und den Varianten mit Zusatz von Oxyfree[®] mit bzw. ohne erhöhten Verdünnungsgrad wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt. Erst nach 120 Minuten Inkubationszeit konnten signifikante Unterschiede zwischen den Varianten mit 14 bzw. 8 Millionen bei der Verdünnervariante unter Zusatz von Oxyfree[®] festgestellt werden. Die Spermengeschwindigkeit wurde durch Zusatz von Oxyfree[®] in beiden Verdünnungsvarianten deutlich erhöht. Der Anteil plasmamembranintakter Spermien mit intaktem Akrosom wurde dagegen nur geringfügig vom Oxyfree[®]-Zusatz beeinflusst.

Hinsichtlich des Schutzes gegen Lipidperoxidation und oxidativen Stress zeigte der Zusatz von Oxyfree[®] keinen Einfluss. Während hinsichtlich der plasmamembranintakten (pmi) Spermien nach DCFH-Färbung (pmiDCFH) in Oxyfree[®]-Varianten niedrigere Werte auftraten, wurde kaum eine Veränderung bei den pmiBodipy- und pmiDHR-Werten festgestellt. Zwischen den pmiBodipy-, pmiDCFH- und pmiDHR-Werten und dem Verdünnungsgrad konnte eine positive Korrelation ermittelt werden. Dies lässt folgende Schlussfolgerung zu: Je niedri-

ger die Spermienzahl im Messansatz war, desto weniger ROS wurden durch metabolische Prozesse produziert. Hinsichtlich der antioxidativen Kapazität einzelner Spermien kann daraus keine Schlussfolgerung gezogen werden.

Der zweite Feldversuch dieses Abschnittes brachte überraschenderweise andere Ergebnisse als erwartet. Obwohl unter Berücksichtigung der Zahl der einbezogenen Versuchstiere im Vergleich zwischen den Verdünnungsvarianten (14 bzw. 8 Millionen Gesamtspermienzahl/Paillette) ohne Zusatz von Oxyfree[®] keine signifikante Differenz ermittelt werden konnte, erzielte die Variante mit niedrigerer Spermienzahl im Durchschnitt erkennbar bessere Befruchtungsergebnisse. Bei vier von sechs Bullen wurde ein signifikant besserer Befruchtungserfolg bei der Verdünnungsvariante mit 8 Millionen Spermien/Paillette erzielt. Bei einem weiteren Bullen war das Ergebnis fast gleich und nur bei einem Bullen war der Besamungserfolg niedriger als bei der Kontrollvariante mit 14 Millionen Spermien/Paillette. Beim Bullen A, bei dem der Unterschied am deutlichsten war, wurde eine geringe Anzahl von Erstbesamungen (EB) durchgeführt. Grund dafür war, dass der Bulle als „schlechter Befruchter“ bekannt war und wenig eingesetzt wurde. Interessanterweise wurde bei diesem Bullen, der bei normaler Spermienzahl/Paillette niedrigere NRR90 erzielte, der Besamungserfolg durch einen höheren Verdünnungsgrad um etwa 14 Prozentpunkte verbessert. Da die Anzahl der EB gering war und ein eventueller Einfluss durch den Besamungstechniker nicht ausgeschlossen werden konnte, sind die Ergebnisse für diesen Bullen jedoch nicht aussagekräftig.

Die eigenen Feldergebnisse widersprechen Befunden anderer Arbeiten (Nehring und Rothe 2003, Shannon und Vishwanath 1995), wobei diese z. T. mit anderen Gesamtspermienzahlen/Paillette arbeiteten und andere Rassen und Verdüner verwendet wurden. Es soll auch erwähnt werden, dass im eigenen Feldversuch mit den Besamungsdosen vorwiegend Altkühe besamt wurden. Da auch bullenspezifische Effekte diskutiert werden (Bollwein et al. 2005, Bollwein 2007, Köss et al. 2005), ist ein direkter Vergleich mit anderen Arbeiten kaum möglich.

Der Zusatz von Oxyfree[®] hat bei der Verdünnungsvariante 14 Millionen den Besamungserfolg bei vier Bullen etwas verbessert und bei weiteren zwei Bullen erkennbar verschlechtert, so dass im Durchschnitt bei der Verdünnungsvariante 14 Millionen kein signifikanter Unterschied zwischen den Varianten ohne und mit Oxyfree[®] festgestellt wurde. Bei der Variante mit der niedrigeren Spermienzahl/Paillette und unter Zusatz von Oxyfree[®] deutete sich ein Abfall des Besamungserfolges im Vergleich zu der gleichen Verdünnungsvariante ohne Zu-

satz von Oxyfree[®] an. Nur bei einem Bullen wurde der Besamungserfolg durch Zusatz von Oxyfree[®] verbessert. Auch hier ließ sich im Vergleich der Varianten mit Zusatz von Oxyfree[®] erkennen, dass der Besamungserfolg bei der Verdünnungsvariante 8 Millionen etwas besser als bei der Verdünnungsvariante 14 Millionen war.

Die Verbesserung der Spermienmotilität durch Zusatz von Oxyfree[®] konnte im Feldversuch im Durchschnitt für alle Bullen nicht als Besamungserfolg bestätigt werden. Gleiches galt auch für die Verdünner- und Verdünnungsvarianten.

Der Zusatz von Oxyfree[®] konnte die Lipidperoxidationsrate nur geringfügig bei der Verdünnervariante-BioXcell[®] verringern. Bei der Verdünnervariante-Triladyl[®] zeigte der Oxyfree[®] - Zusatz keine Verringerung der Lipidperoxidationsrate. Generell traten bei der Verdünnervariante-Triladyl[®] und in den Varianten mit niedrigerer Spermienzahl/Paillette etwas geringere Lipidperoxidationsraten auf.

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass hinsichtlich des Besamungserfolges die Ejakulate einzelner Bullen unterschiedlich auf Verdünner, Verdünnungsgrad und den Zusatz von Oxyfree[®] zum Verdünner reagieren. In der Praxis einer Besamungsstation ist es daher schwierig, für jeden Bullen die beste Verdünnervariante und somit mehrere verschiedene Verdünner zu benutzen. Da letztendlich der Besamungserfolg zählt, ist weiter ein eidotterhaltiger Verdünner zu empfehlen.

Da die Ejakulate bzw. Spermien so unterschiedlich auf den Zusatz von Oxyfree[®] zum Verdünner reagieren, u. a. mit Verschlechterung des Besamungserfolges, scheint Oxyfree[®] keine Lösung für einen Antioxidanzzusatz, insbesondere hinsichtlich eines Verdünnungseffektes, zu sein.

5.4 Untersuchungen zur Ermittlung des fertilitätsprognostischen Wertes der spermatischen Parameter der gefrierkonservierten Bullenspermien

Ziel der eigenen Untersuchungen war es, Parameter gefrierkonservierter Bullenspermien zu finden, anhand derer die Fruchtbarkeit eines Bullen eingeschätzt werden kann.

Besondere Merkmale des vorliegenden Versuchs sind die hohe Anzahl der durchgeführten Erstbesamungen und untersuchten Ejakulate, sowie der direkte Zusammenhang zwischen dem

untersuchten Sperma und der im Besamungsversuch ermittelten Fertilität. Für diesen Versuch wurden Besamungsportionen mit 10 Mio. Gesamtspermien/Paillette verwendet. Es wurde versucht, mit den Versuchsbesamungsdosen vorwiegend Altkühe zu besamen. Die NRR wurde pro Ejakulat erfasst.

Da die Fertilität ein multifaktorieller Prozess ist (Amann 1989, Graham 2001, Rodriguez-Martinez 2003), wurde versucht, eine große Anzahl von Parametern, sowohl von originärem als auch von gefrierkonserviertem Sperma zu erfassen.

Mit dem verwendeten CASA-System wurde eine Vielzahl von Motilitätsparametern für verschiedene Spermien-subpopulationen sowohl für originäres als auch für gefrierkonserviertes Bullensperma bestimmt. Hauptsächlich wurden die Anteile und Geschwindigkeiten der motilen und progressiv motilen Spermien sowie Geschwindigkeiten und Bewegungsparameter verschiedener Subpopulationen der Spermien ermittelt.

Da es das Hauptziel dieses Versuchs war, Zusammenhänge zwischen den Qualitätsparametern der Spermien und der Fertilität bzw. NRR zu finden, wurden die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Parametern hier nicht dargestellt und diskutiert.

Wie erwartet (Defoin et al. 2007, Muiño et al. 2007, Thomas und Garner 1994, Vyas et al. 1992), lagen die Werte des gefrierkonservierten Bullenspermas größtenteils signifikant unter den Werten des originären Spermias. Ursache sind die Belastungen der Spermien beim Einfrieren und Auftauen (Watson 2000).

Von allen erfassten Parametern des originären Spermias wies nur der Parameter VAP der gesamten Spermienpopulation einen Zusammenhang zur NRR90 auf. Bei allen anderen Spermienqualitätsparametern des originären Spermias wurden keine signifikanten Korrelationen zur NRR90 gefunden.

Von den insgesamt 68 Parametern, die sich auf das gefrierkonservierte Sperma beziehend erfasst wurden, wiesen nur elf Parameter bedeutsame Korrelationen zur NRR90 auf. Neben den zehn kinetischen Parametern, die mittels CASA-System erfasst wurden, wies auch die Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach DCFH-Färbung 15 Minuten nach dem Auftauen (pmiDCFH_15) einen Zusammenhang zur NRR90 auf. Die Korrelationen zwischen der NRR90 und den relevanten Parametern lagen im Bereich von $r = 0,36$ bis $r = 0,50$ und sind damit betreffend der spermatologischen Untersuchungen als relativ hoch zu bewerten.

In der eigenen Studie wurden keine Zusammenhänge zwischen den mittels CASA-System ermittelten Anteilen motiler bzw. progressiv motiler Spermien bzw. der geschätzten Spermienmotilität und NRR gefunden. Das bestätigt die Ergebnisse von Brandt (1999), Graham (1994), Soderquist et al. (1991) und Volz (1990). Andere Autoren fanden dagegen signifikante Zusammenhänge zwischen Spermienmotilität und Fertilität (Baltissen 2007, Budworth et al. 1988, Christensen et al. 1999, Farell 1998, Gillan 2008, Hallap et al. 2004, Kjeastad et al. 1993). Die in der eigenen Studie festgestellten Zusammenhänge zwischen der Motilität (Anteil motiler und progressiv motiler Spermien) und der NRR von $r = 0,11$ bis $r = 0,26$ ($p > 0,05$) liegen deutlich unter den Korrelationen, die von Baltissen (2007) mit $r = 0,39$, Budworth et al. (1988) mit $r = 0,39$, Farell (1998) mit $r = 0,34$, Gillan (2008) mit $r = 0,67$, Januskauskas et al. (2003) mit $r = 0,43 - 0,61$ und Padrik und Jaakma (2004) mit $r = 0,69$ festgestellt wurden. Allerdings sind zwischen deren Studien und der eigenen Arbeit unterschiedliche Versuchsbedingungen festzustellen. Zum Teil wurden andere Messsysteme, Parameterdefinitionen und andere Verdüner verwendet. Das untersuchte und besamte Sperma stammt von Bullen verschiedener Rassen und verschiedenen Alters (in der eigenen Arbeit: Fleckviehbullen über sechs Jahre). In den meisten Arbeiten wurde die NRR nach 56 Tagen (in der eigenen Arbeit nach 90 Tagen) erfasst. Zum Teil kamen auch andere Verdüner zur Anwendung (in der eigenen Arbeit ein eidotterhaltiger Verdüner). Die unterdurchschnittlichen Motilitätswerte einiger Bullen, bei denen eine überdurchschnittliche NRR ermittelt wurde, zeigen, dass die Motilitätswerte von gefrierkonserviertem Sperma für die Vorhersage des Befruchtungserfolges nicht besonders aussagekräftig genug sind.

Die Geschwindigkeitsparameter der Spermien nach dem Auftauen zeigten signifikante Korrelationen ($r = 0,40$ bis $r = 0,44$; $p \leq 0,02$) zu dem NRR90. Das entspricht früheren Ergebnissen von Gillan et al. (2008), Hallap et al. (2004) und Kjaestad et al. (1993). Gillan et al. (2008) berichteten über eine Korrelation von $r = 0,63$ zwischen den Parametern VSL und NRR. Hallap et al. (2004) fanden eine Korrelation von $r = 0,47$ zwischen den Parametern VAP und NRR. Baltissen (2007) fand dagegen keinen Zusammenhang zwischen den Geschwindigkeitsparametern und der NRR.

Für die Parameter Linearity, Straightness und Wobble wurde eine negative Korrelation zur NRR90 festgestellt. Zusammenhänge zwischen Linearity und NRR wurden auch von anderen Autoren beobachtet (Bailey et al. 1994, Januskauskas et al. 2001, 2003,). Dagegen fand Baltissen (2007) zwischen den gleichen Parametern keine signifikanten Korrelationen. Der Zu-

sammenhang zwischen den Parametern BCF und NRR, der von Baltissen (2007) festgestellt wurde, konnte durch eigene Untersuchungen bestätigt werden. Allerdings wurde bei den eigenen Untersuchungen der mit der NRR korrelierende BCF-Wert nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten nach dem Auftauen erfasst.

Der von Gillan et al. (2008), Januskauskas et al. (2003) und Kasimanickam et al. (2006) beschriebene Zusammenhang zwischen dem Anteil plasmamembranintakter Spermien und der NRR konnte hier nicht bestätigt werden. Auch Baarz (2006) und Bollwein et al. (2004) fanden keine bedeutsamen Zusammenhänge zwischen diesen Parametern.

Der in verschiedenen Untersuchungen an bovinen- (Baarz 2006, Bollwein et al. 2008, Ballachey et al. 1987, Kasimanickam et al. 2006), equinen- (Krienke 2003) und humanem Sperma (Boe-Hansen et al. 2005) festgestellte Zusammenhang zwischen den Parametern DFI (DNA Defragmentierungsindex) und NRR, konnte durch eigene Untersuchungen nicht bestätigt werden. Auch Hallap et al. (2005) und Madrid-Burya et al. (2005) fanden keinen direkten Zusammenhang zwischen Chromatinstatus und Fertilität. Anzar et al. (2002) fanden dagegen einen Zusammenhang dieser Parameter in originärem Sperma, aber nicht in gefrierkonserviertem Sperma.

Von den Parametern, welche die Lipidperoxidation und den oxidativen Status beschreiben, korrelierte die Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach DCFH-Färbung 15 Minuten nach dem Auftauen signifikant mit der NRR. Die in den eigenen Untersuchungen ermittelte Korrelation von $r = 0,47$ ($p = 0,008$) lag deutlich über der Korrelation von $r = 0,16$, welche von Baarz (2006) ermittelt worden war. Baarz (2006) fand allerdings überhaupt keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Werten der Lipidperoxidation, dem oxidativen Status und NRR. Weitere Arbeiten, die sich mit ähnlichen Zusammenhängen befassen, sind dem Autor nicht bekannt.

Insgesamt haben wenige der Spermienqualitätsparameter auf einem niedrigen bis mittleren Niveau mit der Fertilität korreliert. Praktikable Vorhersagen des Befruchtungspotentials der Ejakulate bzw. der Bullen sind damit nicht möglich. Damit stützen die Ergebnisse dieses Versuches die Aussage verschiedener Autoren, welche die Untersuchung nur einzelner Spermaqualitätsparameter zur Vorhersage der Befruchtungsfähigkeit für nicht ausreichend halten (Graham 2001, Rodriguez-Martinez 2003). Deshalb wurde überprüft, in wieweit eine Kombination und Gewichtung der verschiedenen Spermaqualitätsparameter eine verbesserte Vorhersage bezüglich der Fertilität zulässt.

Ähnliche Modelle der multilineareren Regressionsanalyse zur Vorhersage der Fertilität des Bullenspermas wurden von mehreren Autoren verwendet (Amann 1989, Baltissen 2007, Budworth et al. 1988, Farrell et al. 1998, Gillan et al. 2008, Januskauskas et al. 2000, 2001, 2003, Kasimanickam et al. 2006, Phillips et al. 2004, Tartaglione und Ritta 2004, Thomas et al. 1998).

In den ersten zwei Modellen wurden alle mittels CASA-System erfassten Parameter in einer multilineareren Regressionsanalyse berücksichtigt. Mittels der Regressionsanalyse konnte durch eine Kombination von sechs Parametern (erstes Modell) eine Vorhersageleistung für die NRR von 66 % bestimmt werden. In das zweite Modell der Regressionsanalyse flossen 14 Parameter des CASA-Systems ein, und die Vorhersageleistung der Fertilität in Form von NRR stieg auf 93 %. Damit wurden die Ergebnisse von Gillan et al. (2008) bestätigt, die mit verschiedenen CASA-Parametern über eine neunzigprozentige Vorhersageleistung der NRR berichteten. Farrell et al. (1998) dokumentierten, je nach Kombination, eine Vorhersageleistung der NRR zwischen 63 % und 98 %.

Die Parameter Straightness der progressiv motilen Spermien, Anteil nichtlinear progressiv motiler Spermien und Anteil kreisförmig progressiv motiler Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen, die bereits einzeln mit der NRR korrelierten, waren auch in der Schätzformel wieder zu finden. Obwohl die Parameter Wobble und VCL der progressiv motilen Spermien und VAP der linear progressiv motilen Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen mit der NRR korrelierten, flossen in die Schätzformel die 120-Minuten-Werte ein. Interessanterweise bekamen neben dem Anteil der hyperaktiv und lokal motilen Spermien auch der Anteil der progressiv motilen Spermien sowie VCL und WOB der progressiv motilen Spermien eine negative Gewichtung.

In das dritte Modell wurden alle für das Versuchssperma untersuchten Parameter einbezogen. Neben den elf Parametern des CASA-Systems flossen in die Regressionsanalyse auch drei Parameter ein, die den oxidativen Stressstatus der Spermien beschreiben. Die Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach DHR-Färbung 15 Minuten nach dem Auftauen und der Fluoreszenzindex nach DCFH-Färbung bekamen eine negative und die Fluoreszenzintensität plasmamembranintakter Spermien nach DCFH-Färbung zwei Stunden nach dem Auftauen eine positive Gewichtung in der Schätzformel. Das unterstreicht die Bedeutung von Untersuchungen zur Lipidperoxidation von Spermien im Rahmen der Spermakonservierung und des Besamungseinsatzes. Bei den Motilitätsparametern flossen in die dritte Schätz-

formel auch die Parameter BCF der progressiv motilen Spermien und der Anteil kreisförmig progressiv motiler Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen ein. Diese korrelierten auch einzeln signifikant mit der NRR, kommen aber in den ersten zwei Formeln nicht vor. Die Vorhersageleistung der NRR der dritten Schätzformel lag bei 79 % und damit unter der Vorhersageleistung der zweiten Schätzformel. Baltissen (2007) konnte durch Kombination mehrerer spermatologischer Parameter eine Vorhersageleistung der NRR zwischen 42 % und 62,5 %, je nach Kombination und Gewichtung erzielen. Allerdings benutzte er eine geringere Anzahl von Parametern.

Da in den verschiedenen Studien doch sehr unterschiedliche Versuchsprotokolle – z. B. hinsichtlich Spermienzahl/Besamungsportion, Befruchtungparameter, Auswahl und Definition der Spermienqualitätsparameter – beschrieben werden, ist ein direkter Vergleich mit den eigenen Untersuchungen nicht immer möglich. Dennoch kann geschlussfolgert werden, dass in allen Studien eine hohe Vorhersageleistung der NRR nur durch die Kombination und Gewichtung mehrerer, wenn auch unterschiedlicher spermatologischer Parameter erreicht werden konnte.

Eine Vorhersage der NRR spielt für die Praxis nur dann eine bedeutsame Rolle, wenn die Genauigkeit über 65 % liegt. Um eine höhere Vorhersageleistung erzielen zu können, ist auch eine größere Zahl an Qualitätsparametern der Spermien nötig. Damit ist auch ein höherer Aufwand bei den Untersuchungen verbunden. Durch eigene Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass bei ausschließlicher Heranziehung der Qualitätsparameter der Spermien des originären Spermias keine Vorhersageleistung der NRR über 65 % erreicht werden konnte. Um das Befruchtungspotenzial des Spermias zu beurteilen, ist es erforderlich, das Sperma einzufrieren und erst nach dem Auftauen zu untersuchen und zu bewerten.

Die Vorhersage der NRR ist in der Praxis insbesondere für die frühe Erkennung der subfertilen Jungbullen und deren rechtzeitige Entfernung aus der Spermaproduktion von Bedeutung. Auch für die „frühzeitige Aussonderung“ von Ejakulaten mit niedriger Spermienzahl/Besamungsdosis ist die Vorhersage der NRR wichtig.

Die Fertilität des Bullenspermias ist ein multifaktorieller Prozess, der neben der Qualität und Befruchtungskapazität des Spermias auch von dem physiologischen Status der Kuh, der Zeit und der Technik der Besamung abhängig ist. Wenn eine Vorhersageleistung der NRR von 93 % mittels Qualitätsparameter der Spermien gerechnet werden könnte, würde dies bedeuten, dass nur 7 % der Variation durch die Kuh zu erklären ist. Das kann durchaus wenig rea-

listisch erscheinen. In der vorliegenden Arbeit wurden keine rein experimentellen Modelle für die Feldversuche benutzt. Alle Versuche, sowohl Labor- als auch Feldversuche, wurden unter Praxisbedingungen durchgeführt. Es wurde davon ausgegangen, dass die brünstigen Kühe zum richtigen Zeitpunkt und mit der richtigen Technik besamt wurden. Die Ergebnisse wurden unter Praxisbedingungen erzielt und waren somit vielen Einflussfaktoren ausgesetzt. Inwieweit sich mit diesen Schätzformeln die NRR für andere Bullen und andere Ejakulate im Voraus berechnen lässt, muss weiter geprüft werden.

Alle Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, unter praxisorientierten Bedingungen die Lösung genereller Fragestellungen mit Beiträgen zur Optimierung der Qualität der Spermaproduktion und der stationsinternen Arbeitsabläufe zu verbinden.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die verschiedenen technologischen Aspekte der Gefrierkonservierung von Bullensperma bezüglich der Verringerung der Gesamtspermienzahl pro Besamungsportion zu verbessern. Ein anderes Ziel war die Ermittlung des Zusammenhangs zwischen spermatologischen Parametern und der Fertilität von Besamungsbullen in Form der Non-Return-Rate (NRR) sowie die Darstellung einer Kombination und Gewichtung der Parameter, die eine hohe Vorhersage der NRR ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden vier Versuche durchgeführt.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde eine Kontrolle der Homogenität von Besamungsportionen hinsichtlich der Spermienzahlen und der Spermaqualität durchgeführt. Dafür wurden ein Vorversuch zum Sedimentationsverhalten der Bullenspermien und ein Hauptversuch zur tatsächlichen Kontrolle der Homogenität durchgeführt. Insgesamt wurden für diesen Abschnitt 30 Ejakulate von sechs Bullen gewonnen und mit zwei (einem eidotterhaltigen und einem eidotterfreien) Verdünnern und in zwei Verdünnungsgraden (14 bzw. 7 Millionen Gesamtspermienzahl/Besamungsportion) weiterverarbeitet.

Durch eine ordnungsgemäße Aufbereitung des Spermas hinsichtlich der Durchmischung wurde eine homogene Verteilung der Spermien in den Verdünnungsgläsern und später in den Besamungsportionen erreicht. Die Art des Durchmischens, d. h. Schwenken im verschlossenen Verdünnungsglas oder Rühren mittels Magnetrührer, spielte keine Rolle.

Anhand der Befunde einer mit einem erweiterten Methodenspektrum durchgeführten Spermauntersuchung konnte belegt werden, dass bei ordnungsgemäßer Aufbereitung des Spermas die Qualität der Besamungsportionen eines Ejakulates hinsichtlich der Spermienzahl und der Vitalität der aufgetauten Spermien homogen ist. Bei keinem erfassten Parameter traten bedeutsame Differenzen zwischen Varianten auf, die aus unterschiedlichen Zeiträumen des Konfektionierungsablaufes resultierten. Das galt sowohl für die Aufbereitung in dem eidotterhaltigen Verdünnern Triladyl[®] als auch für die in dem eidotterfreien Verdünnern BioXcell[®] sowie für Verdünnungsgrade, die zu 14 oder 7 Millionen Gesamtspermien/Besamungsportion führten.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde der Effekt verschiedener Temperaturregime bzw. Abkühlungsraten während des Routineablaufes der Bullenspermaproduktion auf die Sperma-

qualität nach dem Auftauen untersucht. Weitere Versuche galten den Einflüssen des Konfektionierungszeitpunktes und der Äquilibrierungsdauer bei 4 °C auf die Vitalität der Spermien nach dem Auftauen. In den drei Versuchsansätzen dieses Abschnittes wurden insgesamt 56 Ejakulate von 4 Bullen ausgewertet.

Die unterschiedlichen Temperaturregime hatten im Durchschnitt keinen erheblichen Einfluss auf das Motilitätsverhalten der gefrierkonservierten Spermien nach dem Auftauen. Die Variante „BVN-Standard“ zeigte leichte Vorteile gegenüber den anderen Varianten, womit das Arbeitsprinzip der Besamungsstation Neustadt a. d. Aisch bestätigt wurde. Eine Zwischentemperierung bei Raumtemperatur, wie sie in vielen Besamungsstationen angewendet wird, erscheint auch vertretbar. Auch hier konnte gezeigt werden, dass eine Konfektionierung des verdünnten Spermas nach der Äquilibrierung bessere Motilitätswerte nach dem Auftauen erbringt, als wenn die Abfüllung in Pailletten bereits vorher bei Raumtemperatur erfolgt. Durch den dritten Versuch dieses Abschnittes konnte gezeigt werden, dass die Äquilibrierungsdauer bei der Gefrierkonservierung von Bullensperma die Motilität sowie andere Vitalitätsparameter der Spermien nach dem Auftauen beeinflusst. Die Werte stiegen zwischen einer Stunde und 48 Stunden. Eine Äquilibrierungsdauer unter zwei Stunden war zu kurz, um optimale Auftauwerte zu erhalten.

Zur Verringerung einer möglichen Lipidperoxidationssteigerung bei der Gefrierkonservierung von Bullensperma wurde der Verdünnerzusatz Oxyfree[®] Premix (IMV, Frankreich) in zwei Versuchsansätzen (37 Ejakulate) mit jeweiligen Feldversuchen mit zwei Verdünnern und drei Verdünnungsgraden getestet. Der Zusatz von Oxyfree[®] brachte eine Steigerung der Motilitäts- und Geschwindigkeitswerte der Spermien nach dem Auftauen, aber keine Verbesserung der NRR90.

Im vierten Abschnitt wurde nach möglichen Zusammenhängen zwischen Spermienqualitätsparametern und der Fertilität der Bullen bzw. NRR und nach einer geeigneten Kombination und Gewichtung der Parameter, die eine Vorhersage der NRR erlaubt, gesucht.

Von den Parametern des originären Spermas wies nur ein Parameter einen Zusammenhang zur NRR auf. Von den Parametern des gefrierkonservierten Spermas nach dem Auftauen wiesen zehn Parameter des CASA-Systems und ein Parameter, der den „oxidativen Stress“ beschreibt, einen Zusammenhang zur NRR auf. Durch Kombination und Gewichtung der 14 Parameter wurde eine Vorhersageleistung der NRR von 93 % erzielt.

7 Summary

Investigations for the improvement of the technology of the freezing-preserving of bull semen

The aim of this study was to investigate ways to improve the technology of bull semen cryo-conservation in order to decrease the total sperm number per straw. The other objective was to investigate the relationship between spermatological parameters and the fertility of AI-bulls in the form of Non-Return-Rate (NRR) as well as to present a combination and weighting of these parameters which facilitate the forecast of the NRR. For these purposes four large-scale trials were carried out.

In the first section of this study a control of the insemination portions homogeneity with regard to sperm number and sperm quality was done. First a preliminary test to determine the sedimentation behaviour of the bull sperms was examined and this was followed by a main attempt for the actual control of the homogeneity. During this process a total of 30 ejaculates from six bulls were collected and two diluters (one containing yolk and the other yolk-free) and two dilution degrees (14 and 7 million total sperm number per straw) were investigated.

Through an appropriate semen preparation and mixing it was possible to achieve a homogeneous distribution of the sperm in the dilution glasses and later in the insemination portions. The method of mixing, either by turning sealed dilution glasses or stirring by a magnetic stirrer, did not influence the results.

By a sperm investigation which was carried out with an extended method spectrum it could be proved that with a careful preparation of the semen the quality of the insemination portions of an ejaculate is homogeneous with regard to sperm number and vitality of the frozen-thawed sperm. No significant differences between variants which resulted from different packing process periods could be observed for any of the parameters. This was the case for the preparation in the yolk-containing diluter Triladyl[®] and for the yolk-free diluter BioXcell[®] as well as for the dilution degrees which led to 14 or 7 million total sperm number per straw.

In the second section of the study the effect of different temperatures and cooling rates during the routine course of the bull semen production with regard to the sperm quality after thawing was examined. Further tests determined the influences of the packing and equilibration time at 4 °C on the vitality of the sperms after the thawing. In the three experiments carried out in this section a total of 56 ejaculates were evaluated.

The different temperature regimes had on average no considerable influence on the motility of the frozen sperm after thawing. The variant “BVN-Standard” showed slight advantages compared to the other variants which confirmed the method of the AI-station Neustadt Aisch. Furthermore, the procedure of keeping semen at room temperature, as is practised in many AI-stations, would also appear to be justifiable. It could be shown that a packing of the diluted semen after the equilibration showed better sperm motility after thawing than when packing occurs already at room temperature before equilibration. The third attempt of this section showed that the duration of the equilibration period influences the sperm motility as well as other vitality parameters of the sperm after thawing. The values increased between 1 and 48 hours. Any duration of the equilibration period from less than two hours was too short to receive optimal thawing values.

To avoid a possible increase of the lipids peroxidation during the cryopreservation of bull semen, the addition of Oxyfree[®] Premix (IMV, France) was tested with two commercial diluters using three dilution degrees in two experiments (using 37 ejaculates) with respective field trials. Although the addition of Oxyfree[®] brought an increase of the motility and speed values of the sperms after thawing, no improvement at the NRR90 could be observed.

The fourth section aimed to find possible relationships between sperm quality parameters and the fertility of the bulls quantified by NRR and to consider a suitable combination and weighting of these parameters which allow a forecast of the NRR.

From the parameters of the fresh semen only one parameter showed a relation to NRR. Regarding the parameters of the frozen sperm after thawing, ten parameters of the CASA-system and one parameter, which describes “the oxidative stress” showed a correlation to NRR. A forecast level of the NRR of 93% was achieved by combination and weighting of 14 parameters.

8 Literaturverzeichnis

Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., und Hinsch, E. (2003)

In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen.

Theriogenology 60, 269-79

Aitken, R. J. (1994)

A free radical theory of male infertility.

Reprod. Fertil. Dev. 6, 19-24

Aitken, R. J. (1995)

Free radicals, lipid peroxidation and sperm function.

Reprod. Fertil. Dev. 7, 659-68

Aitken, R. J., Buckingham, D. W., Carreras, A., und Irvine, D. S. (1996)

Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function.

Free Radic. Biol. Med. 21, 495-504

Aitken, R. J., und Clarkson, J. S. (1987)

Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 81, 459-469

Aitken, R. J., und Fisher, H. (1994)

Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk.

Bioassays 16, 259-67

Aitken, R. J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennings, Z., und Irvine D. S. (1998)

Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa.

Biol. Reprod. 59, 1037-46

Aitken, R. J., und West, K. M. (1990)

Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients.

Int. J. Androl. 13, 433-51

Alm, K., Taponen, J., Dahlbom, M. Tuunainen, E., Koskinen, E., und Andersson, M. (2001)
A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls.
Theriogenology 56, 677-84

Almeida, J., und Ball, B. A. (2005)
Effect of alpha-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa.
Anim. Reprod. Sci. 87, 321-37

Almquist, J. O. (1982)
Effect of long term ejaculation at high frequency on output of sperm, sexual behavior, and fertility of Holstein bulls; relation of reproductive capacity to high nutrient allowance.
J. Dairy Sci. 65, 814-823

Alvarez, J. G., und Storey, B.T. (1983)
Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility.
Biol. Reprod. 29, 548-55

Alvarez, J. G., und Storey, B. T. (1989)
Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation.
Gamete Research 23, 77-90

Alvarez, J. G., Touchstone, J. C., Blasco, L., und Storey, B. T. (1987)
Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity.
J. Androl. 8, 338-48

Amann, R. P. (1989)
Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?
J. Androl. 10, 89-98

Amann, R. P., und Almquist, J. O. (1976)
Bull management to maximize sperm output.
Proc. 6th Tech. Conf. Artifi. Insem. Reprod., Milwaukee, 1, 1

Amann, R. P., und Katz, D. F (2004)
Reflections on CASA after 25 years.
J. Androl. 25, 317-25

Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D., Chatagnon, G., Battut, I., und Courtens, J. L. (2005)
Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing.
Reprod. 129, 535-43

Anzar, M., He, L. Buhr, M. M., Kroetsch, T. G., und Pauls, K. P. (2002)
Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility.
Biol. Reprod. 66, 354-60

Appell, R. A., Evans, P. R., und Blandy, J. P. (1977)
The effect of temperature on the motility and viability of sperm.
Br. J. Urol. 49, 751-6

Armstrong, J. S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W. J., und Sikka, S. C. (1999)
Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism.
Free Radic. Biol. Med. 26, 869-80

Ax, R. E., Bollig, S. E., und Bellin, M. E. (1988)
How many sperm are in a straw?
12th Tech. Conf. Artifi. Insem. Reprod. 1, 32

Baarz, D. (2006)
Untersuchungen über die Eignung durchflusszytometrischer Testverfahren zur Beurteilung der Fertilität kryokonservierten Bullenspermas.
Vet. Med. Diss., Hannover

Bailey, J. L., Robertson, L., und Buhr, M. M. (1994)
Calcium regulation, computerized motility parameters and the fertility of bovine spermatozoa.
J. Anim. Sci. 74, 53-58.

Ball, B. A., Medina, V., Gravance, C. G., und Baumber, J. (2001a)
Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 °C.
Theriogenology 56, 577-89

Ball, B. A., Vo, A. T., und Baumber, J. (2001b)
Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa.
Am. J. Vet. Res. 62, 508-15

Ball, B. A., und Vo, A. (2002)

Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY^{581/591}.

J. Androl. 23, 259-69

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

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

Biol. Reprod. 36, 915-25

Ballester, J., Johannisson, A., Saravia, F., Háárd, M., Gustafsson, H., Bajramovic, D., und Rodriguez-Martinez, H. (2007)

Post-thaw viability of bull AI-doses with low-sperm number.

Theriogenology 68, 934-43

Baltissen, J. (2007)

Zusammenhänge zwischen computergestützt ermittelten spermatologischen Merkmalen und der Fertilität von Bullen.

Vet. Med. Diss., Hannover

Baracaldo, M. I., Barth, A. D., und Bertrand, W. (2007)

Steps for Freezing Bovine Semen: From Semen Collection to the Liquid Nitrogen Tank.

online: www.ivis.org/reviews/rev/baracaldo/chapter.asp?LA=1

Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V., und Davies-Morel, M. C. G. (2000)

The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation.

J. Androl. 21, 895-902

Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., und Meyers, S. A. (2003)

Reactive Oxygen Species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine Spermatozoa.

J. Androl. 24, 621-628

Baumber, J., Ball, B. A., und Linfor, J. J. (2005)

Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants.

Am. J. Vet. Res. 66, 772-9

Berndtson, W. E., und Foote, R. H. (1969)

The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol.

Cryobiology 5, 398-402

- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., und Sirard, M. A. (2001)
Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen.
Theriogenology 56, 275-88
- Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Cormier, N., und Sirard, M. A. (2002)
Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender:
protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase.
Theriogenology 57, 1105-22
- Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., und Sirard, M. A. (2000)
Level of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing
and thawing.
Mol. Reprod. Dev. 55, 282-8
- Blottner, S., Wegner, I., Roelants, H., und Jewgenow, K. (1998)
Durchflusszytometrische Bestimmung des akrosomalen Status von Bullen- und Hengstsper-
mien nach Markierung mit FITC-konjugiertem PNA.
Tierärztl. Umschau 53, 441-7
- Boe-Hansen, G. B., Ersboll, A. K., und Christensen (2005)
Variability and laboratory factors affecting the sperm chromatin structure assay in human
semen.
J. Androl. 33, 360-8
- Bollwein, H. (2007)
Variation of sperm cell concentration in batches.
19th European A. I. Vets Meeting, Celle, Deutschland
- Bollwein, H., Fuchs, I., Dirscherl, P., Weber, F., und Stolla, R. (2004)
Plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in
cryoconserved bovine spermatozoa immediately and three Hours after thawing and their rela-
tionship to fertility of bulls.
Wien. Tierärztl. Mschr. 91, Suppl. 2
- Bollwein, H., Fuchs, I., Weber, F., und Stolla, R. (2005)
Standardization of the quality of cryopreserved bovine semen samples using flow cytometry.
Jahrestagung für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 30. Veterinär-
Humanmedizinischen Gemeinschaftstagung, Zürich, Schweiz

- Bollwein, H., Fuchs, I., und Koess, C. (2008)
Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine Spermatozoa.
Reprod. Dom. Anim. 43, 189-95
- Borges, J.C., Guimaraes, J. D., Costa, E. P., Santos, A. Q., und Gioso, M. M. (2004)
Use of antioxidants associated or not with an emulsifier for cryopreservation of bovine semen.
15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil, 464
- Brahmkshtri, B. P., Edwin, M. J., John, M. C., Nainar, A. M., und Krishnan, A. R. (1999)
Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility in vitro.
Anim. Reprod. Sci. 54, 159-68
- Brandt, K. (1999)
Beziehungen zwischen speziellen Samenparametern und der NRR von Besamungsbullen bei Verwendung von niedrigen Besamungsdosen.
Vet. Med. Diss., München
- Breininger, E., Beorlegui, N. B., O'Flaherty, C. M., und Beconi, M. T. (2005)
Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen.
Theriogenology 63, 2126-35
- Brogliatti, G. M., Larraburu, G., Cavia, R., und Carini, M. E. (2005)
Evaluation of bull semen at 1 H vs. 48 H of post-frozen stabilization time.
Reprod. Fertil. Dev. 18, 150
- Brouwers, J. F., und Gadella, B. M. (2003)
In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells.
Free Radic. Biol. Med. 35, 1382-91
- Brouwers, J. F., Silva, P. F. N., und Gadella, B. M. (2005)
New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing.
Theriogenology 63, 458-69
- Budworth, P. R., Amann, R. P., und Chapmann, P. L. (1988)
Relationship between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility.
J. Androl. 9, 41-54

- Budworth, P. R., Amann, R. P., und Hammerstedt, R. H. (1987)
A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity of bull sperm.
J. Dairy Sci. 70, 1927- 36
- Busch, W., Löhle, K., und Peter, W. (1991)
Künstliche Besamung bei Nutztieren.
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- Chatterjee, S., und Gagnon, C. (2001)
Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing.
Mol. Reprod. Dev. 59, 451-8
- Chaveiro, A., Machado, L., Frijters, A., Engel, B., und Woelders, H. (2006)
Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports.
Theriogenology 65, 1875-90
- Chaveiro, A., Santos, P., und Da Silva, F. M. (2007)
Assessment of sperm apoptosis in cryopreserved bull semen after Swim-up treatment: a flow cytometric study.
Reprod. Dom. Anim. 42, 17-21
- Cheng, F. P., Fazelli, A., Voorhout, W. F., Marks, A., Bevers, M. M., und Collenbrander, B. (1996)
Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa.
J. Androl. 17, 674-82
- Christensen, P., Brockhoff, P. B., und Lehn-Jensen, H. (1999)
The relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls.
Reprod. Dom. Anim. 34, 503-7
- Christensen, P., Boelling, D., Pedersen, K. M., Korsgaard, I. R., und Jensen, J. (2005a)
Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls.
J. Androl. 26, 98-106
- Christensen, P., Hansen, C., Liboriussen, T., und Lehn-Jensen, H. (2005b)
Implementation of flow cytometry for quality control in four Danish bull studs.
Anim. Reprod. Sci. 85, 201-8

- Christensen, P., Stenvang, J.P., und Godfrey, W. L. (2004)
A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen.
J. Androl. 25, 255-64
- Christensen, P., Stryhn, H., und Hansen, C. (2005c)
Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers.
Theriogenology 63, 992-1003
- Cooper, T. G., und Yeung, C. H. (1998)
A flow cytometric technique using Peanut Agglutinin for evaluating acrosomal loss from human spermatozoa.
J. Androl. 19, 542-50
- Curry, M. R. (2000)
Cryopreservation of semen from domestic livestock.
Rev. Reprod. 5, 46-52
- Curry, M. R. Watson, P. F. (1994)
Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury.
Cryobiology 31, 39-46
- Cumming, I. R. (1995)
Suitability of the intact acrosome method for the prediction of fertility in bovine artificial insemination.
Vet. Rec. 136, 289-91
- Davis, R. O., und Katz, D. F. (1992)
Operational standards for CASA instruments.
J. Androl. 14, 385-94
- De Andrade, A. F. C., De Arruda, R. P., Celeghini, E. C. C., Nascimento, J., Martins, S. M., Raphael, C. F., und Moretti, A. S. (2007)
Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm.
Reprod. Dom. Anim. 42, 190-4
- Defoin, L., Granados, A., und Donnay, I. (2007)
Can one predict the resistance of bull sperm to cryopreservation by analyzing motility parameters before freezing?
Reprod. Fertil. Develop. 19, 123

De Lamirande, E. und Gagnon, C. (1992)

Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effect on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes.

J. Androl. 13, 368-78

De Lamirande, E., und Gagnon, C., (1993)

Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process.

Free Radic. Biol. Med. 14, 157-66

De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Komada, H., und Gagnon, C. (1997)

Reactive oxygen species and sperm physiology.

Rev. Reprod. 2, 48-54

De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas J. H., Colenbrander, B., und Verkleij, A. J. (1993)

Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing.

Cryobiology 30, 32-44.

Den Daas, N. (1992)

Laboratory assessment of semen characteristics.

Anim. Reprod. Sci. 28, 87-94

Dhami, A. J., Sahni, K. L., und Mohan, G. (1992)

Effect of various cooling rates (from 30 degrees C to 5 degrees C) and thawing temperatures on the deep-freezing of Bos Taurus and Bos Bubalis semen.

Theriogenology 38, 565-74

Digrassi, W. A. (2000)

Evaluation of stallion frozen-thawed semen using conventional and flow cytometric assays.

Vet. Med. Diss., Blacksburg

Drummen, G. P. C., Gadella, B. M., Post, J. A., und Brouwers, J. F. (2004)

Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY^{581/591}.

Free Radic. Bio. & Med. 36, 1635-44

Ennen, B. D., Berndtson, W. E., Mortimer, R. G., und Pickett, B. W. (1976)

Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in 0.25-ml straws.

J. Anim. Sci. 43, 651-6

- Ericsson, S. A., Garner, D. L., Redelman, D., und Ahmad, K. (1989)
Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two flow cytometric systems.
Gamete Res. 22, 355-68
- Ericsson, S. A., Garner, D.L., Thomas, C. A., Downing, T. W., und Marshall, C. E. (1993)
Interrelationship among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa.
Theriogenology, 39, 1009-24
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z., und Melamed, M. R. (1980)
Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility.
Science 210, 1131-3
- Evenson, D., und Jost, L. (1994)
Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability.
Meth. Cell Biol. 42, 159-76
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Baer, R. K., Turner, T. W., und Schrader, S. M. (1991)
Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay.
Reprod. Toxicol. 5, 115-25
- Evenson, D. P., Larson, K. L., und Jost, L. K. (2002)
Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.
J. Androl. 23, 25-43
- Evenson, D. P., Parks, J. E., Kaproth, M. T., und Jost, L. K. (1993b)
Rapid determination of sperm cell concentration in bovine semen by flow cytometry.
J. Dairy Sci. 76, 86-94
- Evenson, D. P., Thompson, L., und Jost, L. (1994)
Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility.
Theriogenology 41, 637-51
- Farlin, M. E., Jasko, D. J., Graham, J. K., und Squires, E. L. (1992)
Assessment of Pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa.
Mol. Reprod. Dev. 32, 23-27

- Farrell, P. B., Presicce, G. A., Brockett, C. C., und Foote, R. H. (1998)
Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility.
Theriogenology 49, 871-9
- Foote, R. H. (1982)
Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present, and future.
J. Androl. 3, 85-100
- Foote, R. H., Brockett, C. C., und Kaproth, M. T. (2002)
Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants.
Anim. Reprod. Sci. 71, 13-23
- Foote, R. H., und Kaproth, M. T. (2002)
Large batch freezing of bull semen: effect of time of freezing and fructose on fertility.
J. Dairy Sci. 85, 453-6
- Frankel, E. N. (1987)
Secondary products of lipid oxidation.
Chem. Physic Lipids 44, 73-85
- Gadea, J. , Selles, E., und Marco, M. A. (2004)
The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions.
Reprod. Dom. Anim. 39, 303–8
- Gadella, B. M., Rathi, R., Brouwers, J. F., Stout, T. A., und Colenbrander, B. (2001)
Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm.
Anim. Reprod. Sci. 68, 249-65
- Garner, D. L., Johnson, L. A., Yue, S. T., Roth, B. L., und Haugland, R. P. (1994)
Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide.
J. Androl. 15, 620-9
- Garner, D. L., Thomas, C. A., und Allen, C. H. (1997)
Effect of semen dilution on bovine sperm viability as determined by Dual-DNA staining and flow cytometry.
J. Androl. 18, 324-31

Gérard, O., Druard, X., und Humblot, P. (2006)

Effects of antioxidants in semen extenders on bull sperm motility and fertility.

18th European A. I. Vets Meeting, Borås, Schweden

Gérard, O., Sellem, E., und Humblot, P. (2007)

Effect of the addition of antioxidant molecules to commercial diluters on in vitro characteristics and in vivo fertility of bovine semen.

19th European A. I. Vets Meeting, Celle, Deutschland

Gil, J. (1999)

Post-thaw sperm characteristics and fertility in dairy A.I. bulls, influence of extenders with components of animal or vegetal origin.

Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, International Master of Science Programme

Gil, J., Januskauskas, A., Háárd, M. C., Háárd, M., Johannisson, A., Söderquist, L., und Rodriguez-Martinez, H. (2000)

Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus[®] and Tri-ladyl[®].

Reprod. Dom. Anim. 35, 69-77

Gilbert, G. R., und Almquist, J. O. (1978)

Effects of processing procedures on post-thaw acrosomal retention and motility of bovine spermatozoa packaged in 0.3-ml straws at room temperature.

J. Anim. Sci. 46, 225-31

Gillan, L., Evans, G., und Maxwell, W. M. C. (2005)

Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential.

Theriogenology 63, 445-57

Gillan, L., Kroetsch, T., Maxwell, W.M.C., und Evans, G. (2008)

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

Anim. Reprod. Sci. 103, 201-14

Gledhill, B. L. (1988)

Selection and separation of x- and y-chromosome-bearing mammalian sperm.

Gamete Res. 20, 377-95

Graham, J. K. (1994)

In vitro assays of bull fertility.

15th NAAB Technical Conference on AI and Reproduction, 74–81

Graham, J. K. (2001)

Assesment of sperm quality: a flow cytometric approach.

Anim. Reprod. Sci. 68, 239-47

Graham, J. K., Kunze, E., und Hammerstedt, R. H. (1990)

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

Biol. Reprod. 43, 55-64

Griveau, J. F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J. P., und Le Lannou, D. (1995)

Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 103, 17-26

Grogan, W., und Collins, J. (1990)

Guide to flow cytometry methods.

Marcel Dekker, Inc., New York

Götze, R. (1949)

Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere.

Verlag M. u. H. Schaper, Hannover

Hallap, T., Háárd, M., Jaakma, U., Larsson, B., und Rodriguez-Martinez, H. (2004)

Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility?

Theriogenology 62, 702-13

Hallap, T., Nagy, S., Háárd, M., Jaakma, U., Johannisson, A., und Rodriguez-Martinez, H. (2005)

Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls.

Theriogenology 63, 1752-63

Halliwell, B., und Whiteman, M. (2004)

Measuring reactive species and oxidative damage in vivo an in cell culture: how should you do it and what do the results mean?

Brit. J. Pharm. 142, 231-55

Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., und Nolan, J. P. (1990)

Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive.

J. Androl. 11, 73-88

Hansen, C., Christensen, P., Hedeboe, A. M., und Boe-Hansen, G. (2002)

Validation of the FACSCount AF system for determination of sperm concentration in boar semen.

Reprod. Dom. Anim. 37, 330-4

Hansen, C., Vermeiden, T., Vermeiden, J. P., Simmet, C., Day, B. C., und Feitsma, H. (2006)
Comparison of FACSCount AF system, improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen.

Theriogenology 66, 2188-94

Herold, F. C., Gerber, D., und Aurich, J. E. (2003)

Influence of homologous seminal plasma on bovine epididymal semen frozen with Triladyl or AndroMed.

Wien. Tierärztl. Mschr. 90, 58 - 61

Heczko, K. H. (2004)

Einfluss der Zufütterung von karotinoidem Astaxanthin auf die Spermaqualität und die Fruchtbarkeit von Warmbluthengsten.

Vet. Med. Diss., Hannover

Hinsch, E., Hinsch, K. D., Boehm, J. G., Schill, W. B., und Müller-Schlösser, F. (1997)

Functional parameters and fertilisation success of bovine semen cryopreserved in egg yolk free and egg yolk containing extenders.

Reprod. Dom. Anim. 32, 143-9

Holt, W. V., Morris, G. J., Coulson, G., und North, R. D. (2005)

Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope.

J. Exp. Zoo. 246, 305-14

Holt, W. V., Watson, P., Curry, M., und Holt, C. (1994)

Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop.

Fertil Steril 62, 1277-82

Hurtado, M.M. P. (1998)

Kryokonservierung von Rindersamenzellen mit Biociphos- Plus: Untersuchungen nach Konfektionierung bei 4°C und Raumtemperatur.

Vet. Med. Diss., Zürich

Iwasaki, A., und Gagnon, C. (1992)

Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients.

Fertil. Steril. 57, 409-16

Janett, F., Keo, S., Bollwein, H., Hässig, M., und Thun, R. (2005)

Comparison of AndroMed[®], Bioxcell[®] and Triladyl[®] for cryopreservation of bull semen.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 147, 62 (Abstract)

Jansen, H. B. (1984)

The efficiency of bull semen production on 10 AI Centres in the Netherlands.

in: M. COUROT (Hrsg.): The male in farm animal reproduction,

Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Bosten. 264

Januskauskas, A., Gil, J., Söderquist, L., Hrd, M. G. M., Hrd, M. Ch., Johannisson, A., und Rodriguez-Martinez, H. (1999)

Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden.

Theriogenology 52, 641-58

Januskauskas, A., Johannisson, A., und Rodriguez-Martinez, H. (2001)

Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls.

Theriogenology 55, 947-61

Januskauskas, A., Johannisson, A., und Rodriguez-Martinez, H. (2003)

Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure and field fertility.

Theriogenology 60, 743-58

Januskauskas, A., und Zilinskas, H. (2002)

Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility.

Vet. Zoot. 17, online: www.lva.lt/vetzoo/old/Nr_17/pdf/januskauskas.pdf

Jeulin, C., Soufir, J. C., Weber, P., Caval-Martim, D., und Calvayrac, R. (1989)

Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma.

Gamete Research 24, 185-96

Kasimanickam, R., Nebel, R. L., Peeler, I. D., Silva, W. L., Wolf, K. T., McAllister, A. J., und Cassell, B. G. (2006)

Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity.

Theriogenology 66, 1307-15

- Kjaestad, H., Ropstad, E., und Berg, K. A. (1993)
Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen.
Acta Vet. Scand. 34, 299-303
- Kobayashi, J., Oguro, H., Uchida, H., Kohsaka, T., Sasada, H., und Sato, E. (2004)
Assessment of bovine x- and y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence in situ hybridization.
J. Reprod. Dev. 50, 463-9
- Koca, Y., Özdal, Ö. L., Celik, M., Ünal, S., und Balaban, N. (2003)
Antioxidant activity of seminal plasma in fertile and infertile men.
Arch. Androl. 49, 355-9
- Köss, C., Fuchs, I., und Bollwein, H. (2005)
Predictability of freezability of bovine spermatozoa by using flow cytometric assays.
Jahrestagung für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 30. Veterinär- Humanmedizinischen Gemeinschaftstagung, Zürich, Schweiz
- Krause, D. (1990)
Männliche Geschlechtsapparat.
in: G. ROSENBERGER (Hrsg.): Die klinische Untersuchung des Rindes.
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 422
- Krienke, M. (2003)
Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstsperma.
Vet. Med. Diss., München
- Krzanowski, M. (1970)
Dependence of primary and secondary sex ratio on the rapidity of sedimentation of bull semen.
J. Reprod. Fertil. 23, 11-20
- Kumar, S., Millar, J. D., und Watson, P. F. (2003)
The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines.
Cryobiology 46, 246-53
- Kupferschmied, H. U. (1993)
Künstliche Besamung beim Rind.
Hahn, R., Kupferschmied, H. U., Fischerleitner, F., (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart

Lague, D., und Greig, A. (1987)

Infertility in the bull, ram and boar. Collection and examination of semen.

In Practice 9, 167-70

Lichtenstern, A. (1995)

Färbeverhalten von Bullen-, Schafbock- und Eberspermien vor und nach *in vitro*-Kapazitation in verschiedenen Medien.

Vet. Med. Diss., München

Lorton, S. P., Winter, J. L., Pace, N. N., und Sullivan, J. J. (1984)

Evaluation of two semen collection regimes for mature Holstein bulls.

J. Anim. Sci. 58, 1-5

Madrid-Burya, N., Perez-Gutierrez, J. F., Perez-Garneloa, S., Moreiraa, P., Sanjuanbenitoa, B. P., und Gutierrez-Adana, A. (2005)

Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa.

Theriogenology 64, 232-41

Magistrini, M., Guitton, E., Levern, Y., Nicolle, J. C., Vidament, D., Kerboeuf, D., und Palmer, E. (1997)

New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry.

Theriogenology 48, 1229-35

Martin, I., und Emmens, C. W. (1958)

Factors affecting the fertility and characteristics of deep frozen bull semen.

Endocrinology 17, 449

Mazur, P. (1980)

Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis in mammalian ova and embryos.

9. international congress on animal reproduction and artificial insemination, Madrid, Spanien

Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., und Rodrigues, J. L. (2002)

Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?

Theriogenology 57, 327-44

Michael, A., Alexopoulos, C., Potiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Saratsis, P., und Boscoc, C. (2007)

Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa.

Theriogenology 68, 204-12

Morani, E. S. C., Roncoletta, M., Ancieto, K. L., Rodrigues, L. H., Franceschini, P. H., und Tedesco, A. C. (2004)

Production of reactive oxygen specie in bovine semen after freezing and thawing.
15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil, 474

Muiño, R., Fernandez, M., Arean, H., Viana, J. L., Frenandez, A., und Peña, A. I. (2005)

Post-thaw longevity and acrosomal integrity of bull spermatozoa frozen with three extenders.
Reprod. Dom. Anim. 40, 349 (Abstract)

Muiño, R., Fernandez, M., und Peña, A. I. (2007)

Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h.
Reprod. Dom. Anim. 42, 305-11

Müller, E., Rittmannsberger, F., und Szigali, J. (1971)

Untersuchungen über Heritabilität, phänotypische und genetische Korrelation von Reproduktionsmerkmalen bei intensiv aufgezogenen Jungbullen.
Wien. Tierärztl. Monatsschr. 58, 167-71

Nagy, S., Jansen, J., Topper, E. K., und Gadella, B. M. (2003)

A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles.
Biol. Reprod. 68, 1828-35

Nehring, H., und Rothe, L. (2003)

Insemination of cryopreserved bull semen portions with reduced sperm numbers after dilution with two egg yolk-free extenders.
15th European A. I. Vets Meeting, Budapest, Ungarn

Neild, D. M., Brouwers, J. F., Colenbrander, B., Agüero, A., und Gadella, B. M. (2005)

Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa.
Mol. Reprod. Dev. 72, 230-8

Nissen, H., und Kreysel, H. W. (1983)

Superoxide dismutase in human semen.
Klinische Wochenschrift 61, 63-65

O'Flaherty, C. M., Beorlegui, N. B., und Beconi, M.T. (1999)

Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction.
Theriogenology 52, 289-301

- O'Flaherty, C., Beorlegui, N., und Beconi, M. T. (2003)
Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm.
J. Androl. 26, 109-14
- Ohashi, T., Mizutani, A., Murakami, A., Kojo, S., Ishii, T., und Taketani, S. (2002)
Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species.
FEBS Lett. 511, 21-27
- Ostrovidov, S., Franck, P., Joseph, D., Martarello, L., Kirsch, G., Belleville, F., Nabet, P., und Dousset, B. (2000)
Screening of new antioxidant molecules using flow cytometry.
J. Med. Chem. 43, 1762-9
- Padrik, P., und Jaakma, Ü. (2004)
Sperm motility characteristics of Estonian Holstein dairy bulls and their relations to fertility.
Agraarteadus 15, 225-33
- Papaioannou, K. Z., Murphy, R. P., Monks, R. S., Hynes, N., Ryan, M. P., Boland, M. P., und Roche, J. F. (1997)
Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry.
Theriogenology 48, 299-312
- Phillips, N. J., McGowan, M. R., Johnston, S. D., und Mayer, D. G. (2004)
Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires.
Anim. Reprod. Sci. 81, 47-61
- Polge, C., Smith, A. U., und Parkes, A. S. (1949)
Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature.
Nature 164, 666-76
- Prathalingam, N. S., Holt, W. V., Revell, S. G., Jones, S., und Watson, P. F. (2006)
Dilution of spermatozoa results in improved viability following a 24 h period but decreased acrosome integrity following cryopreservation.
Anim. Reprod. Sci. 91, 11-22

Püschel, G. (1974)

Vergleichende Betrachtung über den Einsatz eines mobilen Phantoms (holländisches Modell, Hersteller: J.P. Tasche u. Zoon, Fleringen, Oldenzaalweg 103 / Holland) und von „Standbul-len“ bei der Samengewinnung in einer Rinderbesamungsstation.

Zuchthyg. 9, 7-14

Risopatron, J., Sanchez, R., Sepulveda, N., und Peña, P. (1996)

Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: comparison with washing/centrifugation.

Theriogenology 46, 65-73

Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N., und Breitbart, H. (2004)

Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction.

Biol. Reprod. 70, 518-22

Robbins, R. K., Saacke, R. G., und Chandler, P. T. (1976)

Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws.

J. Anim. Sci. 42, 145-54

Rodriguez- Martinez, H. (2003)

Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still Utopia?

Reprod. Dom. Anim. 38, 312-8

Santiani, A., Sepúlveda, N., Andaur, M., Risopatrón, J., Villegas, J., und Sánchez, R. (2004)

Improvement of post-thaw ram spermatozoa quality using antioxidants during the cooling process.

15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil, 475

Sehner, R. (2005)

Untersuchungen zum Einsatz modifizierter Medien und Bedingungen bei der Konservierung von Bullensperma.

Vet. Med. Diss., München

Schenk, J. L., Amann, R. P., und Allen, R. C. (1987)

Effects of extender and insemination dose on postthaw quality and fertility of bovine sperm.

J. Dairy Sci. 70, 1458-64

Schneider, H., Nabiev, D., Mahabir, E., Wimmers, K., Ponsuksili, S., Koll, H., Gilles, M., und Schellander, K. (2002)

Vergleich eines Tris-Eigelb Verdünners und AndroMed bei der Tiefgefrierkonservierung von Bullensamen- Einfluß auf mögliche fertilitätsrelevante in vitro Parameter aufgetauter Spermien.

29.Jahrestagung der AET-d, Bad Waldsee

Shannon, P. (1964)

The effect of diluents containing glycine and glycerol, on fertility of diluted bovine semen.

New Zealand J. Agri. Res. 7, 357-63

Shannon, P., und Curson, B. (1984)

Effect of storage temperature on the viability and fertility of bovine sperm diluted and stored in Caprogen.

New Zealand J. Agri. Res. 27, 173-7

Shannon, P., Curson, B., und Shannon, P. (1984)

Relationship between total spermatozoa/insemination and fertility of bovine semen stored in Caprogen at ambient temperature.

New Zealand J. Agri. Res. 27, 35-41

Shannon, P., und Vishwanath, R. (1995)

The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine sperm and a theoretical model to explain the fertility differences.

Anim. Reprod. Sci. 39, 1-10

Sies, H. (1993)

Strategies of antioxidant defence.

Eur. J. Biochem. 215, 213-9

Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., und Janson, L. (1991)

Post-thaw motility, ATP content and cytochrome C oxidase activity of A. I. bull spermatozoa in relation to fertility.

Zentralbl. Veterinarmed. A 38, 165-74

Sreejith, J. N., Brara, A. S., und Ahuja, C. S. (2006)

A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature.

Anim. Reprod. Sci. 96, 21-29

Stefanov, R., Angelova, M., Stefanova, T., Subev, M., Dolashka, P., Voelter, W., und Zachariev, Z. (2004)

Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain *Humicola lutea* 103 improves ram spermatozoa functions in vitro.

Andrologia 36, 51-56

Storey, B. T. (1997)

Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa.

Mol. Human Reprod. 3, 203-13

Tardif, A. L., Farrell, P. B., Trouern-Trend, V., und Foote, R. H. (1997)

Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5 °C.

J. Dairy Sci. 80, 1606-12

Tartaglione, C. M., und Ritta, M. N. (2004)

Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen.

Theriogenology 62, 1245-52

Thomas, C. A., und Garner, D. L. (1994)

Post-thaw bovine spermatozoal quality estimated from fresh samples.

J. Androl. 15, 489-500

Thomas, C. A., Garner, D. L., Dejarnette, J. M., und Marshall, C. E. (1998)

Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry.

Biol. Reprod. 58, 786-93

Thun, R., Hurtado, M., und Janett, F. (2002)

Comparison of Biociphos-Plus[®] and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen.

Theriogenology 57, 1087-94

Thundathil, J., Gil, J., Januskauskas, A., Larsson, B., Söderquist, L., Mapletoft, R., und Rodriguez-Martinez, H. (1999)

Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed semen and fertility with artificial insemination.

Int. J. Androl. 22, 366-73

- Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D. S., und Aitken, R. J. (1998)
Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants.
Hum. Reprod. 13, 1429-36
- Vishwanath, R. (2003)
Artificial insemination: the state of the art.
Theriogenology 59, 571-84
- Vishwanath, R., und Shannon, P. (2000)
Storage of bovine semen in liquid and frozen state.
Anim. Reprod. Sci. 62, 23-53
- Volz, R. (1990)
Untersuchungen über Zusammenhänge zwischen computervideomikrographisch ermittelten Parametern von Bullensperma und der NRR.
Vet. Med. Diss., Gießen
- Vyas, S., Mohan, G., Dharni, A. J., und Sahni, K. L. (1992)
Studies on the norms and correlations of initial and post-thaw seminal attributes of triple crossbred bulls.
J. Anim. Sci. 7, 73-76
- Watson, P. F. (2000)
The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.
Anim. Reprod. Sci. 60-61, 481-92
- Wenkoff, M. S. (1988)
The evaluation of bulls for breeding soundness.
Canadian Veterinary Medical Assoc., Ottawa. (CA) 1988. 2nd ed.
- Wiggin, H. B., und Almquist, J. O. (1975)
Combinations of glycerol percent, glycerol equilibration time, and thawing rate upon freezability of bull spermatozoa in plastic straws.
J. Dairy Sci. 58, 416-9
- Woelders, H., und Chaveiro, A. (2004)
Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes.
Cryobiology 49, 258-71

Woelders, H., und Malva. A. P. (1998)

How important ist he cooling rate in cryopreservation of (bull) semen, and what is its relation to thawing rate and glycerol concentration.

Reprod. Dom. Anim. 33, (1998)

Yamada, M., Noguchi, M., Ho, Y., und Nakakita, T. (1974)

Studies on the Content in Spermatozoa of Human Sterility with impulse cytophotometer (Phywe ICP-11).

Nippon Funin Gakkai Zasshi 19, 62-69

9 Anhang

Anhang 1: Motilitätswerte gefrierkonservierter Bullenspermien nach unterschiedlicher Äquilibriumsdauer für erste Gruppe (2 Bullen mit guten Einfriereigenschaften, 16 Ejakulate)

Variante Äquilibriumsdauer (h)	Zeit (min.)	% motil		% prog. motil.		VAP	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
1	30	28,7	±12,9	20,6	±11,2	65,0	±6,7
	120	19,4	±9,5	12,3	±7,7	51,5	±9,1
2	30	37,6	±20,0	28,9	±20,3	65,3	±6,7
	120	27,8	±14,7	20,3	±13,0	54,2	±4,5
3	30	41,0	±15,4	32,3	±15,1	69,9	±4,7
	120	35,1	±8,6	26,0	±8,4	55,1	±5,2
4	30	48,5	±13,5	38,9	±14,4	67,3	±5,9
	120	40,3	±10,8	32,5	±11,1	55,4	±4,5
5	30	50,0	±14,7	40,9	±14,5	68,5	±6,4
	120	41,3	±10,9	33,4	±10,5	55,5	±4,5
24	30	56,3	±13,9	47,1	±14,9	69,7	±6,3
	120	47,0	±12,0	38,2	±11,8	56,6	±6,4
28	30	63,3	±9,5	53,6	±10,0	72,1	±3,6
	120	49,7	±10,0	40,8	±10,4	56,2	±4,4
48	30	68,5	±9,6	58,7	±11,1	70,2	±5,5
	120	52,2	±9,8	42,8	±10,6	56,1	±4,6

% motil – Anteil motiler Spermien; % prog. motil – Anteil progressiv motiler Spermien, VAP - mittlere Bahngeschwindigkeit

Anhang 2: Motilitätswerte gefrierkonservierter Bullenspermien nach unterschiedlicher Äquilibriumsdauer für zweite Gruppe (2 Bullen mit schlechten Einfriereigenschaften, 16 Ejakulate)

Variante Äquilibriumsdauer (h)	Zeit (min.)	% motil		% prog. motil.		VAP	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
1	30	23,9	±12,2	16,1	±11,7	58,1	±5,8
	120	14,1	±7,8	8,2	±6,5	48,7	±7,4
2	30	31,4	±10,8	24,1	±10,4	60,6	±5,7
	120	20,3	±6,9	13,7	±6,1	50,9	±3,7
3	30	33,7	±9,7	24,8	±9,2	59,4	±3,8
	120	23,1	±9,6	15,2	±7,7	52,4	±4,7
4	30	42,2	±8,8	32,8	±8,6	61,8	±3,6
	120	28,0	±5,0	19,5	±4,1	51,0	±4,3
5	30	40,1	±8,9	30,5	±8,3	62,1	±5,4
	120	31,7	±9,3	23,8	±8,2	51,7	±4,0
24	30	53,7	±9,3	42,8	±9,8	65,3	±3,8
	120	32,6	±7,2	24,3	±6,2	51,9	±4,3
28	30	52,5	±8,6	42,6	±8,8	62,5	±5,2
	120	32,1	±12,0	24,0	±11,8	47,9	±6,0
48	30	55,3	±11,5	46,2	±12,4	64,2	±4,9
	120	35,1	±11,4	25,8	±10,8	48,6	±4,2

% motil – Anteil motiler Spermien; % prog. motil – Anteil progressiv motiler Spermien, VAP - mittlere Bahngeschwindigkeit

Anhang 3: Befruchtungsergebnisse (NRR90) aus dem Besamungseinsatz von gefrierkonserviertem Bullensperma nach Verdünnung mit den Verdünnern Triladyl[®] und BioXcell[®], sowie ohne und mit Zusatz von Oxyfree[®]

Bulle	Ejaku- lat	Variante 1 Triladyl [®]	Variante 2 Triladyl [®] +Oxyfree [®]	Variante 3 BioXcell [®]	Variante 4 BioXcell [®] +Oxyfree [®]
A	1	66,6 %	65,2 %	59,3 %	60,6 %
	2	65,0 %	59,5 %	60,3 %	69,2 %
	3	51,1 %	60,3 %	60,3 %	58,6 %
B	1	74,6 %	67,5 %	63,3 %	61,6 %
	2	73,1 %	70,8 %	73,5 %	72,1 %
	3	74,5 %	75,9 %	67,3 %	50,8 %
C	1	-	57,8 %	64,5 %	47,2 %
	2	67,2 %	58,1 %	-	67,5 %
	3	65,3 %	64,6 %	55,7 %	55,5 %
D	1	67,6 %	47,6 %	59,8 %	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	68,1 %	-

Anhang 4: Befruchtungsergebnisse (NRR90) aus dem Besamungseinsatz vom gefrierkonservierten Bullensperma nach Verdünnung mit den Verdünnern Triladyl[®] auf 14 bzw. 8 Millionen Gesamtspermien/Paillette, ohne und mit Zusatz von Oxyfree[®]

Bulle	Ejakulat	Variante 1 14 Mio. ohne Oxyfree [®]	Variante 2 8 Mio. ohne Oxyfree [®]	Variante 3 14 Mio. mit Oxyfree [®]	Variante 4 8 Mio. mit Oxyfree [®]
A	1	53,1 %	67,5 %	55,3 %	61,2 %
	1	60,0 %	72,0 %	73,1 %	64,4 %
B	2	70,0 %	68,6 %	64,8 %	48,9 %
	3	65,5 %	61,3 %	66,6 %	69,2 %
	4	57,5 %	60,9 %	56,6 %	56,8 %
	1	57,7 %	54,1 %	66,2 %	70,6 %
C	2	69,2 %	78,7 %	55,5 %	-
	3	63,1 %	80,0 %	63,0 %	72,2 %
	4	65,4 %	67,8 %	71,9 %	50,0 %
	1	66,6 %	68,7 %	77,0 %	65,7 %
D	2	66,3 %	74,7 %	72,1 %	71,2 %
	3	67,9 %	71,5 %	64,7 %	66,3 %
	4	74,7 %	65,1 %	71,2 %	68,4 %
	1	55,1 %	58,9 %	52,4 %	52,8 %
E	2	69,1 %	64,1 %	54,2 %	62,5 %
	3	55,6 %	57,9 %	56,2 %	55,4 %
	4	63,3 %	60,3 %	61,8 %	53,5 %
	1	72,0 %	51,5 %	70,7 %	60,8 %
F	2	61,6 %	65,4 %	64,1 %	70,1 %
	3	66,6 %	65,9 %	55,4 %	70,6 %

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Heuwieser danke ich sehr für seine Unterstützung beim Abschluß dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. C. Leiding für die Vermittlung dieser Dissertation, für die Möglichkeit der Versuchsdurchführung und die großzügige Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen.

Vielen Dank an dem Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere in Schönow, Herrn Dr. Nehring und Herrn Rothe für die gute Betreuung und freundliche Unterstützung.

Den Mitarbeitern der Besamungsstation in Neustadt a. d. Aisch und insbesondere Frau H. Göbel danke ich für die freundliche und unkomplizierte Aufnahme in das Team und die daraus resultierenden hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Dem BVN-Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch e. V. gilt ein herzliches Dankeschön für die Ermöglichung dieser Arbeit insbesondere für Bereitstellung des Gerätes, Materialien und die Berechnung der Non-Return-Raten und nicht zuletzt für die finanzielle Unterstützung.

Für die finanzielle Unterstützung bin ich der Dr. Dr. h. c. Karl-Eibl-Stiftung zu besonderem Dank verpflichtet.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und vor allem bei meiner Freundin Tudorița von ganzem Herzen für die Unterstützung und das Verständnis besonders in schweren Zeiten bedanken.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfe in Anspruch genommen habe.

Mihai Cristian Griga

Berlin, den 17. Juni 2008