

**Aus der Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Segmentale Analyse und Tiefgefrierkonservierung von Spermien aus den  
Nebenhodenschwanzsegmenten beim Hengst**

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

**vorgelegt von**  
Svenja Brigitta Rheinfeld  
**Tierärztin**  
aus Köln

**Berlin 2015**

**Journal-Nr.: 3826**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ. Prof. Dr. Johannes Handler  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Peter-Henning Clausen  
Dritter Gutachter: Univ. Prof. Dr. Robert Klopffleisch

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

stallions, semen, preservation, semen production, male fertility, freezability,  
frozen semen, laboratory methods, analytical methods, computer analysis

Tag der Promotion: 03.12.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-677-7

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2015**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

**Meinen Eltern gewidmet**



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALH	Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung (Amplitude of Lateral Head Displacement)
AOC	durchschnittlicher Richtungswechsel (Average Orientation Change of Head)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BCF	Häufigkeit der Überschreitung der mittleren Bahn, Schlagfrequenz der Spermienflagelle (Beat Cross Frequency)
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
CASA	Computer-assistierte Spermienanalyse
cm	Zentimeter
CPA	cryoprotective agent
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNC	individuelle Varianz von Bewegungsbahnlängen (Dance)
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DSO	täglichen Menge an zu ejakulierenden Spermien (Daily Sperm Output)
DSP	tägliche Spermienproduktion (Daily Sperm Production)
FR	Einfrierrate (Freezing Rate)
G	Gauge
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
Gesamt	Gesamtbeweglichkeit
ggr.	geringgradig
IVF	<i>in vitro</i> Fertilisation
KR	Kühlrate
LIN	Linearität (Linearity)
LN	Flüssigstickstoff
MHz	Megahertz
Min	Minute
mgr.	mittelgradig
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mOsm	Milliosmol
N	in Flüssigstickstoff fallen lassen (-196°C)

NeHo	Nebenhoden
PBS	Phosphat-buffered Saline
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SMI	Spermienbewegungsindex (Sperm Motility Index)
SPGZ	Spermiengesamtzahl
STR	Geradlinigkeit (Straightness)
SVI	Spermiengeschwindigkeitsindex (Sperm Velocity Index)
Tab.	Tabelle
TALP	Tyrodé`albumin lactate pyruvate
TG	Tiefgefrierkonservierung
U	Unbeweglichkeit
VAP	mittlere Bahngeschwindigkeit (Velocity Average Path)
VCL	kurvilineare Bahngeschwindigkeit (Velocity Curve Line)
VE	Vas efferens
V/O/U	Vorwärts-/ Orts-/ Unbeweglich
VSL	geradlinige Bahngeschwindigkeit (Velocity Straight Line)
vs.	versus
WHO	World Health Organization
WOB	Wobbler (Degree of oscillation of the actual spermhead trajectory about its average path)

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
2.	Literaturübersicht.....	2
2.1	Der Nebenhoden (Epididymis) .....	2
2.1.1	Anatomie des Nebenhodens .....	2
2.1.2	Histologie des Nebenhodens.....	2
2.1.3	Physiologie des Nebenhodens .....	5
2.2	Morphologie des Hengstpermiums .....	8
2.2.1	Der Spermienkopf .....	8
2.2.2	Der Spermischwanz .....	8
2.2.3	Die Plasmamembran.....	9
2.3	Spermatogenese.....	9
2.3.1	Spermatogonien.....	9
2.3.2	Spermatozyten erster Ordnung .....	10
2.3.3	Spermatozyten zweiter Ordnung .....	10
2.3.4	Spermatiden, Spermio-genese .....	11
2.4	Fertilität von frischen und tiefgefrorenen Nebenhodenspermien.....	12
2.5	Gewinnung von Nebenhodenspermien .....	13
2.6	Andrologische Untersuchung .....	15
2.6.1	Morphologische Untersuchung der äußeren Genitalorgane .....	15
2.6.2	Makroskopische Samenuntersuchung.....	17
2.6.3	Mikroskopische Samenuntersuchung.....	17
2.7	Verdünnung und Konservierung von Spermien .....	24
2.7.1	Aufbereitung von Hengstpermien mit Frischsamenverdünner.....	24
2.7.2	Überprüfung der Haltbarkeit von Hengstpermien (Haltetest).....	24
2.7.3	Tiefgefrierkonservierung von Hengstpermien .....	25
3.	Material und Methoden .....	39
3.1	Hengste.....	39
3.2	Präoperative Untersuchung der Hengste.....	39

3.3	Gewinnung und Untersuchung der Nebenhoden.....	39
3.3.1	Kastration.....	39
3.3.2	Nebenhodenaufbereitung und Gewichtsbestimmung .....	39
3.3.3	Bestimmung der Volumina von Hoden und Nebenhoden .....	40
3.4	Makroskopische und palpatorische Untersuchung des Nebenhodens.....	40
3.5	Präparation und Einteilung der Nebenhodenabschnitte.....	41
3.6	Gewinnung von Nebenhodenspermien .....	43
3.6.1	Slicing der Abschnitte E7 und E8 .....	43
3.6.2	Retrograde Spülung des Abschnittes E9.....	43
3.7	Untersuchung der Nebenhodenspermien.....	43
3.7.1	Dichtebestimmung mit der Zählkammer nach BÜRKER-TÜRK.....	43
3.7.2	Dichtebestimmung mit dem NucleoCounter® .....	44
3.7.3	Spermiengesamtzahl.....	44
3.7.4	pH-Wert.....	44
3.7.5	Motilität .....	44
3.7.6	Agglutination .....	45
3.7.7	Fremdzellengehalt.....	45
3.8	Zentrifugation der Proben.....	46
3.9	Konservierung von Nebenhodenspermien.....	46
3.9.1	Frischsamenkonservierung .....	46
3.9.2	Tiefgefrierkonservierung.....	46
3.10	Auftauprobe.....	49
3.10.1	Motilitätsanalyse.....	49
3.10.2	Dichtebestimmung .....	49
3.10.3	Haltetest der Auftauprobe .....	50
3.11	Auswertung und Statistik .....	51
4.	Ergebnisse .....	52
4.1	Hengste.....	52
4.2	Präoperative Untersuchung der Hengste.....	52

4.3	Makroskopische Untersuchung des Nebenhodens.....	52
4.3.1	Nebenhodengewicht und -volumen .....	52
4.3.2	Vermessung des Nebenhodenschwanzes.....	52
4.3.3	Konsistenz des Nebenhodenschwanzes .....	52
4.4	Untersuchung der Nebenhodenspermien .....	53
4.4.1	Makroskopische Untersuchung der Nebenhodenspülflüssigkeit .....	53
4.4.2	Dichtebestimmung und Spermigesamtzahl der Spermien der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9.....	55
4.4.3	pH-Wert.....	63
4.4.4	Agglutination .....	63
4.4.5	Fremdzellengehalt.....	63
4.5	Motilität und Geschwindigkeiten der Nebenhodenspermien der Segmente E7 – E9 vor der Kryokonservierung.....	64
4.5.1	Motilität der Nebenhodenspermien nach der Verdünnung mit EquiPro™ .....	64
4.5.2	Geschwindigkeitsparameter und Bewegungsmuster der Nebenhodenspermien nach der Verdünnung mit EquiPro™ .....	66
4.5.3	Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach der Lagerung bei +4 °C (Haltetest) .....	70
4.5.4	Motilität der Nebenhodenspermien mit Gent-Verdünner.....	76
4.5.5	Geschwindigkeitsparameter der Nebenhodenspermien mit Gent-Verdünner ..	77
4.5.6	Methodenvergleich der subjektiv und objektiv bestimmten Motilität, der mit EquiPro™ verdünnten Spermien .....	81
4.5.7	Auswirkung der verschiedenen Verdünner auf die subjektiv und objektiv bestimmte Motilität der Nebenhodenspermien, Methodenvergleich der Verdünnung mit EquiPro™ und Gent-Verdünner .....	82
4.6	Tiefgefrierbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien der Segmente E7 – E9 nach der Kryokonservierung mit verschiedenen Einfriermethoden (Auftauprobe).....	83
4.6.1	Motilität und Geschwindigkeitsparameter der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach dem Tiefgefrieren mit der Schwimmrampe ohne Kühlung (SRS).....	84

4.6.2	Motilität und Geschwindigkeitsparameter der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach dem Tiefgefrieren mit der Schwimmrampe mit vorausgegangener Kühlung (SRL).....	89
4.6.3	Motilität und Geschwindigkeitsparameter der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach dem Tiefgefrieren mit dem Einfrierautomat ohne Kühlung (ICS) .....	94
4.6.4	Motilität und Geschwindigkeitsparameter der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach dem Tiefgefrieren mit dem Einfrierautomat mit vorausgegangener Kühlung (ICL).....	100
4.6.5	Vergleich der Auswirkung der Einfriermethoden auf die Auftauergebnisse....	105
4.6.6	Haltbarkeit der aufgetauten Nebenhodenschwanzspermien bei der Lagerung bei +4 °C .....	106
5.	Diskussion.....	114
5.1	Auswahl der Hengste .....	114
5.2	Makroskopische Untersuchung des Nebenhodens.....	115
5.2.1	Nebenhodengewicht .....	115
5.3	Gewinnung und Dichtebestimmung der Nebenhodenschwanzspermien .....	115
5.3.1	Gewinnung von Nebenhodenschwanzspermien.....	115
5.3.2	Dichtebestimmung und Spermiengesamtzahl im Nebenhoden und Nebenhodenschwanz .....	116
5.3.3	Vergleich der Dichtebestimmung mit der Zählkammer nach BÜRKER-TÜRK und dem NucleoCounter® .....	117
5.4	Motilität und Geschwindigkeiten der Nebenhodenschwanzspermien der Segmente E7 – E9 vor der Kryokonservierung unter Verwendung verschiedener Verdüner.....	118
5.4.1	Motilität der Nebenhodenschwanzspermien nach Verdünnung mit Frischsamen- und Tiefgefrierverdünner .....	118
5.4.2	Geschwindigkeit der Nebenhodenschwanzspermien nach Verdünnung mit Frischsamen- und Tiefgefrierverdünner .....	121
5.4.3	Methodenvergleich der subjektiv und objektiv bestimmten Motilität.....	121
5.5	Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach der Lagerung bei +4 °C (Haltetest) .....	123

5.6	Tiefgefrierbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien der Segmente E7 – E9 nach der Kryokonservierung mit verschiedenen Einfriermethoden (Auftauprobe).....	124
5.6.1	Veränderung der Geschwindigkeiten und Bewegungsmuster durch den Tiefgefrier-Auftauprozess bei Nebenhodenschwanzspermien .....	125
5.6.2	Verbesserung der Tiefgefrierbarkeit equiner Nebenhodenschwanzspermien	126
5.7	Haltbarkeit der aufgetauten Nebenhodenschwanzspermien bei der Lagerung bei +4 °C	128
6.	Zusammenfassung .....	130
7.	Summary .....	132
8.	Literaturverzeichnis.....	134
8.	Anhang .....	153
8.1	Tabellenverzeichnis.....	153
8.2	Tabellen .....	155
8.3	Abbildungsverzeichnis.....	173
8.4	Bauanleitung Slicing-Gerät.....	177



## 1. Einleitung

Der Nebenhoden übt eine zentrale Funktion bei der Reifung und Speicherung von Samenzellen aus (MARENGO 2008). Während der Passage des Nebenhodenganges erhalten die Spermien wichtige Eigenschaften, die für ihre Befruchtungsfähigkeit entscheidend sind, weshalb sich Störungen in diesem Abschnitt der Entwicklung negativ auf die Fertilität des Hengstes auswirken. Kenntnisse über die Physiologie des Nebenhodens und der Spermienreifung sind wichtige Grundlagen, um die Pathogenese von Fertilitätsstörungen zu verstehen und Therapieansätze zu entwickeln.

Bei bedrohten Tierarten leisten die Funktion der Nebenhoden und Tiefgefrierkonservierung der Nebenhodenspermien einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung des genetischen Materials und Errichtung von Genbanken. Auch in der Pferdezucht haben Bedeutung und Nachfrage der Konservierung von Nebenhodenspermien in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Das genetische Material von wertvollen Hengsten kann auf diesem Weg, nach plötzlich notwendig gewordenen Kastrationen oder unvorhergesehenem Ableben des Tieres, gesichert werden (BRUEMMER et al. 2002, JAMES et al. 2002, MELO et al. 2010).

Das Ziel der Studie ist es weitere Erkenntnisse über die Auswirkungen der Spermienreifung im Endabschnitt des Nebenhodens auf die Samenaufbereitung zu gewinnen. Es werden Unterschiede in der Motilität, den Bewegungsmustern und der Geschwindigkeit der Spermien sowie deren Haltbarkeit in den einzelnen Abschnitten des Nebenhodenschwanzes vor und nach dem Einfriervorgang untersucht. Um ein optimiertes, praxistaugliches Protokoll für die Kryokonservierung von Nebenhodenspermien zu erstellen, werden die Ergebnisse der Kryokonservierung mit der Schwimrampe bzw. dem programmierbaren Einfrierautomaten anhand der Auftauergebnisse miteinander verglichen. Außerdem werden die Auswirkungen der Kühlung, vor der Tiefgefrierung, auf die Tiefgefrierbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien untersucht. Es werden zwei unterschiedliche Einfrierprogramme, mit und ohne Kühlung, vor dem eigentlichen Tiefgefriervorgang getestet.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1 Der Nebenhoden (Epididymis)**

#### **2.1.1 Anatomie des Nebenhodens**

Die Hoden und Nebenhoden des Hengstes sind paarig angelegt und befinden sich im Skrotum. Den Nebenhoden kann man makroskopisch in Nebenhodenkopf (Caput epididymidis), Nebenhodenkörper (Corpus epididymidis) und Nebenhodenschwanz (Cauda epididymidis) einteilen. Dorsolateral, dem Hoden am Margo epididymalis anliegend, befinden sich Nebenhodenkopf und -körper. Am kranialen Hodenpol liegt der Nebenhodenkopf und am caudalen Hodenpol befindet sich der kolbenförmige Nebenhodenschwanz. Hoden und Nebenhoden sind über ein Gekröse, das Mesepididymis, miteinander verbunden. Durch das Ligamentum testis proprium ist der Nebenhodenschwanz am kaudalen Hodenpol fixiert. Über das Ligamentum caudae epididymidis wird der Nebenhodenschwanz mit dem Processus vaginalis verbunden. Der Nebenhoden ist von einer festen, bindegewebigen Kapsel umgeben. Ductuli efferentes entspringen aus dem Rete testis und treten am cranialen Hodenpol durch die Tunica albuginea in den Nebenhodenkopf ein. Dort vereinigen sie sich zum Nebenhodengang, welcher beim Hengst 72 bis 80 Meter lang ist (NICKEL et al. 1987). Nach NICKEL et al. (1987) münden 12 bis 23 Ductuli efferentes in den Nebenhodenkopf. In einer Studie von HEMEIDA et al. (1978) konnten 11 bis 18 Ductuli efferentes gefunden werden.

Der Nebenhodengang (Ductus epididymidis) ist stark gewunden und gliedert sich in Lämpchen (Lobuli epididymidis), die durch bindegewebige Septen voneinander abgegrenzt sind (NICKEL et al. 1987, ROBAIRE et al. 2006).

#### **2.1.2 Histologie des Nebenhodens**

Den Nebenhodengang kleidet ein zweireihiges, hochprismatisches Epithel aus, dessen Höhe von proximal nach distal abnimmt. Gleichzeitig nimmt die Weite des Nebenhodenganglumens im Verlauf zu (SINOWATZ 2001). Das Nebenhodengangepithel setzt sich bei allen Säugetierspezies aus Haupt- und Basalzellen zusammen. Bei vielen Spezies sind aber noch zusätzliche Zelltypen vorhanden, wie Apikalzellen, „helle Zellen“ („clear cells“) (WROBEL und DELLMANN 1993), „schmale Zellen“ („narrow cells“) und Halozellen (COOPER 1998, ROBAIRE et al. 2006). Um die Epithelschicht legt sich eine dünne Bindegewebsschicht, gefolgt von einer dickeren Muskelschicht, deren Stärke von proximal nach distal zunimmt und die eine wichtige Rolle beim Transport der zunächst unbeweglichen Spermien spielt (SINOWATZ 2001).

Als Alternative zu der herkömmlichen Einteilung des Nebenhodens in Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz empfehlen GLOVER und NICANDER (1971) die Gliederung des Nebenhodens in Initial-, Mittel- und Terminalsegment auf der Grundlage histologischer und

zytologischer Merkmale. Hierbei dienen die Form und Weite des Nebenhodenganglumens, die Höhe des Nebenhodengangepithels, das Verteilungsmuster der Epithelzellen und morphologische Unterschiede der einzelnen Zelltypen als Kriterien. Je nach Tierspezies werden weitere Differenzierungsschemata für den Nebenhoden beschrieben. Bei der Ratte werden sechs verschiedene Zonen mit Subzonen unterschieden (REID und CLELAND 1957). Der Nebenhoden des Meerschweins ist in sieben Zonen gegliedert, der des Kaninchens in acht Zonen (NICANDER 1957, HOFFER und GREENBERG 1978, JONES et al. 1979). Für den Nebenhoden des Katers werden vier Regionen angegeben (SANCHEZ et al. 1998). Die Nebenhoden von Hengsten, Bullen und Schafböcken können jeweils in sechs Segmente unterteilt werden (NICANDER 1958, GOYAL 1985, LOPEZ et al. 1989). In der Studie von NICANDER (1958) wurde anhand histologischer Schnitte von vierzehn Paaren equiner Nebenhoden eine Einteilung des Nebenhodenganges in sechs Regionen vorgenommen. Die Region 1 zeigt ein sternförmiges Lumen mit geringer Anzahl Spermien und einer Epithelhöhe von 70 bis 110  $\mu\text{m}$ . In der Region 2 weitet sich das Lumen und eine Epithelhöhe von 45 bis 60  $\mu\text{m}$  ist ersichtlich. Region 3 enthält mehr Spermien und die Epithelhöhe beträgt 50 bis 60  $\mu\text{m}$ . Charakteristisch für die Region 4 sind die niedrige Epithelhöhe mit ca. 45  $\mu\text{m}$  und die hohe Konzentration an Spermien im Lumen. Die Epithelhöhe in der Region 5 beträgt 50 bis 70  $\mu\text{m}$  und das Lumen enthält weniger Spermien. In der Region 6 weitet sich das Lumen erheblich und die Epithelhöhe nimmt merklich ab, sie weist hier nur noch 20 bis 25  $\mu\text{m}$  auf.

Den überwiegenden Anteil der Zellen des Nebenhodengangepithels aller Säugetierspezies stellen die Hauptzellen dar, die je nach Region strukturelle und funktionelle Unterschiede zeigen. Morphologisch sind Hauptzellen durch eine schlanke Form, einen basal liegenden Zellkern sowie durch zahlreiche, hochentwickelte sekretorische und endozytotische Zellorganellen gekennzeichnet (ROBAIRE et al. 2006). Zwischen den Hauptzellen befinden sich „tight junctions“, die den freien Austausch von Molekülen zwischen Blut und Nebenhodenganglumen verhindern, sie bilden die Basis der Blut-Nebenhoden-Schranke (COOPER 1998, SINOWATZ 2001). Nach COOPER (1998) stellen die Hauptzellen 59 % der Zellpopulation dar.

Als zweiter Zelltyp, der bei allen Säugetierspezies vorhanden ist, werden die Basalzellen genannt. Entlang der Basallamina des Nebenhodengangepithels liegen sie über die gesamte Länge des Nebenhodengangs verteilt. Die Basalzellen haben keinen direkten Kontakt mit dem Lumen. Bei der Ratte werden Zellfortsätze beschrieben, die die Hauptzellen wie ein Netz umspannen und bis zum Lumen reichen können (COOPER 1998).

Einen weiteren Zelltyp bilden die Apikalzellen. Diese befinden sich hauptsächlich im proximalen Anteil des Nebenhodengangs (COOPER 1998, ROBAIRE et al. 2006), sie

besitzen einen sphärischen, apikal gelegenen Zellkern und haben keinen Kontakt zur Basalmembran des Epithels. Sie unterscheiden sich durch ihr Expressionsprofil von den anderen Zellen, aber es ist noch sehr wenig über ihre Funktion bekannt (ROBAIRE et al. 2006). Es wird angenommen, dass die Apikalzellen durch ihre endozytotische und sekretorische Funktion zur Reifung der Spermien im Nebenhodengang beitragen (ADAMALI und HERMO 1996). Apikalzellen wurden bei Ratten (REID und CLELAND 1957, ADAMALI und HERMO 1996), Mäusen (ABOU-HAÏLA und FAIN-MAUREL 1984), Hamstern (FLICKINGER et al. 1978), Meerschweinchen (HOFFER und GREENBERG 1978), Ziegen (GOYAL und WILLIAMS 1991) und Schafböcken (NICANDER 1979), Bullen (GOYAL 1985) und Hengsten (ARRIGHI et al. 1993) beschrieben.

Bei Ratten und Mäusen wurde im Anfangs- und Mittelsegment des Nebenhodens eine zusätzliche Zellform identifiziert: die „schmalen Zellen“ („narrow cells“), die nach ihrer schlanken Form benannt sind (ADAMALI und HERMO 1996, ROBAIRE et al. 2006). Ihre Verteilung ist nur auf das Anfangs- und Mittelsegment des Nebenhodens beschränkt. Im apikalen Anteil der Zelle sind zahlreiche tassenförmige Vesikel gelegen, darüber hinaus enthält das Zytoplasma Endosomen und Lysosomen. Auf der apikalen Membran zeigen sich kleine Gruben („coated pits“), die für die rezeptorvermittelte Endozytose von Bedeutung sind (ROBAIRE et al. 2006). ADAMALI und HERMO (1996) vermuten, dass die „schmalen Zellen“ durch Sekretion und Endozytose verschiedenster Moleküle das Nebenhodenmilieu verändern und so die Spermienreifung im Nebenhodengang beeinflussen.

Die „hellen Zellen“ („clear cells“) sind große Zellen, deren endozytotische Funktion durch vielzählige kleine Gruben auf der apikalen Zelloberfläche („coated pits“), Vesikel, Endosomen und Lysosomen charakterisiert wird (ROBAIRE et al. 2006). Aufgrund der vielen Vakuolen im Zytoplasma färben sich die „hellen Zellen“ heller an als die benachbarten Hauptzellen, wodurch sie ihren Namen erhalten haben (REID und CLELAND 1957). Im Vergleich zu den Hauptzellen ist die endozytotische Kapazität der „hellen Zellen“ höher. Die Aufnahme des abgeworfenen Zytoplasmatröpfchens der reifenden Spermien wird der Endozytoseleistung der „hellen Zellen“ zugeordnet (HERMO et al. 1988). Ihre Verteilung erstreckt sich über den gesamten Nebenhodenkanal (ROBAIRE et al. 2006). Die „hellen Zellen“ sind bei der Ratte (REID und CLELAND 1957), dem Hamster (FLICKINGER et al. 1978) und dem Hund (SCHIMMING und VICENTINI 2001) beschrieben.

Nahe der Basallamina des Nebenhodengangepithels befinden sich die Halozellen. Ihnen wird eine immunologische Funktion zugeordnet. Die Halozellen sind klein und enthalten sekretorische Granula (ROBAIRE et al. 2006). Erstmals wurden die Halozellen von REID und CLELAND 1957 bei der Ratte beschrieben. Aufgrund der hellen Umrandung um die Zelle herum, wurde dieser Zelltyp Halozelle genannt. Bei den Halozellen handelt es sich um

intraepitheliale Lymphozyten (REID und CLELAND 1957, ORSI 1983, FLICKINGER et al. 1997, COOPER 1998). Explizit als Halozellen bezeichnet werden die intraepithelialen Lymphozyten bei folgenden Spezies: Ratte (REID und CLELAND 1957, FLICKINGER et al. 1997), Maus (ABOU-HAÏLA und FAIN-MAUREL 1984), Hamster (FLICKINGER et al. 1978) und Rude (ORSI 1983). Das Vorkommen von intraepithelialen Lymphozyten wird aber auch beim Hengst (ARRIGHI et al. 1993), Bullen (GOYAL 1985), Ziegenbock(GOYAL und WILLIAMS 1991), Kaninchen (JONES et al. 1979) und Meerschwein (HOFFER und GREENBERG 1978) erwähnt.

### **2.1.3 Physiologie des Nebenhodens**

#### **2.1.3.1 Reifung der Spermien im Nebenhoden**

Die anatomische Unterteilung der einzelnen Nebenhodensegmente in Kopf, Körper und Schwanz stimmt nicht mit den zytologischen und biochemischen Abläufen überein (MARENCO 2008). Interaktionen zwischen den Zellen beeinflussen die Zusammensetzung des Nebenhodensekretes und somit die Umgebung der Spermien während der Reifung. Durch regional unterschiedliche Expressionsprofile der Proteine variiert das Mikromilieu im Nebenhodenlumen je nach Abschnitt (CORNWALL 2009).

Während der Maturation erhalten die Samenzellen die Fähigkeiten sich zu bewegen, die Zona pellucida zu erkennen, an diese zu binden und mit der Plasmamembran der Eizelle zu verschmelzen. Dabei erfährt die Oberflächenmembran eine Reihe von Veränderungen (DACHEUX et al. 2003; COOPER 2007). Es erfolgt eine Modifikation des Lipidgehaltes und des relativen Anteils an Cholesterol und Phospholipiden, die Anzahl der Disulfid-Bindungen steigt und es kommt zu einer negativen Ladung der Spermienoberflache. Proteine werden der Oberfläche hinzugefügt, eliminiert oder ändern ihre Lokalisation an der Zelloberfläche. Eine zentrale Rolle spielt die Glykosylierung der Proteine im Laufe der Spermienreifung (DACHEUX et al. 1989; FOUCHÉCOURT et al. 2000; SULLIVAN et al. 2007; CORNWALL 2009). Mit Lektinfarbungen konnten unterschiedliche Glykosylierungsmuster an der Spermienoberflache während des Transportes durch den Nebenhoden nachgewiesen werden (SRIVASTAV 2000).

Proteine haben eine Reihe von Aufgaben während der Spermienreifung: sie verändern die Spermienmembran, tragen zur Spermienintegritat bei, besitzen enzymatische Aktivität und sie schützen die Samenzellen vor oxidativem Stress und dem Immunsystem (DACHEUX et al. 2003). Bis heute konnten nur etwa 10 % aller im Nebenhodensekret vorkommenden Proteine nachgewiesen werden (DACHEUX et al. 2009). Beim Hengst wurden achtzehn Proteine isoliert, die 92,6 % der gesamten sekretorischen Aktivität des Nebenhodens einnehmen. Der gröſste Anteil besteht aus Lactoferrin und Clusterin, gefolgt von Prokathepsin, Cholesterol-Transfer-Protein, Gluthation Peroxidase, beta-N-Acetyl-

Hexosaminidase und Prostaglandin-D2-Synthase (FOUCHÉCOURT et al. 2000). DACHEUX und DACHEUX (2002) nennen CRISP-1 (Cystein rich secretory protein), CRES (Testatin) und CTP/HE1 (Cholesterol-Transfer-Protein) als weitere Proteine.

Epididymosome scheinen eine wichtige Rolle beim Transfer von Proteinen und Cholesterol vom Nebenhodenepithel zu den Spermien zu spielen. Dabei handelt es sich um vesikuläre Strukturen, die im Rahmen einer apokrinen Sekretion von den Epithelzellen im Ductus epididymidis abgegeben werden. Bislang wurden sie beim Hamster, beim Bullen, bei der Ratte und bei der Maus beschrieben (SULLIVAN et al. 2007). Epididymosome scheinen auch an der Elimination bestimmter Proteine aus dem Lumen des Nebenhodenganges beteiligt zu sein (CORNWALL 2009).

Neben Proteinen und Lipiden sind auch niedermolekulare Substanzen an der Spermienreifung beteiligt (COOPER 2007). Die Aufnahme sogenannter Osmolyte, während der Reifung im Nebenhoden schützt die Spermien vor osmotischen Schäden, während der Ejakulation und des Transports im weiblichen Genitaltrakt (COOPER und YEUNG 2003).

Die Motilität der Nebenhodenspermien nimmt im Zuge der Nebenhodenpassage zu. Im Nebenhodenkopf sind hauptsächlich immotile Spermien oder solche mit geringem, unregelmäßigem Flagellenschlag zu finden. Während des Verlaufs der Reifung im Nebenhodenkörper und –schwanz, entwickelt sich das Bewegungsmuster von zirkulären, kurvularen Bewegungsbahnlängen zu zunehmend linearen Bewegungsbahnlängen. Der Mechanismus der Entwicklung der Motilität ist noch nicht gänzlich bekannt, es wird vermutet, dass die Reifung des Axonemkomplexes, die verminderte glykolytische Aktivität und ein geringerer Energiemetabolismus eine Rolle spielen (YEUNG und COOPER 2002). Außerdem ist bekannt, dass die Motilität durch die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration, den Anstieg cAMP's und des intrazellulären pH-Wertes beeinflusst wird (ACOTT und CARR 1984, YEUNG und COOPER 2002). Beim Bullen wurde ein „forward motility protein“ im Seminalplasma identifiziert, das nach Inkubation mit unbeweglichen Nebenhodenkopfspermien deren Beweglichkeit aktivierte (ACOTT und HOSKINS 1978).

### **2.1.3.2 Transport der Spermien**

Da die Spermien die Fähigkeit zur Motilität erst im Zuge der Nebenhodenpassage entwickeln, erfolgt ihr Transport im Lumen durch die rhythmische Peristaltik der Muskelschicht des Nebenhodenganges (COOPER 1998, ROBAIRE et al. 2006). Neben der Kontraktion der Muskulatur, ist auch die stetige Sekretion und Absorption von Nebenhodenflüssigkeit für den Weitertransport der Spermien von Bedeutung. Ein Vakuum, welches durch die Ejakulation in den distalen Ganganteilen entsteht und der ansteigende Druck, infolge der zunehmend stärkeren Windung des Nebenhodenganges, befördern die Nebenhodenspermien ebenfalls in Richtung Nebenhodenschwanz (HESS 2002). Das

Nebenhodengangepithel trägt teilweise Stereozilien, die aber wahrscheinlich nicht zur Vorwärtsbewegung des Nebenhodensekrets beitragen (COOPER 1998, ROBAIRE et al. 2006). Als minimale Zeit, die die Spermien für die extragonadale Passage benötigen, werden für den Hengst drei bis sechs Tage angegeben (GEBAUER et al. 1974 b).

### **2.1.3.3 Speicherung, Erhaltung und Schutz der Spermien**

Der Nebenhoden stellt den größten extragonadalen Spermienreservoir dar. Im Nebenhodenschwanz werden die Spermien vor der Ejakulation in einem Ruhestadium aufbewahrt. Die Motilität der Spermien wird durch verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel die hohe Konzentration der Spermien, eine Verringerung der Natriumionenkonzentration und die Erhöhung der Viskosität der Nebenhodenflüssigkeit durch Sekretion von Mukoproteinen reduziert (COOPER 1998). Während der Nebenhodenpassage und der Speicherung muss die Vitalität der Spermien erhalten bleiben. Es werden Proteine sezerniert, die die Spermien vor Sauerstoffradikalen, Proteasen und Immunreaktionen schützen (JONES 1999). Um das intraluminale Milieu zu bewahren und so optimale Bedingungen für die Spermienreifung zu schaffen, existiert eine Blut-Nebenhodenschranke. Durch die Existenz von „gap“- und „tight-junctions“ zwischen den Epithelzellen des Nebenhodenganges wird der Austausch von Mikro- und Makromolekülen geregelt. Außerdem wird die Einwanderung von Immunzellen in das Nebenhodenlumen verhindert, da diese die Spermien als körperfremd erkennen und somit bekämpfen würden (ROBAIRE et al. 2006). Gleichzeitig werden Spermien, die zu lange gespeichert wurden oder geschädigt sind, beseitigt. JONES (2004) gibt als mögliche Mechanismen für die Entfernung geschädigter Spermien die Spermiphagie durch das Nebenhodenepithel an. Die Spermiphagie wird aber als selten erachtet und ist nicht hauptsächlich für die Aufnahme defekter Spermien verantwortlich, da die Kapazitäten des Nebenhodenepithels zu gering sind. Es wird angenommen, dass durch eine Veränderung des Mikromilieus im Nebenhoden Proteasen, Hydrolasen und DNAsen aktiviert werden, die die Spermien zersetzen. Es wurde eine DNase Aktivität im Lumen des Nebenhodenganges bei Bullen, Ebern, Ratten und Kaninchen nachgewiesen.

Im Nebenhoden werden sehr große Mengen an Spermien gespeichert. Um die Agglutination und Verklumpung der Spermien zu verhindern werden spezielle Proteine, die an der Plasmamembran anhaften, in das Nebenhodensekret freigesetzt. Im Nebenhodenschwanzsekret bei Bullen und Ziegenböcken wurde von DACHEUX und VOGELMAYR (1983) ein Protein identifiziert, das die Kopf-zu-Kopf-Agglutination verhindert. Bei Mäusen wurde ein Glykoprotein entdeckt, das die Flagellenagglutination unterbindet. Das so genannte SMA4-Protein wird im Nebenhodenkopf sezerniert (FEUCHTER et al. 1988).

## **2.2 Morphologie des Hengstspermiums**

Das Spermium ist das Endprodukt der Spermatogenese, die in den Tubuli seminiferi des Hodens erfolgt (MILLETTE 1998). Es besteht aus einem Kopf und dem Schwanz, die durch das Verbindungsstück aneinander gefügt sind (EDDY 2006). Im Spermienkopf sind der Kern, das Akrosom, Zytoskelettanteile und geringe Mengen Zytoplasma enthalten. Den Spermien Schwanz kann man in vier Regionen unterteilt: Verbindungsstück, Mittelstück, Hauptstück und Endstück. Das gesamte Spermium ist von einer Plasmamembran umgeben (MILLETTE 1998, EDDY 2006). Die Spermien des Hengstes unterscheiden sich von denen anderer Spezies durch ihren asymmetrischen Kopf, den abaxialen Ansatz des Spermien Schwanzes am Spermienkopf und durch das geringe Volumen des Akrosoms (BIELAŃSKI und KACZMARSKI 1979).

### **2.2.1 Der Spermienkopf**

Der Spermienkopf enthält den Zellkern, welcher von einer doppelten Membran umgeben ist und den haploiden Chromosomensatz beinhaltet. Das Kernchromatin ist hochkondensiert. Die Kernhülle weist nur im hinteren Teil Poren auf und ist ansonsten porenlos (MILLETTE 1998, EDDY 2006, AMANN und GRAHAM 2011).

Das Akrosom stellt eine spermien spezifische Zellorganelle dar, welche während der Spermatogenese aus dem Golgi-Apparat entsteht (MILLETTE 1998, EDDY 2006). Das Akrosom ist von einer inneren und äußeren Membran umgeben und liegt dem Zellkern in den vorderen zwei Dritteln kappenartig auf (DOTT 1975, MILLETTE 1998, EDDY 2006). Es enthält hydrolytische Enzyme, die für das Durchdringen der Zona pellucida der Eizelle und für die Verschmelzung des Spermiums mit der Eizelle notwendig sind (MILLETTE 1998, EDDY 2006).

### **2.2.2 Der Spermien Schwanz**

Der Spermien Schwanz ermöglicht die Beweglichkeit des Spermiums. Er ist über das Verbindungsstück, welches in das Kapitulum und den segmentierten Streifenkörper unterteilt wird, an den Spermienkopf gekoppelt. Das Kapitulum stellt die Gelenkverbindung zwischen Spermienkopf und Spermien Schwanz dar. Durch feine Filamente wird das Kapitulum des Spermien Schwanzes an die Basalplatte, einer Verdickung der äußeren Kernmembran gekoppelt (FAWCETT 1975, MILLETTE 1998, EDDY 2006). Die neun segmentierten Streifenkörper sind mit den vorderen Enden der neun Mantelfasern verbunden. Der Achsenfaden stellt den Motor des Spermien Schwanzes dar, er ist dem aller Flagellen in der Pflanzen- und Tierwelt in der Grundstruktur gleich (FAWCETT 1975). Zwei zentrale Mikrotubuli-Douplets werden von neun peripheren Mikrotubuli-Douplets umgeben und bilden ein 9+2 Muster (FAWCETT 1975, MILLETTE 1998, EDDY 2006). Der Achsenfaden liegt in der Mitte des Spermien Schwanzes und reicht über dessen gesamte Länge. Die neun

Mantelfasern umgeben den Achsenfaden und es entsteht ein 9+9+2 Muster im Querschnitt (FAWCETT 1975). Im Mittelstück werden Achsenfaden und Mantelfasern von einer Mitochondrienhülle umgeben. In der Mitochondrienhülle sind die Mitochondrien helikal um Achsenfaden und Mantelfasern angeordnet und liefern die Energie für die Spermienbeweglichkeit (FAWCETT 1975, MILLETTE 1998, EDDY 2006). Durch die Mitochondrienhülle ist der Spermischwanz im Bereich des Mittelstückes verdickt (DOTT 1975). Im Hauptstück werden der Achsenfaden und die Mantelfasern von einer fibrillären Hülle umschlossen. Im Endstück wird der Achsenfaden nur von einer Plasmamembran umhüllt.

### **2.2.3 Die Plasmamembran**

Das gesamte Spermium ist von einer Plasmamembran umgeben, welche aufgrund der unterschiedlichen Verteilung von Membranproteinen und -lipiden in Domänen eingeteilt werden kann (SINOWATZ 2001, MILLETTE 1998). Bei der Plasmamembran handelt es sich um eine Lipiddoppelschicht (JONES 1998), die nach dem Flüssig-Mosaik-Modell von SINGER und NICOLSON (1972) aufgebaut ist. Als Hauptklassen der Membrankomponenten sind Lipide, Proteine und Oligosaccharide zu nennen (SINGER und NICOLSON 1972).

## **2.3 Spermatogenese**

Die Spermatogenese ist definiert als die Gesamtheit aller Prozesse, die zur Bildung von Samenzellen führen. Eingeteilt wird die Spermatogenese in drei Phasen: Mitose, Meiose und Spermio-genese (RODRIGUEZ-MARTINEZ 1992).

Ihren Ursprung nimmt die Samenzelle in der Primordialkeimzelle (Urgeschlechtszelle), welche während der Entwicklung in die Keimdrüsenanlage einwandert. Bis zur Pubertät entstehen über verschiedene Vermehrungsphasen die Spermatogonien. Beim Eintritt in die Geschlechtsreife beginnt, die in den Tubuli seminiferi der Hoden zyklisch ablaufende, Produktion der Samenzellen. Die Spermatogonien differenzieren sich zunächst zu Spermatozyten erster und zweiter Ordnung und schlussendlich über die Spermatischen zu den Spermien.

Am Ende der Spermatogenese werden die Spermien von den Sertolizellen in das Lumen der Tubuli seminiferi entlassen (Spermiation), von wo aus sie in das ableitende Gangsystem eintreten (RÜSSE und SINOWATZ 1998). Beim Hengst dauert die Spermatogenese 57 Tage (WABERSKI 2007).

### **2.3.1 Spermatogonien**

Lokalisiert sind die Spermatogonien an der Basalmembran der Tubuli seminiferi. Die Spermatogonien stellen Stammzellen dar. Durch kontinuierliche Mitose der Spermatogonien wird der Stammzellenpool über das gesamte adulte Leben aufrechterhalten (JOHNSON 1991). Zusätzlich zu der Erneuerung der Stammzellenpopulation entstehen, durch die

Zellteilungen, proliferierende und differenzierende Spermatogonien, die sich zu den Spermatozyten erster Ordnung entwickeln (JOHNSON 1991). Morphologisch kann man anhand der unterschiedlichen Größe des Zellkerns, der Verteilung von Eu- und Heterochromatin und der Anzahl sowie Ausprägung der Nukleoli drei Haupttypen von Spermatogonien unterscheiden. Außerdem dient die Lokalisation im Bezug zur Basalmembran der Tubuli seminiferi als Kriterium für die Differenzierung. Man teilt die Spermatogonien in Typ A, Typ B und intermediäre Spermatogonien ein (RÜSSE und SINOWATZ 1998).

Beim Hengst werden die Spermatogonien nochmals in 5 verschiedene Subtypen abgestuft. Die Spermatogonien des A Typs mit den Subtypen A1 bis A3 gelten als die Stammzellen (JOHNSON 1991), sie besitzen eine große Kontaktfläche zur Basalmembran und sind durch zahlreiche, große Nukleoli im Zellkern gekennzeichnet (WROBEL und DELLMANN 1993). Bei den intermediären und Typ B Spermatogonien handelt es sich um eine höhere Entwicklungsstufe (JOHNSON 1991, RÜSSE und SINOWATZ 1998). JOHNSON (1991) bezeichnet die intermediären Spermatogonien auch als Typ B1 Spermatogonien und beschreibt zusätzlich die B2-Spermatogonien. Der B1-Subtyp besitzt einen großen, ovalen Zellkern mit einem großen, teils fragmentierten Nukleolus. Der B2-Subtyp ist durch einen kleinen, abgeflachten Zellkern mit einzelnen Chromatinschuppen charakterisiert. Aus den mitotischen Teilungen der B-Spermatogonien entstehen die Spermatozyten erster Ordnung.

### **2.3.2 Spermatozyten erster Ordnung**

Bevor die Spermatozyten erster Ordnung in die erste Reifeteilung eintreten, besitzen sie noch einen diploiden Chromosomensatz. Während der Wachstumsphase vor der ersten meiotischen Teilung, verdoppeln die Spermatozyten erster Ordnung ihre DNA, gleichzeitig vergrößern sie sich. Sie stellen zu diesem Zeitpunkt die größten Keimzellen in den Tubuli seminiferi dar (RÜSSE und SINOWATZ 1998). Die Spermatozyten erster Ordnung verlieren zunehmend den Kontakt zur Basallamina. Beim Eintritt in die erste meiotische Teilung durchlaufen die Spermatozyten erster Ordnung die stark verlängerte Prophase 1, die nochmals in die einzelnen Phasen: Leptotän, Zygotän, Pachytän, Diplotän und Diakenese untergliedert ist. An die Prophase schließen sich alle weiteren, kürzeren Phasen der ersten Reifeteilung (Meta-, Ana- und Telophase) an. Während der ersten meiotischen Teilung kommt es zur Trennung der homologen Chromosomenpaare und es entstehen zwei Spermatozyten zweiter Ordnung mit haploidem Chromosomensatz (WROBEL und DELLMANN 1993).

### **2.3.3 Spermatozyten zweiter Ordnung**

Die Spermatozyten zweiter Ordnung sind sehr kurzlebige Zellen, sie durchlaufen, nach einer kurzen Interphase, die zweite Reifeteilung und deren Stadien (Pro-, Meta-, Ana- und

Telophase), bei welcher die zwei Chromatiden der Chromosomen auf jeweils eine Spermatide aufgeteilt werden (WROBEL und DELLMANN 1993). Bei den Spermatozyten zweiter Ordnung handelt es sich um deutlich kleinere Zellen als bei den Spermatozyten erster Ordnung, außerdem sind sie nahe am Lumen der Tubuli contorti lokalisiert (RÜSSE und SINOWATZ 1998).

#### **2.3.4 Spermatiden, Spermiogenese**

Am Ende der Meiose entstehen die Spermatiden aus den Spermatozyten zweiter Ordnung. Es handelt sich bei den Spermatiden um kleine, zunächst rundkernige Zellen, die in Lumennähe der Tubuli seminiferi liegen (RÜSSE und SINOWATZ 1998). Der Prozess, der diese Spermatiden in hochdifferenzierte Spermien verwandelt, wird Spermiogenese genannt. Die bedeutendsten Veränderungen, die die Spermiogenese umfassen, sind die Bildung des Akrosoms aus dem Golgi-Apparat, die Elongation des Kerns, die Chromatinkondensation und die Ausbildung der Geißel (WROBEL und DELLMANN 1993, RÜSSE und SINOWATZ 1998, OKO und CLERMONT 1999). Auf Grundlage dieser Umbauvorgänge, kann man die Spermiogenese in die Golgi-, Kappen-, Akrosomen- und Reifungsphase einteilen (JOHNSON 1991, WROBEL und DELLMANN 1993, RÜSSE und SINOWATZ 1998).

Die Spermatiden, die sich in der Golgi-Phase befinden, besitzen einen prominenten Golgi-Apparat (JOHNSON 1991). Bereits kurze Zeit nach der Entstehung der Spermatiden bilden sich an der Oberfläche des Golgi-Apparates kleine, glykoproteinreiche Vesikel aus, die miteinander verschmelzen und eine akrosomale Vakuole bilden. Durch kontinuierliche Abschnürung kleiner Vesikel, aus dem Golgi-Apparat, vergrößert sich dieses frühe Akrosom stetig. Dieser Prozess endet in der Akrosomenphase, wenn der Golgi-Apparat sich mit dem Zytoplasma nach kaudal verlagert (OKO und CLERMONT 1999). Das frühe Akrosom legt sich im Bereich des späteren Vorderendes an die Kernmembran an. In dieser frühen Phase der Spermiogenese beginnt die Ausbildung des Spermischwanzes aus dem Zentriolenpaar (OKO und CLERMONT 1999). Das proximale Zentriol hält den Kontakt zu der Basalplatte. Aus dem distalen Zentriol entsteht das Axonema. In der Kappenphase flacht sich die akrosomale Vakuole ab und die Granula verdichten sich, es bildet sich das akrosomale Granulum (RÜSSE und SINOWATZ 1998). Gleichzeitig legt sich das akrosomale Granulum um eine größere Fläche der Kernmembran und bildet so die Kopfkappe. Außerdem schreitet die Formierung der Geißel weiter fort (JOHNSON 1991). Während der Akrosomenphase richten sich die Spermatiden mit dem Kopf zur Basalmembran der Tubuli seminiferi aus. Es kommt zur Kernchromatinkondensation und der Zellkern streckt sich zunehmend (WROBEL und DELLMANN 1993). Das frühe Akrosom schmiegt sich weiterhin an den Kern an und bedeckt diesen zu zwei Dritteln. Zeitgleich zu der Verlängerung des Zellkerns, verlagert sich der größte Anteil des Zytoplasmas, nach

kaudal und die Mitochondrien formen um das Axonema die Mitochondrienhülle (RÜSSE und SINOWATZ 1998)

Abschließend erfolgt die Reifungsphase, in welcher die Spermatiden den speziesspezifischen Spermienkopf und -schwanz ausbilden. Die Spermatiden der Reifungsphase weisen nur 20 bis 30 % des Volumens der Spermatiden in der Golgiphasse auf. Der größte Teil des Zytoplasmas wird mit vielen darin enthaltenen Zellorganellen als Residualkörper von den Spermien abgeschieden. Ein kleiner Anteil des Spermatidenzytoplasmas bleibt als Zytoplasmatröpfchen am Schwanz der Spermatiden bestehen. Dieses wird während der Nebenhodenpassage abgeworfen. Der Residualkörper wird von den Sertolizellen phagozytiert, autolysiert oder in das Tubuluslumen entlassen (WROBEL und DELLMANN 1993). Nach Abschluss der Spermio-genese werden die Spermien von den Sertolizellen in die Tubuli seminiferi freigesetzt. Den Vorgang nennt man Spermiation (RÜSSE und SINOWATZ 1998).

#### **2.4 Fertilität von frischen und tiefgefrorenen Nebenhodenspermien**

Im Jahr 1957 führten BARKER und GANDIER die erste erfolgreiche künstliche Besamung mit Tiefgefriersamen beim Pferd durch. Die Spermien waren vorher aus dem Nebenhodenschwanz eines zweijährigen Hengstes nach Kastration gewonnen worden. Somit wurde 1957 das erste Mal die Fertilität epididymaler Hengst-spermien bewiesen.

MORRIS et al. (2002) führten eine Studie durch, bei welcher die in vivo Fertilität von Nebenhodenschwanzspermien beim Hengst getestet wurde. Es wurden Nebenhodenschwanzspermien von dreizehn Hengsten im Alter zwischen zwei und drei Jahren nach der Kastration gewonnen. Die epididymalen Spermien wurden unterschiedlich aufbereitet. In sieben verschiedenen Inseminationsregimen wurden 83 Stuten hysteroskopisch auf die Papilla uterinae besamt. Die Besamung mit 200 Millionen frischen Nebenhodenschwanzspermien war die erfolgreichste und ergab eine Konzeptionsrate von 45 % (9/20). Das Tiefgefrieren und Auftauen der Nebenhodenspermien führte zu einer Reduktion der Konzeptionsrate auf 18 % (9/51). Die Zugabe von TALP nach dem Auftauen hatte einen positiven Effekt auf die Trächtigkeitsrate. Diese stieg von 0 % auf 29 % (7/24). MELO et al. (2008) und PAPA et al. (2008) berichten von Trächtigkeitsraten von 69,23 % (9/13) und 66,6 % (12/18) bei der Besamung von Stuten mit tiefgefrorenen und aufgetauten Nebenhodenschwanzspermien. Die verwendeten Nebenhodenspermien stammten von dreijährigen Hengsten und wurden mit unterschiedlichen Tiefgefrier- verdünnern eingefroren.

HEISE et al. (2010) vergleichen in einer Untersuchung frische und tiefgefrorene, ejakulierte Spermien mit frischen und tiefgefrorenen Nebenhodenschwanzspermien. Zusätzlich wurden die Nebenhodenschwanzspermien mit Seminalplasma in Kontakt gebracht. Die Kontrollgruppen wurden nicht mit Seminalplasma verdünnt. Die Spermien entstammten drei

verschiedenen Hengsten, mit erwiesener guter Fertilität, zwischen vier und fünf Jahren. Es wurden 21 Stuten besamt. Folgende Trächtigkeitsraten wurden erzielt: Frische, ejakulierte Spermien 55,6 % (10/18); frische Nebenhodenschwanzspermien mit Seminalplasma 75 % (9/12); frische Nebenhodenschwanzspermien ohne Seminalplasma 22,2 % (2/9); tiefgefrorene, ejakulierte Spermien 38,9 % (7/18); tiefgefrorene Nebenhodenschwanzspermien mit Seminalplasma 27,8 % (5/18); tiefgefrorene Nebenhodenschwanzspermien ohne Seminalplasma 6,7 % (1/15). Es ist anzunehmen, dass die Zugabe von Seminalplasma einen positiven Effekt auf die Trächtigkeitsrate hat.

MONTEIRO et al. (2011) verglichen die Fertilität ejakulierter und epididymaler Spermien nach dem Tiefgefrier- und Auftauvorgang miteinander. Für die Studie wurden acht Hengste zwischen vier und sechs Jahren zunächst wiederholt abgesamt, kastriert und die Nebenhodenspermien aus dem Nebenhodenschwanz gespült. Einer der beiden Nebenhoden wurde bei +5 °C gelagert, nach einer Dauer von 24 Stunden wurden die Nebenhodenspermien aus dem Nebenhoden gewonnen. Die ejakulierten Spermien und Nebenhodenspermien wurden auf die gleiche Weise tiefgefroren und aufgetaut. Es wurden dreizehn Stuten mit 800 Millionen lebenden Spermien intrauterin besamt. Es ergaben sich folgende Konzeptionsraten: 61,5 % (8/13) bei den ejakulierten Spermien, 92,3 % (12/13) bei den Nebenhodenspermien die sofort verarbeitet wurden und 61,5 % (8/13) bei den Nebenhodenspermien, die 24 Stunden im Nebenhoden gelagert wurden.

Auch bei anderen Spezies wurde die Fertilität von Nebenhodenspermien, die zumeist aus dem Nebenhodenschwanz gewonnen wurden, getestet. Beim Eber ergaben sich Trächtigkeitsraten bei der künstlichen Besamung mit frischen Nebenhodenschwanzspermien von 79 bis 83 % (HOLTZ und SMIDT 1976). Die Besamung mit kryokonservierten Nebenhodenschwanzspermien des Rüden ergab Konzeptionsraten von 6,3 % bei der intrauterinen Besamung und 16,7 % bei der intratuberalen Besamung (HEWITT et al. 2001). Bei in vitro Fertilisationstests mit tiefgefrorenen und wieder aufgetauten Nebenhodenschwanzspermien beim Bullen, Schafbock und Kater ergaben sich Blastocystenraten von 6,28 bis 13,14 % (MARTINS et al. 2009), 6 % (BLASH et al. 2000), 47,8 % (BOGLIOLO et al. 2001). In einer Untersuchung von PAMUNGKAS et al. (2012) zum Vergleich des Fertilisationspotentials von kryokonservierten Nebenhodenschwanzspermien zu ejakulierten Spermien beim Schafbock ergaben sich ähnliche Fertilisationsraten bei der IVF von 70 und 80 %.

## **2.5 Gewinnung von Nebenhodenspermien**

Hoden und Nebenhoden des Hengstes werden bei der Kastration in Allgemeinanästhesie entnommen. Der Ductus deferens und größere Blutgefäße werden ligiert, um Spermienverlust und -kontamination zu verhindern. Eine Klemme wird auf den Übergang von

Nebenhodenschwanz zu Nebenhodenkörper gesetzt. Der Nebenhoden wird vom Hoden durch Durchtrennung des Bindegewebes abgesetzt (EICHELBERGER et al. 2007).

Durch retrogrades Spülen des Nebenhodenschwanzes, vom Ductus deferens ausgehend, können die equinen Nebenhodenschwanzspermien gewonnen werden (BRUEMMER et al. 2002, MORRIS et al. 2002, CARY et al. 2004, NEILD et al. 2006, PAPA et al. 2008, PASQUINI et al. 2008, DAS et al. 2010). Für die Kanalisierung des Ductus deferens und das Einbringen der Spülflüssigkeit wurde entweder eine Spritze (PAPA et al. 2008), ein 3,5-F Tom-Cat-Katheter (EICHELBERGER et al. 2007) oder ein 18 G Tubing Adapter (CARY et al. 2004) verwendet. Die Spülung erfolgte mit 10 ml TALP (BRUEMMER et al. 2002), 20 ml Kenney-Verdünner (NEILD et al. 2006), 20 ml Magermilchverdünner (PAPA et al. 2008), 40 ml Magermilchverdünner (PASQUINI et al. 2008) oder mit PBS (DAS et al. 2010).

Weitere Möglichkeiten die Nebenhodenspermien beim Hengst zu gewinnen werden beschrieben. Nachdem der Nebenhodengang mehrfach eingeschnitten wurde, konnte das Nebenhodensekret, durch Druck auf das Organ aus dem angeschnittenen Gang herausgequetscht werden. Das gewonnene Sekret wurde aufgefangen und mit Milchverdünner verdünnt (BARKER und GANDIER 1957). Der Nebenhoden wurde zerkleinert und anschließend mit 3 ml Sperm TL-Medium gespült (JAMES et al. 2002). Bei der Flotationsmethode wird der gesamte Nebenhoden oder nur der Nebenhodenschwanz mehrfach eingeschnitten (EICHELBERGER et al. 2007, CARY et al. 2004). Eine weitere Möglichkeit besteht darin den Nebenhoden in 3 mm große Stücke zu schneiden (EICHELBERGER et al. 2007). Ein Samenverdünner wurde hinzugefügt und der Nebenhoden zehn Minuten (CARY et al. 2004) oder zehn bis fünfzehn Minuten (EICHELBERGER et al. 2007) bei Raumtemperatur inkubiert.

EICHELBERGER et al. (2007) und CARY et al. (2004) haben die retrograde Spülung und die Flotationsmethode zur Gewinnung von Nebenhodenspermien beim Hengst miteinander verglichen. Beide Methoden lieferten ähnliche Ergebnisse in den Spermienkonzentrationen. Bei der retrograden Spülung wurden 4485 Millionen Spermien pro Milliliter und bei der Flotationsmethode 4886 Millionen Spermien pro Milliliter gewonnen. Die Gesamtbeweglichkeit, ermittelt mit CASA, war bei der Flotationsmethode höher als bei der retrograden Spülung (74 und 61 %). Die Vorwärtsbeweglichkeit unterschied sich bei beiden Methoden, mit 31 % Vorwärtsbeweglichkeit bei der retrograden Spülung und 35 % Vorwärtsbeweglichkeit bei der Flotationsmethode, aber nicht signifikant (CARY et al. 2004). Die retrograde Spülung ist zwar aufwendiger, es wird aber die Kontamination mit Fremdzellen deutlich verringert (EICHELBERGER et al. 2007).

Auch bei anderen Spezies werden verschiedene Methoden zur Nebenhodenspermien-gewinnung beschrieben. In einer Studie von CZARNETZKY und HENLE (1938) wurden

Spermien bei Ebern und Bullen mit einer Druckpumpe aus dem Nebenhodenschwanz gewonnen. LASLY und BOGART (1944) wendeten zwei verschiedene Methoden zur Nebenhodenspermengewinnung beim Eber an. Bei der ersten Methode wurde eine Spritze mit aufgesetzter Kanüle in den Ductus deferens eingeführt und der Nebenhodenschwanz so lange mit PBS gespült, bis der größte Teil der Spermien ausgetreten war. Alternativ wurde PBS, bis zur maximalen Ausdehnung, in den Nebenhodenschwanz injiziert. Die Gänge wurden eingeschnitten und die Spülflüssigkeit aufgefangen. DACHEUX (1980) erfand eine neue Perfusionstechnik, um das Nebenhodensekret aus dem Nebenhodenschwanz zu spülen und wendete sie beim Eber an. Der Nebenhodengang wurde an beiden Enden des Nebenhodenschwanzes mit einem Katheter kanalisiert. Der Nebenhodenschwanz wurde in ein Becherglas mit Dulbecco's Medium eingehängt. Mit einer Pumpe konnte das Kulturmedium in unterschiedlichen Perfusionsraten durch den Nebenhodenschwanz gepumpt werden, um die Nebenhodenspermien herauszuspülen.

Die bereits oben für den Hengst genannte Methode des retrograden Spülens des Nebenhodenschwanzes wurde auch bei Schafböcken (GARDE et al. 1994), Bullen (HEROLD et al. 2004) und Sikahirschen (COMIZZOLI et al. 2001) praktiziert, wobei PBS (GARDE et al. 1994) oder Samenverdünner (COMIZZOLI et al. 2001, HEROLD et al. 2004) als Spülmedien verwendet wurden.

Beim Rüden wurde die Flotationsmethode angewendet. Der Nebenhoden wurde mehrfach eingeschnitten (YU und LEIBO 2002), zerkleinert (HORI et al. 2004) oder in Stücke geschnitten (HEWITT et al. 2001) und anschließend mit verschiedenen Medien gespült. Die weitere Verarbeitung und Untersuchung erfolgte nach Inkubationszeiten von zehn Minuten bei +37 °C (YU und LEIBO 2002), 30 Minuten bei Raumtemperatur (HORI et al. 2004) und fünf Minuten bei +39 °C (HEWITT et al. 2001). Bei der Maus und beim Sikahirsch ist die Flotationsmethode beschrieben worden (SONGSASEN et al. 1998, HISHINUMA et al. 2003). Der Nebenhodengang wurde durch mehrfaches Einschneiden eröffnet. Nach einer Inkubation, bei +37 °C für zehn bis fünfzehn Minuten, erfolgten die weiteren Untersuchungen.

## **2.6 Andrologische Untersuchung**

### **2.6.1 Morphologische Untersuchung der äußeren Genitalorgane**

Der Penis und das Präputium werden adspektorisch untersucht. Durch die sexuelle Stimulation des Hengstes oder beim Harnabsatz wird der Penis ausgeschachtet und kann betrachtet werden. Der Hodensack und seine Inhalte werden durch manuelle Palpation untersucht. Die Skrotalhaut sollte dünn, glatt, elastisch und frei verschiebbar über Hoden und Nebenhoden sein (CRABTREE 2010 a). Mittels Palpation werden Größe, Form und Gewebetextur beider Hoden untersucht (VARNER 2003), dabei sollten beide Hoden

miteinander verglichen werden, um Pathologien eines Hodens auszuschließen (CRABTREE 2010 a). Beide Hoden sind von ovaler Form mit glatter Oberfläche (VARNER 2003). Die Konsistenz der Hoden wird als prallelastisch beschrieben (VARNER 2003, CRABTREE 2010 a). BALL (2008) vergleicht die Konsistenz des Hodens mit der des Handballens. Um die Lage des Hodens im Hodensack festzustellen, wird der Nebenhodenkopf am kranialen und der prominenten Nebenhodenschwanz am kaudalen Hodenpol palpirt. So kann eine Hodentorsion um 180° ausgeschlossen werden (VARNER 2003, CRABTREE 2010 a).

Die Hoden sollten in der Größe ungefähr einander entsprechen und die Konsistenz beider Hoden sollte die Gleiche sein (BALL 2008). Die Länge, Höhe und Breite des Hodens kann mit einem Messzirkel (GEBAUER et al. 1974 a) gemessen oder es kann eine Messung bei der sonografischen Untersuchung vorgenommen werden (BALL 2008, BLANCHARD et al. 2008). Bei der Messzirkelmessung der totalen skrotalen Weite werden beide Hoden mit einer Hand in den Hodensack verlagert, der Messzirkel wird an der rechten und linken Seite des Skrotums angesetzt. Die Messung erfolgt an der Stelle der Hodenkurvatur, welche die größte Distanz zwischen der rechten und linken Seite bildet (SQUIRES und PICKETT 2011).

Die totale skrotale Weite kann als Maß für die Hodenmasse angesehen werden, die eng mit der täglichen Menge an zu ejakulierenden Spermien (Daily Sperm Output, DSO) verbunden ist (BALL 2008, BLANCHARD et al. 2008). Die Hodenmaße können für die Kalkulation der täglichen Spermienproduktion (Daily Sperm Production, DSP) und der DSO herangezogen werden. Die DSP bezeichnet die Anzahl der Spermien, die von den Hoden pro Tag produziert werden. Der DSO stellt die Anzahl an Spermien dar, die pro Tag gewonnen werden können, wenn die extragonadalen Spermienreserven durch mehrfaches Absamen stabilisiert wurden (SQUIRES und PICKETT 2011). Das Hodengewicht korreliert signifikant mit dem DSO und der DSP. In weiteren Studien von DINGER und NOILES (1986) sowie THOMPSON et al. (1979) wurden die Hengste nach sexueller Enthaltbarkeit mehrmals wöchentlich nach unterschiedlichen Regimen abgesamt, um nach der Entleerung der Spermienreserven im Nebenhoden den DSO zu ermitteln.

Der DSO lässt sich aber auch mittels folgender Formel auf Grundlage des Hodenvolumens berechnen:

**DSO (Milliarden) = 0,024 x (Summe des Hodenvolumens des linken und rechten Hodens) - 1,26.**

Der physiologische DSO wird von HURTGEN (1992) mit 4 bis 6 Milliarden Spermien angegeben.

Das Hodenvolumen kann ebenfalls ermittelt werden. Entweder *in vitro* nach der Kastration durch die Wasserverdrängung in einem geeichten Gefäß oder durch die Berechnung auf Grundlage der Hodenvermessung mit folgender Formel:

**Volumen** =  $\frac{4}{3} \pi \times \text{Höhe}/2 \times \text{Breite}/2 \times \text{Länge}/2$  (LOVE et al. 1991).

### **2.6.2 Makroskopische Samenuntersuchung**

Das Volumen und die Farbe der Samenprobe werden untersucht (CRABTREE 2010 b, BAUMBER-SKAIFE 2011). Das Aussehen der Samenprobe wird maßgeblich von der Spermienkonzentration, der Zusammensetzung des Seminalplasmas sowie von physiologischen und pathologischen Beimengungen beeinflusst. Als physiologische Beimengungen sind Epithelzellen zu nennen. Pathologische Beimengungen stellen Blut, Urin oder Eiter dar. Die physiologische Farbe der Samenprobe ist milchig weiß, eventuell gräulich. Die Konsistenz hängt von der Spermienkonzentration ab und kann milchig, cremig, molkeähnlich oder wässrig sein (SIEME 2009).

Der pH-Wert sollte nach CRABTREE (2010 b) zwischen 7,2 und 7,7 liegen. Der pH-Wert wird durch die Saison, die Häufigkeit der Ejakulationen und die Spermienkonzentration beeinflusst (BAUMBER-SKAIFE 2011).

### **2.6.3 Mikroskopische Samenuntersuchung**

#### **2.6.3.1 Subjektive Motilitätsbestimmung**

Die Bestimmung der Spermienbeweglichkeit in unverdünntem, nativem Samen und in verdünntem Samen wird als fundamentaler Test zur Beurteilung der Befruchtungskapazität der Spermien angesehen. Eine Motilitätsanalyse in nicht-aufbereitetem Samen gibt Aufschluss darüber, wie die Spermien sich in den natürlichen Flüssigkeiten bewegen. Durch hohe Spermienkonzentrationen oder -agglutination kann die Untersuchung beeinträchtigt werden. Verdünner verändern die Motilität zumeist geringgradig, besonders die Geschwindigkeit der Spermien wird modifiziert. Daher sollten Samen und Verdünner vor der Analyse zehn Minuten inkubiert werden (VARNER 2008).

Die Spermienmotilität wird im Phasenkontrastmikroskop in der zweihundert- oder vierhundertfachen Vergrößerung geschätzt (JASKO 1992, MALMGREN 1997, VARNER und LOVE 2003, BAUMBER-SKAIFE 2011). Die Untersuchung sollte bei +37 °C erfolgen. Es sollten mehrere Gesichtsfelder untersucht werden, vornehmlich zentral, da an den Rändern des Objektträgers die Motilität durch Austrocknung und Flüssigkeitsströme beeinträchtigt wird (BAUMBER-SKAIFE 2011). Die Prozentsätze aller beweglichen Spermien und die der vorwärtsbeweglichen Spermien werden nach JASKO (1992) geschätzt. VARNER (2008), CRABTREE (2010 b), BAUMBER-SKAIFE (2011) und HODDER und LIU (2011) schätzen zusätzlich die Geschwindigkeit der sich bewegenden Spermien auf einer Skala von 0 bis 4.

WABERSKI und PETRUNKINA (2007) erfassen neben der Gesamtbeweglichkeit auch vorwärts-, orts- und unbewegliche Spermien. Vorwärtsbewegliche Spermien zeichnen sich durch eine vorwärtsgerichtete Bewegung im Gesichtsfeld aus. Ortsbewegliche Spermien sind Spermien, die einen aktiven Geißelschlag aufweisen und sich im Kreis bewegen, wenn der Kreis im Durchmesser maximal der Länge des Spermienkopfes entspricht. Aufgrund des abaxialen Ansatzes des Mittelstücks am Spermienkopf, ein Charakteristikum des Hengstspermiums (BIELAŃSKI und KACZMARSKI 1979), kann es zu einer Erhöhung der Ortsbeweglichkeit kommen (MALMGREN 1997). Der Prozentsatz an ortsbeweglichen Spermien steigt ebenfalls infolge von Kälte- oder Hitzeschock (CRABTREE 2010 b). Unbewegliche Spermien sind Spermien ohne Geißelschlag.

### **2.6.3.2 Computer-assistierte Spermienanalyse**

Eine CASA-Station besteht aus: Mikroskop, Videokamera, Videobilddigitalisierungskarte, Computer, Software (BAUMBER-SKAIFE 2011) und einer Wärmeplatte (BOYERS et al. 1989). Die Computersoftware wird genutzt, um alle Spermien auf den Videobildern zu identifizieren, in ihrer Bewegung zu verfolgen und die Daten zu kalkulieren. Das mikroskopische Bild wird von der Kamera in ein digitales Bild umgewandelt. Damit die Software die Spermien erkennt, muss ein Dunkelfeldobjektiv oder Negativ-Kontrastobjektiv verwendet werden, so dass sich die Spermienköpfe weiß auf dunklem Hintergrund darstellen. Die Software erkennt die Spermienköpfe als solche anhand der Pixelanzahl, die in einer bestimmten Spannbreite für Spermienköpfe der jeweiligen Spezies charakteristisch ist. Anhand der Pixelanzahl kann zwischen Spermien und Debris unterschieden werden (MORTIMER 2000). Die Bewegung der Spermien wird anhand der unterschiedlichen Koordinaten der Spermienköpfe in den aufeinanderfolgenden Bildern kalkuliert. Die Bewegungsbahnlagen der Spermien werden ermittelt, indem die maximale und minimale Distanz, die das Spermium in einer Aufnahmeperiode räumlich überwunden haben kann, definiert wird. Als Ausgangspunkt dieser Distanz dient das Zentrum des Spermienkopfes, das Centroid genannt wird (BOYERS et al. 1989). Innerhalb dieser Distanz wird die Umgebung des Spermiums im nächsten Bild kreisförmig nach demselben Centroid abgesucht. Die Koordinaten der Spermien innerhalb der Bildserie werden in ein Koordinatensystem eingetragen. Durch die Verbindung der Koordinatenpunkte miteinander entstehen die Bewegungsbahnlagen der Spermien. Mit demselben Verfahren werden alle Spermien auf den Bildern und alle Videobilder der Serie analysiert (BOYERS et al. 1989, MORTIMER 2000).

Die Zuverlässigkeit der Untersuchung mit dem CASA-System ist von verschiedenen Faktoren abhängig, die die Geräteeinstellung und die Probe betreffen. Folgende Faktoren sind zu nennen: die „frame rate“, die Einstellung und Präzision der verwendeten Geräte, die Justierung von Licht und Optik des Mikroskops, die Temperatur von der Probe und den

Gerätschaften, der Zählkammertyp und dessen Tiefe, die Anzahl analysierter Spermien, die Spermienkonzentration, das Vorhandensein von Debris in der Probe, der Verdüner, der physiologische Status der Spermien, die Variation zwischen Aliquots, die Laborbedingungen und das technischen Personal (DAVIS und KATZ 1993).

Die Anzahl der Einzelbilder („frame rate“) pro Analyse ist bedeutend, weil die Bewegung der Spermien mit steigender „frame rate“ genauer rekonstruiert werden kann und viele Geschwindigkeitsparameter „frame rate“-abhängig sind (VERSTEGEN 2002). BAUMBER-SKAIFE (2011) und VERSTEGEN (2002) geben 60 Bildfelder pro Sekunde als herkömmliche „frame rate“ an. MORTIMER (2000) und SIEME (2009) empfehlen eine Spanne von 30 bis 60 Bildfeldern. Die empfohlene Anzahl Bildfelder pro Aufnahme variiert je nach Autor von 15 bis 30 (MORTIMER 2000), 20 bis 30 (SIEME 2009) bis zu 40 Bildern pro Aufnahme (BAUMBER-SKAIFE 2011). Pro Analyse sollten 300 bis 500 Spermien untersucht werden (BAUMBER-SKAIFE 2011, VERSTEGEN 2002). Hinsichtlich der Konzentration der Probe gibt es unterschiedliche Empfehlungen. DAVIS und KATZ (1993) empfehlen eine Spermienkonzentration von mindestens 20 Millionen pro Milliliter und maximal 50 Millionen Spermien pro Milliliter. MORTIMER (2000) rät zu einer Konzentration von unter 40 Millionen Spermien pro Milliliter und BAUMBER-SKAIFE (2011) zu einer Konzentration von ca. 25 Millionen Spermien pro Milliliter.

Bei der Analyse werden die Anteile progressiv beweglicher, orts- und unbeweglicher Spermien in Prozent bestimmt (PETRUNKINA et al. 2008). Als bewegliche Spermien werden beim Hengst nach ORTEGA-FERRUSOLA et al. (2009) und beim Rüden nach NÚÑEZ-MARTÍNEZ et al. (2006) Spermien mit einer Geschwindigkeit von größer als 15  $\mu\text{m}$  pro Sekunde angesehen. Als unbeweglich gelten solche, die eine Geschwindigkeit von kleiner als 10  $\mu\text{m}$  pro Sekunde aufweisen.

Folgende kinematischen Parameter werden untersucht: kurvilineare Geschwindigkeit (VCL), lineare Geschwindigkeit (VSL), mittlere Geschwindigkeit (VAP), Amplitude der lateralen Kopfauslenkung (ALH), Schlagfrequenz der Spermienflagelle (BCF), Linearität (LIN), Geradlinigkeit (STR), Wobble oder Schwankung (WOB). Die VCL bezieht sich auf die gesamte Distanz, die der Spermienkopf in der Analysezeit zurückgelegt hat und ist immer der höchste der drei Geschwindigkeitswerte. Bei der VSL handelt es sich um die geradlinige Verbindung zwischen dem ersten und letztem gemessenen Punkt der Bewegungsbahnlinie des Spermiums. Dieser Wert ist immer der geringste der Werte. Aus den Durchschnittswerten aller Koordinatenpunkte des Pfades ergibt sich die VAP. Die ALH beschreibt die maximale, laterale Abweichung des Spermienkopfes vom durchschnittlichen Weg. Die Häufigkeit mit der der Spermienkopf den durchschnittlichen Pfad des Spermiums kreuzt, wird als BCF zusammengefasst. Die Kopfbewegung ist mit dem Flagellenschlag

gekoppelt und wird in der Einheit Hertz angegeben. Aus diesen Parametern lassen sich weitere Werte errechnen: Die LIN stellt den Quotienten aus VSL und VCL dar. Die STR wird aus dem Quotienten von VSL und VAP errechnet. Der WOB berechnet sich aus dem Quotienten von VAP und VCL. (BOYERS et al. 1989, MORTIMER 2000). Die Bedeutung der Geschwindigkeitsparameter und Bewegungsmuster wurde in vielen Studien untersucht. Anhand der durch die CASA gewonnenen Daten können die Spermien in einzelne Subpopulationen gegliedert werden. In einer Studie von QUINTERO-MORENO et al. (2003) werden ejakulierte Hengstspermien unter anderem anhand der Werte für VAP, LIN, WOB, ALH und BCF mittels Clusteranalyse in vier Subpopulationen unterteilt. Mit einem durchschnittlichen Vorkommen von 70 % ist die Subpopulation 1 am häufigsten. Sie weist die höchste Progressivität und Linearität (LIN  $56,31 \pm 0,4$  %) auf, wohingegen die Werte für ALH und DNC (individuelle Varianz von Bewegungsbahnlängen), niedrig sind. Durch die geradlinige, wenig wellenförmige Bewegung ist auch die BCF gering. Für die Subpopulation 2 wird eine Häufigkeit von ca. 20 % angegeben. Es handelt sich hierbei um hochaktive Spermien, die sich aber nicht in demselben Maße geradlinig (LIN  $47 \pm 0,4$  %) wie die Spermien der Subpopulation 1 bewegen. Die Spermien der Subpopulationen 3 und 4 zeichnen sich durch nicht lineare, zirkuläre Bewegungsbahnlängen aus (LIN  $31,0 \pm 0,3$ ;  $24,8 \pm 0,3$  %), mit hohen Werten für VAP und ALH. Diese Spermienpopulationen kommen zu 7 und 1 % vor. Eine weitere Studie von ORTEGA-FERRUSOLA et al. (2009) teilt die Spermien im Ejakulat des Hengstes in sechs Subpopulationen ein. Die Gliederung wurde anhand der Geschwindigkeitsparameter VCL, VSL und VAP vorgenommen. In die Subpopulationen 1 und 2 wurden Spermien mit geringer Geschwindigkeit, in die Subpopulationen 3 und 4 mit mittlerer Geschwindigkeit und in die Subpopulationen 5 und 6 mit hoher Geschwindigkeit eingeordnet. Es ergab sich eine hohe individuelle Varianz bezüglich der Verteilung der Subpopulationen.

Das Vorkommen von Subpopulationen wurde bei zahlreichen Säugetierspezies nachgewiesen. Bei Ebern konnten drei verschiedene Subpopulationen anhand der Werte für VCL, VSL, BCF und ALH differenziert werden (ABAIGAR et al. 1999). In einer Studie von MUIÑO et al. (2008) wurden beim Bullen in aufgetauten Samenproben vier Subpopulationen identifiziert. Als Einteilungskriterien dienten: VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH und BCF. KATHIRAVAN et al. (2011) teilt die Spermien des Bullen anhand der VAP in vier Kategorien: schnelle, mittelschnelle, langsame und statische Spermien. Beim Rüden wurden von NÚÑEZ-MARTÍNEZ et al. (2006 a) sechs Subpopulationen in Frischsamen und aufgetauten Samenproben entdeckt. Die Gliederung erfolgte durch die Anwendung eines Spermengeschwindigkeitsindex (SVI) und eines Spermienbewegungsindex (SMI).

Die Berechnung der Indices ergab sich wie folgt:

$$\mathbf{SVI} = (\text{VCL} \times 0,87) + (\text{VSL} \times 0,76) + (\text{VAP} \times 0,90) + (\text{ALH} \times 0,92);$$

$$\mathbf{SMI} = (\text{VSL} \times 0,59) + (\text{VAP} \times 0,37) + (\text{LIN} \times 0,95) + (\text{STR} \times 0,89) + (\text{WOB} \times 0,83).$$

In einer weiteren Studie von NÚÑEZ-MARTÍNEZ et al. (2006 b) wurden beim Rüden elf verschiedene Subpopulationen in Frischsamen und neun Subpopulationen in Tiefgefriersamen unterschieden. Als Kriterium für die Untergliederung dienten die Werte für VCL und VSL.

Beim Hirsch wurden Nebenhodenschwanzspermien auf das Vorkommen von Subpopulationen und deren Umverteilung durch Bearbeitung und Tiefgefrierung hin untersucht. Anhand der Werte für VCL, VSL und LIN wurden vier Subpopulationen in den initialen und bearbeiteten Proben vor der Tiefgefrierung gefunden und eine zusätzliche Fünfte in den aufgetauten Proben (MARTINEZ-PASTOR et al. 2005).

### **2.6.3.3 Konzentration und Spermiengesamtzahl**

Die Spermienkonzentration lässt sich in einer Zählkammer, mit einem Spektrophotometer, dem NucleoCounter® oder per Durchflusszytometrie bestimmen (SIEME 2009, BAUMBER-SKAIFE 2011, LOVE 2012). Mit einem CASA-System kann auch die Dichte von Spermien kalkuliert werden. Bei dieser Methode wird aber von substantiellen Fehlern bei der Analyse berichtet.

Die Spermiengesamtzahl lässt sich aus dem Volumen des Ejakulats und der Spermienkonzentration errechnen. Als Mindestanforderung für die Spermienkonzentration eines Ejakulats beim Hengst werden 100 Millionen Spermien pro Milliliter mit einem Schwankungsbereich von 100 bis 350 Millionen Spermien pro Milliliter angegeben (WEITZE 2001).

Der Nebenhoden dient der Speicherung der Spermien vor der Ejakulation (COOPER 1998) und stellt die größte extragonadale Spermienreserve dar. In einer Studie von JIMENEZ (1987) wurden pro equinem Nebenhodenschwanz im Durchschnitt 3,96 Milliarden Spermien gewonnen, mit einer Schwankungsbreite von 0,14 Milliarden bis 11,68 Milliarden Spermien pro Nebenhodenschwanz. JAMES et al. (2002) konnten aus dem gesamten Nebenhoden geschlachteter Hengste nach 24 Stunden Kühlung bei +4 °C 5565 ± 1008 Millionen Spermien erlangen. CARY et al. (2004) erhielten je nach Gewinnungsmethode 4485 Milliarden Spermien durch retrogrades Flushing und 4886 Milliarden Spermien durch die Flotationsmethode aus dem Nebenhodenschwanz des Hengstes. EICHELSBERGER et al. (2007) konnten pro Nebenhodenschwanz 5 bis 18 Milliarden Spermien herauspülen. In einer weiteren Studie wurden 25 ± 17,1 Milliarden Spermien pro Nebenhodenschwanz (MONTEIRO et al. 2011) beim Hengst gewonnen. GUIMARÃES et al. (2012) fanden heraus,

dass keine signifikanten Unterschiede in der erworbenen Spermienanzahl zwischen linkem und rechtem Nebenhoden bestanden. Aus dem linken Nebenhoden wurden  $7758 \pm 964,3$  Millionen Spermien und aus dem rechten Nebenhoden wurden  $8873 \pm 1355$  Millionen Spermien gewonnen.

#### **2.6.3.4 Morphologie**

Die Spermienmorphologie wird zumeist im Hellfeld mit tausendfacher Vergrößerung und Ölimmersion, anhand von gefärbten oder fixierten Ausstrichen der Samenprobe, beurteilt. Pro Ausstrich sollten wenigstens 100 bis 200 Spermien untersucht werden, um die Häufigkeit morphologischer Defekte einordnen zu können (BAUMBER-SKAIFE 2011). Im Feuchtpräparat von ungefärbten, mit Formaldehyd fixierten, Spermien kann die Morphologie im Phasenkontrast beurteilt werden (BRITO 2007). Für die Klassifikation der morphologischen Anomalien der Spermien existieren unterschiedliche Systeme (DOTT 1975, JASKO et al. 1990, SAACKE et al. 2000, WEITZE 2001, VARNER 2008).

Das Auftreten von Zytoplasmatröpfchen wird unterschiedlich als physiologisch oder Anomalie gewertet. Man unterscheidet proximale und distale Zytoplasmatröpfchen. Sie werden von den Spermatiden abgeschieden und stellen überschüssiges Zytoplasma dar. Im Laufe des Transports durch den Nebenhoden wandert das Zytoplasmatröpfchen von proximal nach distal den Spermien Schwanz entlang (DOTT 1975, BRITO 2007). In ejakulierten Spermienproben gelten Zytoplasmatröpfchen als Anomalien (BRITO 2007). Von MORRELL et al. (2008) werden distale Zytoplasmatröpfchen in ejakulierten Spermien als physiologisch bewertet. Für die Beurteilung der Spermienmorphologie im Ausstrich eignen sich die Eosin-Nigrosin Färbung (CARD 2005, BRITO 2007), die Williams Färbung (LAGERLÖF 1934) und die Färbung nach Cassarett (CASSARETT 1953). HANCOCK (1954) nutzt für die Untersuchung der Spermienmorphologie beim Bullen die Nigrosin-Eosin Färbung, die Giemsa-Färbung und die Heidenhain's Iron Haematoxylin Färbung. Um das Akrosom zu beurteilen kann die Spermac-Färbung (OETTLÉ 1986) verwendet werden.

Von WEITZE (2001) wird eine Höchstmenge von 30 % morphologisch veränderten Spermien als Mindestanforderung an den Hengst Samen angegeben. VARNER (2008) stellt heraus, dass sich einige Defekte stärker auf die Fertilität auswirken als andere. Einen weniger negativen Effekt auf die Fertilität haben Zytoplasmatröpfchen und gekrümmte Schwänze. Abgelöste Köpfe, Kopfformanomalien, Mittelstückanomalien, Krümmlinge und das Vorkommen prämaturer Spermienzellen werden als sehr ungünstig für die Fertilität angesehen. Der Anteil morphologisch unveränderter Spermien korreliert positiv mit der Trächtigkeitsrate (JASKO et al. 1990, MORRELL et al. 2008). VOSS et al. (1981) konnten keine eindeutige Korrelation zwischen der Trächtigkeitsrate und dem Anteil morphologischer Anomalien feststellen.

### **2.6.3.5 Vitalität**

Die Vitalität von Spermienzellen im Ausstrich kann mit Supravitalfärbungen festgestellt werden. Häufig wird eine Farbstoffkombination verwendet. Der eine Farbstoff durchdringt geschädigte Membranen und färbt die toten Spermien an, der andere Farbstoff färbt den Hintergrund, so dass die ungefärbten, intakten Spermien gut sichtbar sind. Als Lebend-Tot-Färbungen werden die Eosin-Nigrosin-Färbung (DOTT 1975, DOWSETT 1984, BRITO 2007) und die Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung (GEISLER 1990) beschrieben. In der Untersuchung von GEISLER (1990) wurde die Bromphenolblau-, die Bromphenolblau-Nigrosin- und die Nigrosin-Eosin-Färbung als Vitalfärbungen bei Spermien von Bullen, Schaf- und Ziegenböcken, Hengsten und Ebern getestet und miteinander verglichen. Es wird eine Empfehlung für die Bromphenolblau-Nigrosin- und die Eosin-Nigrosin-Färbung ausgesprochen. Bei der Eosin-Nigrosin-Färbung penetriert Eosin die kaputten Zellmembranen und färbt tote Spermien rot. Die lebenden Spermien sind weiß, der Hintergrund stellt sich durch das Nigrosin violett dar. Das Bromphenolblau überwindet geschädigte Zellmembranen und färbt solche Spermien blau an, intakte Spermien sind weiß und der Hintergrund ist von dunkelvioletter Farbe. In einer Studie von KÚTVÖLGYI et al. (2006) finden die Trypanblau- und die Chicago-Sky-Blue-Färbung als Lebend-Tot-Färbung für Hengstspermien Anwendung.

### **2.6.3.6 Fremdzellengehalt**

Der Fremdzellengehalt lässt sich unter dem Phasenkontrastmikroskop beurteilen. Anhand der Größe und Form lassen sich die Fremdzellen von den Spermien unterscheiden. Als Fremdzellen in der Samenprobe können Epithelzellen, Rundzellen (undifferenzierte Vorstufen der Spermien aus verschiedenen Spermatogenesestadien), Erythrozyten und Leukozyten auftreten (WEITZE 2001, SIEME 2009). Für die genauere Differenzierung der Fremdzellen stehen unterschiedliche Färbungen zur Verfügung.

### **2.6.3.7 Agglutination**

Als Agglutination wird das Aneinanderhaften von Spermien untereinander und an Fremdpartikel bezeichnet (SIEME 2009). Zumeist kleben die Spermien mit ihren Köpfen aneinander. Dabei kann der Spermischwanz noch frei beweglich sein. Auch eine sternförmige Anordnung oder die Agglutination regloser Spermien zu Haufen sind beschrieben. Die Häufigkeit und Art der Agglutination sind bei der Samenuntersuchung zu vermerken (WEITZE 2001, SIEME 2009).

## **2.7 Verdünnung und Konservierung von Spermien**

### **2.7.1 Aufbereitung von Hengstspermien mit Frischsamenverdünner**

Die Verdünnung von Hengstspermien sollte mit einem qualitativ hochwertigen Verdünner erfolgen. Ein kompatibler Frischsamenverdünner muss den Spermien Energie bereitstellen und sie vor Schwankungen des pH-Wertes, der Temperatur und des osmotischen Drucks schützen. Die Konzentration toxischer Substanzen, wie zum Beispiel Laktat, wird durch die Verdünnung reduziert. Außerdem müssen Enzymsysteme im Samen stabilisiert und die Membranintegrität erhalten werden (PICKETT und AMANN 1987, BEDFORT-GUAUS 2007). Der Verdünner muss die Motilität und Fertilität der Spermien bewahren. Er sollte klar und frei von Debris sein, so dass eine mikroskopische Untersuchung der Spermien nach der Verdünnung gut möglich ist (PICKETT und AMANN 1987, VARNER 2008). Als essentielle Inhaltsstoffe der Frischsamenverdünner sind Lipoproteine, Metabolite und antibiotische Zusätze zu nennen. Die Lipoproteine entstammen zumeist Milch oder Eidotter und schützen die Spermien vor Kälteschock, indem sie deren Membran stabilisieren. Als Metabolite dienen unter anderem Glukose, Laktose oder Fruktose. Zugefügte Antibiotika verhindern das Bakterienwachstum. Die Osmolarität des Verdünners ist ebenfalls von Bedeutung und sollte zwischen 300 und 400 mOsm pro Liter liegen. Der pH-Wert sollte zwischen 6,7 und 7,2 eingestellt sein. Um einer Senkung des pH-Werts, durch Akkumulation toxischer Stoffwechselendprodukte der Spermien, vorzubeugen werden herkömmlichen Verdünnern puffernde Substanzen hinzugefügt (AMANN und PICKETT 1987). Das Verdünnungsverhältnis sollte mindestens 1:1 und maximal 1:4 sein (BRINSKO et al. 2011). Nach der Zugabe des Verdünners können die Spermien zu einem erhöhten Prozentsatz Kreisbeweglichkeit zeigen. Dieses Phänomen gibt sich aber zumeist innerhalb von zehn bis fünfzehn Minuten (VARNER 2008).

Viele Verdüner können nach entsprechendem Rezept selbst hergestellt werden. Die folgenden Verdüner stellen eine Auswahl der kommerziell erhältlichen Frischsamenverdünner dar, die beim Hengst eingesetzt werden: E-Z-Mixin® (BRINSKO 1992, BEDFORT-GUAUS 2007, BRUEMMER et al. 2008), Verdünner nach Kenney (BEDFORT-GUAUS 2007, CLULOW et al. 2008), EquiPro™ (BEDFORT-GUAUS 2007), BotuSemen® (PAPA et al. 2008, MONTEIRO et al. 2011), INRA 96 (FAYRER-HOSKEN et al. 2008), AndroMed-E (AURICH et al. 2007).

### **2.7.2 Überprüfung der Haltbarkeit von Hengstspermien (Haltetest)**

Besonders im Hinblick auf den Frischsamenversand ist es von großer Bedeutung die Haltbarkeit von Spermien zu überprüfen. Traditionelle Haltetests werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Spermien werden dunkel gelagert und in regelmäßigen Zeitabständen gemustert, bis die Beweglichkeit bei unter 10 % angelangt ist. Eine neuere

Variante des Haltetests sieht die Lagerung der Spermien bei +5 °C vor. Die Spermien werden auf 40 bis 50 Millionen pro Milliliter verdünnt. Die Beweglichkeit wird nach 5 Minuten, 6, 12, 24 und 48 Stunden beurteilt. Für den Frischsamenversand gut geeignet sind Spermien, die nach 24 Stunden gekühlter Lagerung eine Beweglichkeit von über 30 % aufweisen, ideal sind solche, die diese Beweglichkeit über 48 Stunden beibehalten (CRABTREE 2010 b, BAUMBER-SKAIFE 2011).

VARNER (2003) empfiehlt den Haltetest mit verdünntem und unverdünntem Samen durchzuführen. Der unverdünnte Samen sollte bei Raumtemperatur gelagert werden. Der verdünnte Samen kann bei Raumtemperatur oder Kühlschrankschranktemperatur (+4 bis +8 °C) aufgehoben werden. Die Motilität wird in regelmäßigen Zeitabständen untersucht. BIELAŃSKI (1975) berichtet von einer guten Korrelation zwischen der Überlebenszeit von equinen Spermien im Uterus und der Überlebenszeit von Spermien, die im Verhältnis 1:3 mit 7 % Glukoselösung verdünnt und bei 0 °C gelagert wurden. Es wird von einer minimalen Überlebenszeit von 24 Stunden ausgegangen. Hengstspermien mit einer Überlebenszeit von über 36 Stunden werden als sehr gut beurteilt. In einer Studie von KISER et al. (2012) wurden Hengstspermien vier Tage lang nach zwei unterschiedlichen Kühlverfahren bei +8 °C gelagert. Die Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit, kurvenlineare Geschwindigkeit sowie die Membranstabilität wurden bestimmt. Der Anteil lebender Spermien war für beide Verfahren gleich (ca. 75 %). Die Motilitätswerte und die VCL wichen stark voneinander ab. Nach vier Tagen wurden, mit je 100 Millionen lebenden Spermien der gekühlten Proben, künstliche Besamungen durchgeführt. Die Trächtigkeitsraten für beide Kühlverfahren wichen nicht stark voneinander ab (47 und 58 %). Es wurde daher die Vermutung angestellt, dass die Vitalität und Haltbarkeit der Spermien eine genauere Aussage über die Fertilität der Hengstspermien treffen lässt, als die Beweglichkeit.

### **2.7.3 Tiefgefrierkonservierung von Hengstspermien**

#### **2.7.3.1 Grundlagen der Tiefgefrierkonservierung**

Als Kryokonservierung wird die Lagerung von Spermien bei Temperaturen unter 0 °C bezeichnet. Üblicherweise erfolgt die Einlagerung von tiefgefrorenem Samen in Flüssigstickstoff. Bei einer Temperatur von -196 °C gilt die metabolische Aktivität von Spermien als eingestellt (BRINSKO und VARNER 1992). Der Erfolg der Tiefgefrierung ist von der Erhaltung des Zellmetabolismus abhängig. Während der Tiefgefrierung müssen die Vitalität, Motilität und Fertilität der Spermien bewahrt werden. Die Spermien müssen nicht nur die Lagerung bei -196 °C überleben, sondern auch die kritischen Phasen des Abkühlens, Tiefgefrierens und Auftauens überstehen (AMANN und PICKETT 1987). Als kritische Temperaturbereiche beim Hengst gelten: +19 bis +9 °C (GRAHAM 2011) und -15 bis -60 °C

(MAZUR 1984, AMANN und PICKETT 1987). AURICH (2008) gibt +18 bis +8 °C als den Schwankungsbereich an, bei welchem sich der Kälteschock ereignet.

Die Spermienmembran besteht aus Phospholipiden, Membranproteinen und Cholesterol, die gemäß dem Flüssig-Mosaik-Modell miteinander interagieren (GRAHAM 2011). Die Komposition und Verteilung der Phospholipide sowie das Verhältnis von Cholesterol zu Phospholipiden mit ungesättigten Fettsäuren beeinflussen die Fluidität der Plasmamembran. Je höher dieses Verhältnis ist, desto „fester“ ist die Membran. Das Cholesterol stabilisiert die Membran und schützt die Spermienzelle vor Kälteschock (AMANN und PICKETT 1987). KIRK et al. (2001) nutzten Cyclodextrin für die Übertragung von, im Verdünner enthaltenem Cholesterol, auf die Spermienmembran. Das Cyclodextrin bindet Cholesterol und transferiert dieses auf die Plasmamembran. In einer Untersuchung wurde bei sechzehn Hengsten ein Anstieg der Gesamt- und Vorwärtsmotilität bei 24- und 48-stündiger Lagerung bei +5 °C festgestellt. Nach 24 Stunden zeigten die mit Cyclodextrin behandelten Spermien eine Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit von  $61 \pm 19$  und  $29 \pm 19$  % im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $43 \pm 19$  bzw.  $18 \pm 19$  %). Nach 48 Stunden waren die Werte ( $56 \pm 22$  bzw.  $24 \pm 15$  %) höher im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $38 \pm 22$  bzw.  $14 \pm 11$  %). Schlecht tiefgefrierbare Hengste verbesserten sich den Autoren nach um bis zu 50 %.

Bei einer Senkung der Temperatur wechseln die Phospholipide von der flüssigen in die feste, kristalline Phase. Je nach Länge der Fettsäureketten variiert diese Temperatur. Beim Hengst wechseln die ersten Phospholipide ihren Aggregatzustand von flüssig in fest bei +19 °C (GRAHAM 2011). Der Gefrierpunkt für die extra- und intrazelluläre Flüssigkeit liegt zwischen 0 und -5 °C. Im Bereich von -5 bis -15 °C bilden sich Eiskristalle (MAZUR 1984, AMANN und PICKETT 1987). Mit zunehmender Kristallisierung der Flüssigkeit im Extrazellularraum steigt der osmotische Druck in der verbliebenen, nicht gefrorenen Flüssigkeit, weil die löslichen Substanzen (Ionen, Proteine, Zucker) in der ungefrorenen Flüssigkeit verbleiben (AMANN und PICKETT 1987, GRAHAM 1996). In der Folge kommt es zur Exosmose von Wasser aus der Spermienzelle und zunehmender Dehydratation der Zelle. Bei einer langsamen Abkühlungsrate bilden sich große Eiskristalle in der extrazellulären Flüssigkeit. Die Spermienzellen verbleiben in den Flüssigkeitsräumen zwischen den Eiskristallen. Es herrscht ein hyperosmolares Milieu. Durch die Diffusion von Wasser, von intrazellulär nach extrazellulär, kommt es zu einem Ausgleich des Konzentrationsgradienten (Equilibrium). Aufgrund der Dehydratation der Spermienzelle wird eine intrazelluläre Eiskristallbildung verhindert (AMANN und PICKETT 1987). Die optimale Gefrierrate stellt einen Mittelweg dar und ist so schnell, dass die Spermien nicht zu stark dehydrieren und so langsam, dass sich

keine intrazellulären Eiskristalle bilden (MAZUR 1984, MOORE et al. 2006, SIEME et al. 2008).

Die häufigste Ursache für die Schädigung von Spermienzellen im Zuge der Tiefgefrierung ist die Bildung von intrazellulären Eiskristallen. Um diesen Vorgang zu verhindern, müssen Kühlrate, Konzentration und Art des Kryoprotektivums sowie die Auftaurate aufeinander abgestimmt werden. Auch während des Auftauens können sich noch Eiskristalle im Intrazellularraum bilden. Dieses Phänomen nennt man Rekrystallisierung. Sie ist die Folge zu schnellem Einfrierens und zu langsamen Auftauens. Durch das rasche Abkühlen bilden sich sehr kleine Eiskristalle in der Zelle. Diese Kristalle sind weniger thermostabil und tauen schneller auf, als große Kristalle. Während des Auftauprozesses tauen die kleinen Eiskristalle an, aggregieren und formen größere Eiskristalle, die die Zellstruktur nachhaltig schädigen (MAZUR 1984). Ein weiterer Stressfaktor für die Zelle stellt die Volumenänderung während des Tiefgefrier- und Auftauvorgangs dar. Durch die Exosmose von Wasser im Zuge des Tiefgefrierens schrumpft das Spermium. Als Folge des Auftauens kommt es wieder zur Volumenexpansion. Die Volumenschwankung ist eine mechanische Belastung der Zellmembran und wird durch deren Fähigkeit diesem Stress zu widerstehen, begrenzt. Die optimale Auftaurate führt zu einer tolerierbaren Volumenschwankung. Als optimale Tiefkühlrate ohne die Zugabe von kryoprotektiven Agenzien wird  $-29\text{ °C}$  pro Minute angegeben, mit Gefrierschutzmittel liegt diese bei  $-60\text{ °C}$  pro Minute (SIEME et al. 2008). Haben die Spermien eine Temperatur von unter  $-60\text{ °C}$  erreicht, sind sie inaktiv und stabil in ihrem Zustand. Die Lagerung kann über viele Jahre erfolgen (GRAHAM 1996, CRABO 2001)

### **2.7.3.2 Kälteschock**

Als Kälteschock fasst man eine Kette von Ereignissen zusammen, die bei der Kühlung von Samenzellen von  $+20$  auf  $+1\text{ °C}$  erfolgt (AMANN und PICKETT 1987). Durch den Kälteschock werden Spermien irreversibel geschädigt. Der Schaden kann direkt, durch Veränderung oder Zerstörung von Zellkomponenten oder indirekt, durch Veränderung der Zellfunktion, -physiologie und des Zellmetabolismus, entstehen (GRAHAM 2011). Die Auswirkungen umfassen die Modifikation im Bewegungsmuster der Spermien mit Zunahme der kreisbeweglichen und Abnahme der vorwärtsbeweglichen Spermien. Manche Spermien zeigen auch „Rückwärtsschwimmen“. Außerdem kommt es zu Schäden der Akrosom- und Plasmamembran, Reduktion des Zellmetabolismus und Verlust von Zellkomponenten (GRAHAM 1996). Der Kälteschock kann durch die Kontrolle der Kühlrate und Zugabe von kryoprotektiven Substanzen verhindert werden (MEDEIROS et al. 2002).

DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984) erachten eine Kühlrate von über  $-1\text{ °C}$  pro Minute und eine Kühlrate von kleiner als  $-0,05\text{ °C}$  pro Minute als schädlich für die Spermienzelle. Es wird eine Kühlrate von  $-0,3\text{ °C}$  pro Minute empfohlen. In einer Untersuchung von MORAN et al.

(1992) wurden unterschiedliche Abkühlraten bei Temperaturen von +24 bis +4 °C getestet, um die optimale Kühlrate, zur Vermeidung des Kälteschocks, zu identifizieren. Als temperatursensitivste Phase wurde der Bereich von +19 bis +8 °C bestimmt. Von +37 °C bis +19 °C kann eine schnelle Abkühlrate von -0,7 °C pro Minute angewendet werden. Um Kälteschock zu vermeiden, sollte im Bereich von +19 bis +8 °C eine Abkühlrate von -0,05 °C pro Minute gewählt werden. Für die gekühlte Lagerung der Spermien wird eine Temperatur von +4 bis +6 °C empfohlen.

### **2.7.3.3 Kryoprotektiva**

Die Kryoprotektiva lassen sich in penetrierende und nicht-penetrierende Gefrierschutzmittel einteilen. Durch die Zugabe kryoprotektiver Substanzen („cryoprotective agents“, CPA) sollen die Auswirkungen von physikalischem und chemischem Stress während des Kühl-, Tiefgefrier- und Auftauvorgangs minimiert werden (GRAHAM 1996, SIEME et al. 2008, BARBAS und MASCARENHAS 2009). Zu hohe Konzentrationen an CPA wirken zytotoxisch und können die Fertilität vermindern. Daher sind der Einsatz und die Menge des CPA's ein Balanceakt zwischen dem maximal schützenden Effekt und dem minimal toxischen Effekt (GRAHAM 1996).

#### **2.7.3.3.1 Penetrierende Kryoprotektiva**

Zu den penetrierenden Gefrierschutzmitteln zählen nach BARBAS und MASCARENHAS (2009): Glycerol, Dimethyl Sulfoxid (DMSO), Ethylenglycol und Propylenglycol. Zu den penetrierenden CPA zählen außerdem: Formamide und Acetamide. Die penetrierenden CPA unterscheiden sich von den nicht-penetrierenden CPA zumeist durch ihr geringeres Molekulargewicht. Dadurch wird ihre Membranpermeabilität erhöht (SQUIRES et al. 2004, ALVARENGA et al. 2005).

Weltweit am häufigsten wird Glycerol als CPA verwendet. Es wirkt extra- und intrazellulär (AMANN und PICKETT 1987). Der schützende Effekt beruht auf dem Herabsetzen des Gefrierpunkts des Mediums und auf die Verringerung der Konzentration der löslichen Stoffe in der Extrazellulärflüssigkeit (MERYMAN 1971, HOLT 2000, MEDEIROS et al. 2002). Durch die Bindung von Wasser im Extrazellulärraum wird die Dehydratation der Zelle gefördert, so dass sich intrazellulär keine Eiskristalle bilden. Nach der Penetration in die Zelle bindet Glycerol in der Zelle ebenfalls das Wasser und senkt so deren osmotischen Stress. Außerdem wird durch die Bindung von Wasser in der Zelle das Volumen des Spermiums erhalten (MEDEIROS et al. 2002). Glycerol senkt den Gefrierpunkt von Wasser im Verdünner auf zwischen -6 und -15 °C (GRAHAM 1996). Bei sehr hohen Konzentrationen senkt Glycerol den Gefrierpunkt von Wasser auf bis zu -40 °C (MERYMAN 1971). FAHY (1986) fand heraus, dass der zytotoxische Effekt von Glycerol bei 8 bis 10 % zum Tragen

kommt. Glycerol ist das CPA der Wahl beim Hengst und wird in einer Konzentration von 2,5 bis 5 % eingesetzt (GRAHAM 1996).

Aufgrund der osmotischen Wirkung von Glycerol, bedingt durch das relativ hohe Molekulargewicht von 92 Dalton, wurden alternative penetrierende CPA von SQUIRES et al. (2004) getestet. Das niedrigere Molekulargewicht soll die Membranpermeabilität verbessern und dadurch den osmotischen Stress der Zelle durch eine schnellere Aufnahme und Abgabe der Substanz während des Tiefgefrierens und Auftauens verringern. In der Studie von SQUIRES et al. (2004) wurde Glycerol mit Formamid, Methylformamid, Dimethylformamid, Acetamid und Methylacetamid verglichen. Das Glycerol zeigte sich allen alternativen CPA überlegen. Mit Glycerol eingefrorene Proben zeigten eine höhere Motilität nach dem Auftauen. In einer retrospektiven Analyse durch ALVARENGA et al. (2005) wurden Ethylenglycol, Dimethylamid, Dimethylformamid und Methylformamid als alternative CPA eingesetzt. Der schützende Effekt von Dimethylformamid und Ethylenglycol wurde dem von Glycerol gleichgesetzt. HOFFMANN et al. (2010) verglichen Dimethylformamid, Ethylenglycol, Glycerol und Methylformamid als CPA miteinander. Die Unterschiede in der Vorwärtsbeweglichkeit, Vitalität, Akrosomintegrität und dem Chromatinstatus waren nicht signifikant. Die optimale Konzentration an CPA wurde zwischen 2 und 3 % bei einer Osmolarität zwischen 600 und 950 mOsm angesehen.

#### **2.7.3.3.2 Nicht-penetrierende Kryoprotektiva**

Zu den nicht-penetrierenden Gefrierschutzmitteln zählen nach BARBAS und MASCARENHAS (2009): Eidotter, Magermilch, Trehalose, Aminoacide, Dextran und Sukrose. Im Jahr 1940 wurde von PHILLIPS und LARDY Eidotter als CPA für die Tiefgefrierung eingesetzt. Es wurde auf einen schützenden Effekt geschlossen, da die mit Eidotter versetzten Spermienproben, im Gegensatz zu den unbehandelten Spermien trotz der Lagerung bei +10 °C ihre Motilität für 300 Stunden erhielten. Der schützende Effekt von Eidotter wird durch die enthaltenen Phospholipide und „low density lipoproteins“ begründet. Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt (PARKS und GRAHAM 1992, MEDEIROS et al. 2002). Es gibt zwei verschiedene Hypothesen bezüglich des schützenden Mechanismus von Eidotter als CPA. WATSON (1975) und QUINN et al. (1980) vermuten, dass die Phospholipide und „low density proteins“ in die Spermienmembran integriert werden und stabilisierend wirken. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Phospholipide und „low density proteins“ sich locker an die Zellmembran binden und diese wie eine schützende Schicht umgeben. VISHWANATH et al. (1992) vermuten, dass die wasserlösliche, kationische (positiv geladene) Fraktion in Eidotter an die Plasmamembran bindet und um Bindungsstellen mit potentiell schädlichen Faktoren im Seminalplasma konkurriert. Durch die Besetzung der Bindungsstellen stellt sich der schützende Effekt ein.

Als Alternative zu Eidotterverdünner wurden von PILLET et al. (2012) verschiedene Liposomen getestet. Liposomen sind kleine Vesikel, bestehend aus einer Phospholipid-Doppelmembran. Die untersuchten Liposomen enthielten kommerzielles Lecithin E80S, Lecithin E80 aus dem Eidotter und das Lecithin S75 aus Soja. Die Liposomen wurden einem Tiefgefrierverdünner in unterschiedlichen Konzentrationen (2, 4 und 8 %) zugefügt und mit demselben Verdünner, dem Eidotter (2 %) beigefügt wurde, verglichen. Nach dem Auftauen lieferten die mit E80, aus Eidotter hergestellte Liposomen, die besten Ergebnisse in der Motilität, verglichen mit den anderen Liposomen. Der Eidotterverdünner war jedoch den Liposomen überlegen. Die Autoren nennen die E80 Liposomen als gute Alternative und empfehlen eine Optimierung in deren Herstellung. Als Vorteile, die für die Verwendung von Liposomen als CPA sprechen, werden die künstliche Herstellung sowie deren standardisierte Zusammensetzung und Sterilität genannt.

Die Wirksamkeit von Magermilch als CPA wird auf die Proteinfraction zurückgeführt, da keine Lipide enthalten sind (MEDEIROS et al. 2002). Als schützende Faktoren werden die Caseinmicellen vermutet (CHOONG und WALES 1962, BERGERON und MANJUATH 2006). In einer Untersuchung wies MARTIN (1966) den schützenden Effekt von 2 % Casein, Glukose, Laktose, Fruktose und Sukrose nach.

#### **2.7.3.4 Konfektionierung**

Für die Konfektionierung können 0,25 ml (CLULOW et al. 2008) und 0,5 ml Pailletten (COCHRAN et al. 1984, CRISTANELLI et al. 1984, VOLKMANN und van ZYL 1987, CLULOW et al. 2008), 4 ml Makrotüb<sup>®</sup> (MARTIN und KLUG 1979, MARTIN et al. 1979, WÖCKENER et al. 1989) und das Spermienpellet (MERKT und KRAUSE 1966) gewählt werden. WÖCKENER et al. (1989) verglichen die Auftauergebnisse von Samenproben, die in 0,5 ml Pailletten, 4 ml Makrotüb<sup>®</sup> und 1,7 ml Flachbehältnissen eingefroren wurden und fanden keine signifikanten Unterschiede. NASCIMENTO et al. (2008) empfiehlt 0,25 und 0,5 ml Pailletten, da diese ein besseres Auftauergebnis lieferten. Durch, die im Verhältnis zum enthaltenen Volumen, größere Oberfläche erfolgt das Kühlen, Tiefgefrieren und Auftauen gleichmäßiger. CLULOW et al. (2008) fanden keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Gesamt- und Vorwärtsmotilität der Auftauprobe zwischen den 0,25 ml und den 0,5 ml Pailletten. DIAS MAZIERO et al. (2013) verglichen die Gesamt-, Vorwärtsmotilität, VCL, VAP und VSL der in 0,25 ml und 0,5 ml Pailletten konfektionierten Auftauproben miteinander. Die 0,5 ml Pailletten lieferten bei allen Parametern bessere Ergebnisse als die in den 0,25 ml Pailletten eingefrorenen Proben.

#### **2.7.3.5 Einfriertechnik**

Das am häufigsten verwendete Tiefgefrierprotokoll schließt eine zweistufige Verdünnung mit dazwischen geschalteter Zentrifugation ein. Die Spermien werden zunächst mit einem

Frischsamenverdünner im Verhältnis 1:1 oder auf 50 Millionen Spermien pro Milliliter verdünnt. Dann erfolgt die Zentrifugation bei 350 bis 700 g für zehn bis fünfzehn Minuten. Der Überstand wird entfernt. Dem Spermienpellet wird ein Tiefgefrierverdünner hinzugefügt (SIEME et al. 2008). Als Endverdünnung für die Kryokonservierung werden für ejakulierte Spermien 200 Millionen Spermien pro Milliliter empfohlen (SIEME und KLUG 2003). Für das Tiefgefrieren von Nebenhodenspermien wurden folgende Verdünnungen verwendet: 40 oder 400 Millionen Spermien pro Milliliter (CLULOW et al. 2008), 5 Millionen Spermien pro Paillette (PAPA et al. 2008), 50 Millionen Spermien pro Paillette (MELO et al. 2008), 500 Millionen Spermien pro Paillette (HEISE et al. 2010). Die Kryokonservierung kann, mit oder ohne vorherige Kühlung, entweder im Einfrierautomat (COCHRAN et al. 1984, CRISTANELLI et al. 1984, ECOT et al. 2000, CLULOW et al. 2008) oder in einer Styroporbox mit Flüssigstickstoff (COCHRAN et al. 1984, HEITLAND et al. 1996, CROCKETT et al. 2001, CLULOW et al. 2008) erfolgen.

Bei der Kryokonservierung in der Styroporbox werden die Pailletten horizontal über dem Flüssigstickstoff auf Metallracks angeordnet. Die Inkubationszeit und der Abstand zum Flüssigstickstoff sind variabel. Je größer der Abstand zwischen Flüssigstickstoff und Metallrack, desto geringer ist die Kühlrate. Die Kombination aus der Styroporbox und den Metallracks nennt man auch Schwimmrampe. Nach HEITLAND et al. (1996) herrschen in folgenden Abständen die genannten Temperaturen:

- 9 bis 10 cm: -100 °C
- 5,5 bis 7 cm: -130 °C
- 2,5 bis 5 cm: -160 °C
- 0,3 bis 1 cm: -190 °C

Bei der Tiefgefrierung mit einem programmierbaren Einfrierautomat wird Stickstoffdampf in die Gefrierkammer eingeblasen, bis die erwünschte Endtemperatur erreicht ist, dann werden die Pailletten in Flüssigstickstoff verbracht. BRINSKO et al. (2011) empfehlen die Kryokonservierung mit dem Einfrierautomaten, weil die Einfrierkurve gleichmäßiger ist als beim Schwimmrampenverfahren. Die Vitalität der Spermien nach dem Auftauen wird somit erhöht. Die Einfrierprogramme für die Kryokonservierung mit dem Einfrierautomaten werden in Tabelle 1 beschrieben. Für die Tiefgefrierung mit der Schwimmrampe werden unter anderem die in Tabelle 2 genannten Einfrierprogramme genannt.

**Tab. 1:** Literaturübersicht verschiedener Einfrierprogramme mit dem Einfrierautomat

Autor	Einfrierprogramm
COCHRAN et al. (1984), CRISTANELLI et al. (1984)	+20 °C bis -15 °C (FR -10 °C/Min); -15 °C bis -120 °C (FR -25 °C/Min)
CHRISTENSEN et al. (1995)	+20 °C bis +5°C (KR -0,5 °C/Min); +5 °C bis -15 °C (FR -10 °C/Min); -15 °C bis -150 °C (FR -25 °C/Min)
BLOTTNER et al. (2001)	+20 °C bis +5°C (KR -0,3 °C/ Min); +5 °C bis -15 °C (FR -10 °C/Min); -15 °C bis -150 °C (FR -25 °C/Min)
VIDAMENT et al. (2000)	+20 °C bis +4°C (KR -0,2/Min ); +4 °C bis -140 °C (FR -40 °C bis -60 °C/Min)
CLULOW et al. (2008)	Kühlung auf +4 °C, von +4 °C bis -50 °C (FR -50 °C/Min); -50 °C bis -110 °C (FR -10 °C/Min); -110 °C bis -150 °C (FR -50 °C/Min)
KLEWITZ et al. (2008)	Kühlung +5 °C bis -149 °C (FR -60 °C/Min)
NASCIMENTO et al. (2008)	+20 °C bis +5 °C (KR -0,25 °C/Min); +5 °C bis -80 °C (FR -15 °C/Min); -80 °C bis -120 °C (FR -10 °C/Min)
BRINSKO et al. (2011)	+25 °C bis +22 °C (KR -2 °C/Min); +22 °C bis +10 °C (KR -0,3 °C/Min); +10 °C bis +4 °C (KR -0,2 °C/Min) ; +4 °C bis -140 °C (FR -60 °C/ Min)
DIAS MAZIERO et al. (2013)	Kühlung +5 °C auf -10 °C (FR -15 °C/Min) und von -10 °C auf -140 °C (FR -40 °C/Min)

**Tab. 2:** Literaturübersicht über verschiedene Einfrierprogramme mit der Schwimmrampe

<b>Autor</b>	<b>Einfrierprogramm</b>
MARTIN et al. (1979)	3 cm über Stickstoffdampf für 15 Minuten
COCHRAN et al. (1984), BRAUN et al. (1994 )	4 cm über Stickstoffdampf für 10 Minuten
LOOMIS et al. (1983), CROCKETT et al. (2001)	3 cm über Stickstoffdampf für 10 Minuten
SQUIRES et al. (2004)	9,5 cm über Stickstoffdampf für 10 Minuten
CLULOW et al. (2008)	3 cm über Stickstoffdampf für 7 Minuten
DIAS MAZIERO et al. (2013)	6 cm über Stickstoffdampf für 11,5 Minuten

COCHRAN et al. (1984) fanden heraus, dass die Kühlung vor der Tiefgefrierung auf +5 °C, im Vergleich zur direkten Tiefgefrierung von der Raumtemperatur ausgehend, keinen positiven Effekt auf die Motilität nach dem Auftauen hat. Es wird daher die direkte Tiefgefrierung empfohlen. CROCKETT et al. (2001) raten von einer Kühlung über 24 Stunden bei +5 °C ab, da die Vorwärtsbeweglichkeit signifikant reduziert wird. Eine Kühlung für 12 Stunden bei +5 °C vor der Tiefgefrierung kann erfolgen und hat keinen negativen Effekt auf die Motilität der Spermien. ECOT et al. (2000) verglichen vier verschiedene Kühlregimes und deren Interaktion mit drei verschiedenen Verdünnern:

- Kühlung von +37 auf +22 °C → Zentrifugation und Glycerolzugabe → Konfektionierung bei +4 °C und direkte Tiefgefrierung.
- Kühlung von +37 auf +22 °C → Zentrifugation und Glycerolzugabe → Kühlung von +22 auf +4 °C in 60 Minuten → Konfektionierung bei +4 °C und direkte Tiefgefrierung.
- Kühlung von +37 auf +4 °C in 90 Minuten → Zentrifugation und Glycerolzugabe → Konfektionierung bei +4 °C und direkte Tiefgefrierung.
- Kühlung von +37 auf +4 °C in 90 Minuten → Zentrifugation und Glycerolzugabe → Equilibration für 60 Minuten → Konfektionierung bei +4 °C und Tiefgefrierung.

Folgende Verdünnern kamen zum Einsatz:

- INRA 82 mit 2 % Eidotter und 2,5 % Glycerol
- Kenney-Verdünnern mit 4 % Eidotter und 3,5 % Glycerol
- Gent-Verdünnern mit 5 % Eidotter und 5 % Glycerol

Der Kenney-Verdünnern erwies sich in Kombination mit allen vier Kühlregimes, im Vergleich zu den anderen zwei Verdünnern, als überlegen. Die Vorwärtsbeweglichkeit betrug im Durchschnitt 38,1 %, bei INRA 82- und Gent-Verdünnern betrug sie 32 und 33,4 % nach dem Auftauen. Tendenziell am besten eignete sich das zweite Kühlregime, wobei die

Unterschiede nicht signifikant waren. SALAZAR et al. (2011) testeten den Effekt einer schnellen und einer langsamen Kühlrate vor der Tiefgefrierung auf die Auftauergebnisse. Die langsame Kühlung erfolgte über 70 Minuten von +25 °C bis +22 °C (KR -2 °C/Min), +22 °C bis +10 °C (KR -0,3 °C/Min) und von +10 °C bis +4 °C (KR -0,2 °C/Min). Bei der schnellen Kühlung wurden die Pailletten direkt mit der Schwimmrampe für fünfzehn Minuten 4 cm über dem Flüssigstickstoff belassen und dann in den Flüssigstickstoff verbracht. Die langsame Kühlrate führte zu einem Anstieg der Gesamt- und Vorwärtsmotilität sowie der VCL. Die langsame Kühlung vor der Kryokonservierung verbesserte die Spermienqualität nach dem Auftauen.

In einer Studie von CLULOW et al. (2008) wurden die Auswirkungen von Spermienkonzentration, Konfektionierungsform und Einfriermethoden auf die Auftauergebnisse verglichen. Die Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit, Haltbarkeit, Morphologie und Akrosomintegrität der Hengstspermien wurde nach dem Auftauen bestimmt. Die Spermien wurden auf 40 oder 400 Millionen Spermien pro Milliliter verdünnt und in 0,25 oder 0,5 ml Pailletten abgefüllt. Für die Tiefgefrierung wurden eine Styroporbox mit Flüssigstickstoff und ein programmierbarer Einfrierautomat verwendet. Die ermittelte Kühlrate war bei der Tiefgefrierung in der Styroporbox mit 0,25 ml Pailletten am höchsten. Ansonsten hatte die Konfektionierungsform keinen Effekt auf die Auftauergebnisse. Für die Konzentration von 40 Millionen Spermien pro Milliliter wurden eine bessere Vorwärtsmotilität in den ersten drei Stunden und ein höherer Prozentsatz morphologisch intakter Spermien festgestellt. Die Einfriermethode hatte keinen Einfluss auf die Gesamtmotilität, Morphologie und Akrosomintegrität. Die Tiefgefrierung mit dem Einfrierautomat lieferte bessere Ergebnisse in der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien.

In einer Studie von DIAS MAZIERO et al. (2013) wurde der Einfluss zweier verschiedener Einfrierprogrammen auf die Bewegungs- und Geschwindigkeitsparameter der Spermien und deren Plasmamembranintegrität untersucht. Die Kryokonservierung mittels Schwimmrampe und mit dem Einfrierautomaten wurden verglichen. Vor dem Tiefgefrieren wurden die Spermien in 20 Minuten auf +5 °C heruntergekühlt. Für die Tiefgefrierung in der Schwimmrampe wurden die Pailletten auf ein Metallgitter 6 cm über dem Flüssigstickstoff angeordnet. Die Tiefkühlkurve wurde mit einem Thermometer gemessen und betrug -10 °C/Min von +5 auf -60 °C und -8 °C/Min von -60 auf -100 °C. Zum Vergleich wurden weitere Pailletten mit dem Einfrierautomat mit folgender Tiefkühlkurve eingefroren: -15 °C/Min von +5 auf -10 °C und -40 °C/Min von -10 auf -140 °C. Die Gesamt-, Vorwärtsbeweglichkeit, VAP, VS, VCL und Membranintegrität wurden nach dem Auftauen

bestimmt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede auf die Bewegungs- und Geschwindigkeitsparameter sowie Membranintegrität zwischen den zwei Einfriermethoden.

### **2.7.3.6 Tiefgefrierbarkeit und Tiefgefrierkonservierung von equinen Nebenhodenspermien**

Im Jahr 1980 wurde von JOHNSON et al. die Hypothese aufgestellt, dass Nebenhodenspermien weniger empfindlich gegenüber Kälteschock sind als ejakulierte Spermien. Die Vitalität ejakulierter Spermien und von Spermien aus dem Nebenhodenkopf-, -körper und -schwanz wurde nach unterschiedlichen Kühlraten mit einer Lebend-Tot-Färbung bestimmt. Je nach Nebenhodenregion unterschied sich der Anteil lebender Spermien nicht und lag bei durchschnittlich 90 %. Bei den ejakulierten Spermien wurden mehr tote Spermien diagnostiziert. Die Spermien wurden bei +38 °C inkubiert oder auf 0 °C in zwei Minuten, auf +10 °C in zwölf Minuten und auf +4 °C in 22 Minuten gekühlt. Die Vitalität lag bei den Nebenhodenschwanzspermien bei 90, 87, 89 und 92 %; bei den ejakulierten Spermien bei 68, 27, 73 und 71 %.

MAGISTRINI et al. (1988) führten eine Untersuchung zum Vergleich der Auftaucharakteristiken von ejakulierten und epididymalen Spermien durch. Aufgrund dieser Ergebnisse stellten sie die Vermutung auf, dass die Tiefgefrierbarkeit von Nebenhodenspermien besser ist als die von ejakulierten Spermien.

Die Bestimmung von Motilität, Vitalität und Geschwindigkeit erfolgte vor und nach dem Tiefgefrieren. Die Auftauergebnisse der Nebenhodenspermien waren besser, als die der ejakulierten Spermien. Die Motilität, Vitalität und Geschwindigkeit der Nebenhodenspermien betrug: 37 %, 55,5 % und 61,4 µm/s im Vergleich zu denen der ejakulierten Spermien mit 31,6 %, 47,9 % und 54,6 µm/s. Die Hengste, deren ejakulierte Spermien gute Ergebnisse zeigten, wiesen auch bei den Nebenhodenspermien nach der Kastration bessere Ergebnisse auf.

Bei einer Untersuchung der Vorwärtsmotilität nach dem Auftauen von Nebenhodenspermien, die vor der Kryokonservierung 24 Stunden bei Raumtemperatur oder gekühlt gelagert wurden, zeigte sich, dass die kühle Lagerung vorzuziehen ist. Es wurde eine Vorwärtsbeweglichkeit nach dem Auftauen von durchschnittlich 24 % erreicht. Wurden die Nebenhodenspermien bei Raumtemperatur gelagert reduzierte sich diese auf 7,35 % (NEILD et al. 2006).

TIPLADY et al. (2002) bestimmten die Vorwärtsbeweglichkeit von Nebenhodenspermien vor und nach dem Tiefgefrieren. Vor dem Auftauen wiesen die Spermien eine progressive Motilität von 30 % auf, nach dem Auftauen verringert sie sich auf 7,5 %. Die Vitalität betrug vor dem Einfrieren 60 % und nach dem Auftauen 48 %. Verschiedene Beispiele für die Methoden der Tiefgefrierkonservierung von Nebenhodenspermien beim Hengst werden in Tabelle 3 beschrieben.

**Tab. 3:** Methoden zur Tiefgefrierkonservierung von Nebenhodenspermien

<b>Autor</b>	<b>TG-Verdüner</b>	<b>Glycerol</b>	<b>Pailletten</b>	<b>Einfrierprogramm</b>
BARKER und GANDIER (1957)	Magermilch	10 %	Keine Angabe	Inkubation bei +5 °C für 18 Stunden, TG in -79 °C
BRAUN et al. (1994)	Eidotter	5 %	0,5 ml	Schwimmrampe; 4 cm über Stickstoffdampf für 10 Minuten
JIMENEZ (1987)	Eidotter	keine Angabe	0,5 ml	Bei +20°C für 30 Minuten oder 2 Stunden equilibrieren; Schwimmrampe; 4 cm über Stickstoffdampf für 10 Minuten
NEILD et al. (2006)	Laktose-EDTA-Glukose-Eidotter-Dimethyl Formamide	keine Angabe	0,5 ml	Schwimmrampe; 6 cm über Stickstoffdampf Von +20 °C bis -15 °C (FR -10 °C bis -20 °C/Min); von -15 °C bis -120 °C (FR 25- 40 °C/Min)
HEISE et al. (2010)	Magermilch	2,5 %	0,5 ml	60 Minuten bei +4 °C; Schwimmrampe 3,5 cm über Stickstoffdampf für 20 Minuten
PAPA et al. (2008)	BotuCrio®, INRA-84, EDTA Laktose	keine Angabe	0,5 ml	Kühlung, Schwimmrampe; 6 cm über Stickstoff für 20 Minuten
MONTEIRO et al. (2011)	BotuCrio®	keine Angabe	0,5 ml	Kühlung, Schwimmrampe; 6 cm über Stickstoff für 20 Minuten
OLACIREGUI et al. (2014)	Eidotter	2,5-5 %	0,5 ml	Kühlung (4°C für 2 Stunden) Schwimmrampe 4 cm über Stickstoffdampf für 10 Minuten

### **2.7.3.7 Auftauregime und Überprüfung der Tiefgefrierbarkeit von Hengstspermien**

Nach dem Tiefgefrieren werden die Spermien im Wasserbad erwärmt. Die Dauer des Auftauens sollte sich nach der Geschwindigkeit des Einfriervorgangs richten, ein schnelles Einfrieren erfordert ein schnelles Auftauen und umgekehrt (GRAHAM 1996).

Die Zeit und Temperatur des Auftauens variiert je nach Autor. Am häufigsten werden die Spermien bei +37 °C für 30 Sekunden aufgetaut (JIMENEZ 1987, TIPLADY et al. 2002, MORRIS et al. 2002, CLULOW et al. 2008, HEISE et al. 2010). BRAUN et al. (1994 a) geben die Spermien für 15 Sekunden in ein, auf +37 °C erwärmtes, Wasserbad. PAPA et al. (2008) und MONTEIRO et al. (2011) beschreiben das Auftauen bei +46 °C für 20 Sekunden. Von NEILD et al. (2003) werden die Spermien zunächst 7 Sekunden bei +75 °C und dann 15 Sekunden bei +37 °C aufgetaut.

Um die Effizienz der Kryokonservierung zu kontrollieren, können verschiedene Untersuchungen durchgeführt werden. Häufig wird der Erfolg der Tiefgefrierung mit der Motilität nach dem Auftauen gleichgesetzt. Es existieren aber noch viele andere mögliche Untersuchungsmethoden, die in Kombination mit der Motilität eine bessere Aussage über die Tiefgefrierbarkeit der Spermien eines Hengstes treffen lassen. Die Motilität kann subjektiv und objektiv beurteilt werden. Mittels CASA lassen sich die Geschwindigkeiten und Bewegungsmuster messen. Außerdem kann mit CASA eine morphometrische Analyse des Spermienkopfes durchgeführt werden. Die Plasmamembranintegrität lässt sich mit dem hypoosmotischen Schwellungstest, Supravitalfärbungen, durch Fluoreszenzmikroskopie, Fluorometrie und Flow-Zytometrie feststellen. Für die Beurteilung der Akrosomintegrität stehen verschiedene Färbungen zur Verfügung, die Flow-Zytometrie und Fluorometrie (GRAHAM und MOCÉ 2005). Die Motilität wird durch den Tiefgefrier-Auftau-Vorgang weniger beeinflusst als die morphologische Integrität. Am sensitivsten gegenüber der Kryokonservierung sind die Plasmamembranintegrität und der Akrosomstatus (BARBAS und MASCARENHAS 2009).

### **2.7.3.8 Fertilität von kryokonservierten Hengstspermien**

Die Kryokonservierung von Hengstspermien führt zu einer Reduktion der Fertilität (BRINSKO et al. 2011). Die Tiefgefrierbarkeit und Fertilität kryokonservierter Spermien variiert bei Hengsten individuell stark (GRAHAM und MOCÉ 2005). In einer Untersuchung von TISCHNER (1979) wurde, auf der Basis von 200 untersuchten Ejakulaten, 20 % von 36 Hengsten als „gut tiefgefrierbar“, 60 % als „moderat tiefgefrierbar“ und 20 % als „schlecht tiefgefrierbar“ beurteilt. Lag die Motilität, nach dem Auftauen, bei über 40 % wurden die Hengste als „gut tiefgefrierbar“, zwischen 20 und 40 % als „moderat tiefgefrierbar“ sowie unter 20 % als „schlecht tiefgefrierbar“ bezeichnet und beurteilt. In einer retrospektiven Studie von VIDAMENT (2005) über die Fertilität kryokonservierter Spermien in den Jahren

1985 bis 2005 wurde in über 1800 Ejakulaten eine durchschnittliche Motilität von 50 % gemessen. Die Trächtigkeitsraten lagen im Durchschnitt bei 45 bis 48 %. NISHIKAWA (1975) berichtet von Trächtigkeitsraten durch die Insemination mit kryokonservierten Spermien von durchschnittlich 56,3 %. Die Untersuchungen wurden in den Jahren 1966 bis 1973 bei 22 Hengsten durchgeführt. LOOMIS et al. (1983) verglichen die Trächtigkeitsraten von frischen mit denen von tiefgefrorenen Spermien bei 476 Hengsten. Für den Frischsamen ergaben sich Trächtigkeitsraten von 66 %, für den tiefgefrorenen Samen 29 %.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Hengste**

Es wurden zehn Hengste ab einem Alter von drei Jahren in den Versuch aufgenommen. Die vorherige züchterische Nutzung wurde erfragt.

#### **3.2 Präoperative Untersuchung der Hengste**

Bei Anlieferung und im Rahmen der präoperativen Vorbereitung wurden die Hengste klinisch untersucht. Unmittelbar vor der Kastration wurde eine andrologische Untersuchung in Sedation durchgeführt. Die Untersuchung der äußeren Genitalorgane erfolgte nach einem standardisierten Untersuchungsprotokoll. Es wurde eine adspektorische sowie palpatorische Untersuchung der äußeren Genitalorgane durchgeführt und die Lage, Form, Konsistenz, Oberflächenbeschaffenheit, Schmerzhaftigkeit, Verschieblichkeit und Temperatur von Hoden und Nebenhoden bestimmt. Auch der Samenstrang wurde auf seine Verschiebbarkeit, Schmerzhaftigkeit und Temperatur hin überprüft. Die Länge, Breite und der skrotale Umfang beider Hoden wurden mit dem Messzirkel gemessen (GEBAUER et al. 1974 a, b). Die Größe des Nebenhodenschwanzes wurde geschätzt.

#### **3.3 Gewinnung und Untersuchung der Nebenhoden**

##### **3.3.1 Kastration**

Die Hengste wurden in Allgemeinanästhesie kastriert. Unmittelbar nach der Entnahme der Hoden und Nebenhoden wurden diese in das, sich in demselben Gebäude befindliche, Labor verbracht. Während des Transports und der Lagerung wurden die Hoden und Nebenhoden in DPBS mit Calcium und Magnesium Lösung (Bio Whittaker®-Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) with Calcium and Magnesium, Lonza, Walkersville, USA) gegeben.

##### **3.3.2 Nebenhodenaufbereitung und Gewichtsbestimmung**

Hoden und Nebenhoden wurden von Blut gereinigt. Der Samenleiter wurde mit einer Arterienklemme verschlossen, um eine Kontamination mit Blut oder den Verlust von Spermien zu vermeiden. Anschließend wurde der Plexus pampiniformis abpräpariert. Das Gesamtgewicht von Hoden und Nebenhoden wurde mit einer Präzisionswaage (P1200, Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) gemessen. Auch das Volumen beider Organe wurde durch die Wasserverdrängung in einem geeichten Gefäß bestimmt. Danach wurde der Nebenhoden vom Hoden separiert, indem das Nebenhodengekröse (Mesepididymis) und das Ligamentum testis proprium mit einer Schere durchtrennt wurden. Die feste bindegewebige Verbindung zwischen Nebenhodenkopf und Hoden wurde ebenfalls vorsichtig mit der Schere durchschnitten. Nach dem Absetzen vom Hoden wurde der Nebenhoden nochmals alleine gewogen.

### **3.3.3 Bestimmung der Volumina von Hoden und Nebenhoden**

Der Hoden und Nebenhoden wurden gemeinsam in einen mit 600 ml Wasser befüllten, geeichten Messzylinder gegeben. Anhand der Wasserverdrängung wurde das Volumen von Hoden und Nebenhoden bestimmt. Nach dem Absetzen des Nebenhodens wurde das Volumen des Hodens alleine gemessen. Das Ergebnis der Subtraktion des Volumens von Hoden und Nebenhoden im Zusammenhang und des Volumens des Hodens ergab das Volumen des Nebenhodens.

### **3.4 Makroskopische und palpatorische Untersuchung des Nebenhodens**

Vor der weiteren Bearbeitung des Nebenhodens wurde dieser makroskopisch untersucht, die Befunde wurden in ein Untersuchungsprotokoll eingetragen. Durch Palpation wurde die Konsistenz der drei Nebenhodenabschnitte erhoben. Das Gewicht des Nebenhodens in seiner bindegewebigen Hülle wurde in Gramm bestimmt. Länge, Höhe und Breite des Nebenhodenschwanzes wurden mit einer Schieblehre (Emil Lux GmbH & Co KG, Wermelskirchen, Deutschland) in Millimetern gemessen. Bei der Bestimmung der Länge des Nebenhodenschwanzes wurde die letzte sichtbare Gangwindung als proximales Ende des Nebenhodenschwanzes vor dem Übergang in den Samenleiter angesehen. Das distale Ende stellte der untere Rand der kolbigen Verdickung des Nebenhodenschwanzes dar. Um den Querumfang des Nebenhodenschwanzes zu bestimmen, wurde ein Maßband um den breitesten Punkt des Nebenhodenschwanzes gelegt und der Wert in Millimetern gemessen. Anhand der Maße des Nebenhodenschwanzes wurde das Nebenhodenschwanzvolumen berechnet. Hierfür wurde folgende Formel angewendet:

**Nebenhodenschwanzvolumen** =  $\text{Länge}/2 \times \text{Breite}/2 \times \text{Höhe}/2 \times 4/3 \times 3,14159$ .

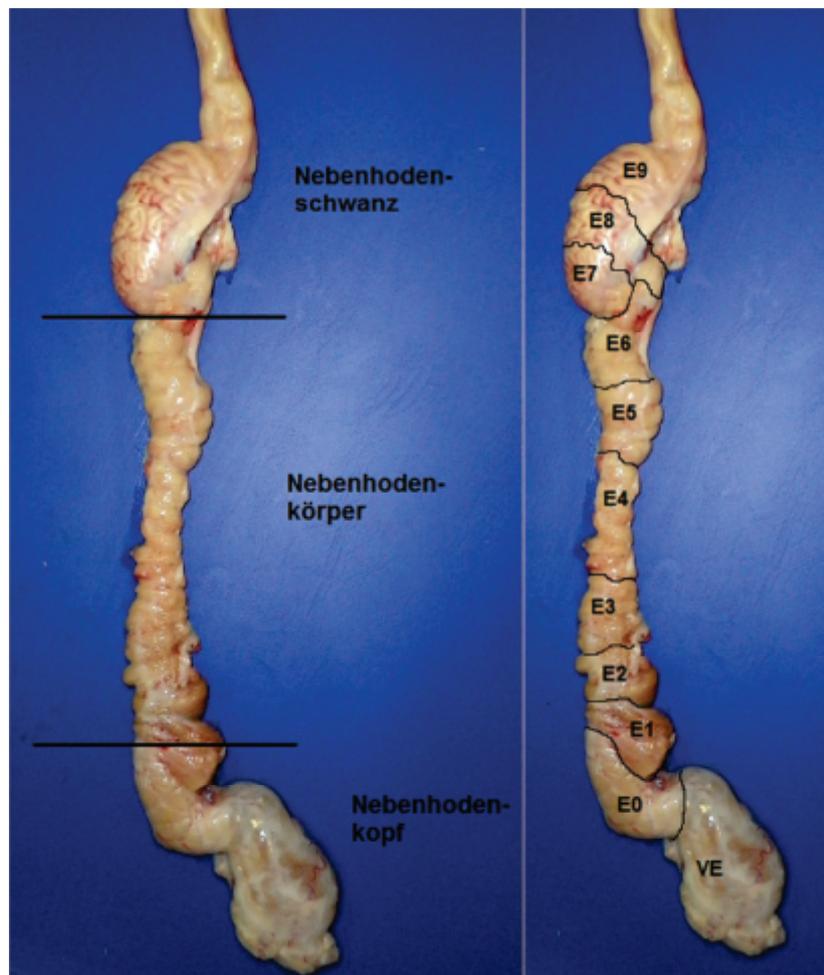
Der **Anteil des Nebenhodenschwanzvolumens an dem Nebenhodengesamtvolumen** wurde anhand der nachfolgenden Formel berechnet und in Prozent angegeben:

$[(\text{Nebenhodenschwanzvolumen}/1000)/\text{Nebenhodenvolumen}] \times 100$

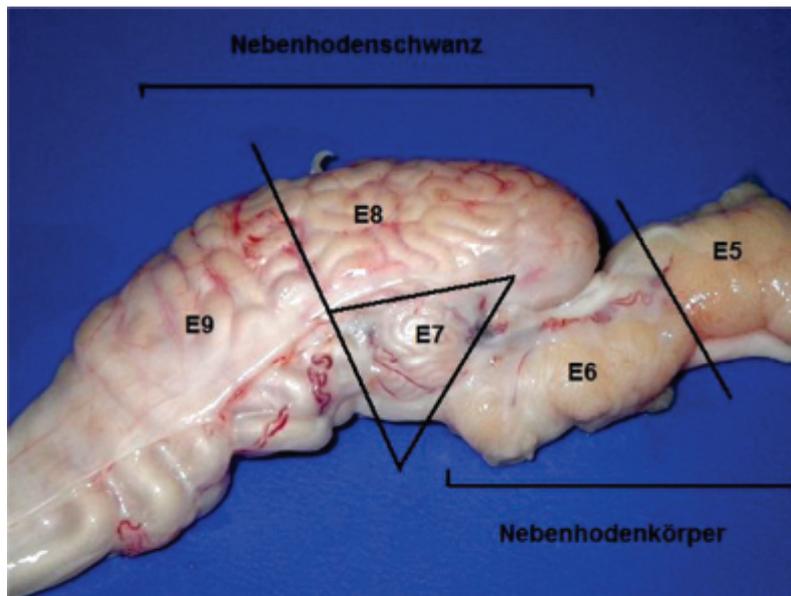
Abschließend wurde der Nebenhoden fotografiert und Besonderheiten wurden dokumentiert.

### 3.5 Präparation und Einteilung der Nebenhodenabschnitte

Der Nebenhoden wurde von seiner bindegewebigen Hülle befreit. Die Einteilung des Nebenhodenschwanzes in die Abschnitte VE bis E9 nach Fouchécourt et al. (2000), wurde modifiziert. In der Abbildung 1 ist die Einteilung des Nebenhodens in die anatomischen Regionen (NICKEL et al. 1987) und die einzelnen Segmente beschrieben. Als VE wird der erste Abschnitt bezeichnet, der den Hoden mit dem Nebenhoden verbindet. VE bezeichnet die Vasa efferentia, die aus dem Hoden entspringen und in den Nebenhoden münden. Der Nebenhodenkopf erstreckt sich von E0 bis E2, der Nebenhodenkörper von E3 bis E6 und der Nebhodenschwanz von E7 bis E9. In der Abbildung 2 ist die Einteilung des Nebhodenschwanzes in die Abschnitte E7 bis E9 zu sehen.



**Abb. 1:** Einteilung des Nebenhodens in Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz nach NICKEL et al. (1987) und in die Segmente VE bis E9 nach Fouchécourt et al. (2000)



**Abb. 2:** Einteilung des Nebenhodenschwanzes in E9, E8, E7

Der Nebenhodenschwanz ist bereits vor der Entfernung der bindegewebigen Hülle gut vom Nebenhodenkörper abzugrenzen, da er dem strangförmigen Nebenhodenkörper säckchenartig anliegt. Nach Entfernung der bindegewebigen Hülle ist der stark geschlängelte Nebenhodengang sichtbar, der sich in zahlreiche, durch Bindegewebe verbundene Läppchen legt (NICKEL et al. 1987). Im Durchmesser wird der Nebenhodengang von dem Nebenhodenschwanz ausgehend bis zum Nebenhodenkörper kleiner. Der Nebenhodenschwanz konnte in die Segmente E7 bis E9 untergliedert werden, wobei die letzte sichtbare Gangwindung vor Mündung in den Samenleiter den Anfang von E9 darstellte. Das Ende von E9 war hinter dem ersten gut abgrenzbaren Nebenhodenlobus mit makroskopisch gut sichtbaren Gangwindungen gelegen. Der Abschnitt E8 stellt den anschließenden Nebenhodenlobus dar, der einen zunehmend kleineren Nebenhodengangdurchmesser aufweist. Der Abschnitt E7 bildet das Ende des Nebenhodenschwanzes, der Lobus ist säckchenartig, der Übergang zum Nebenhodenkörper ist durch eine Verengung der Form und durch eine Verkleinerung der Nebenhodengangs gekennzeichnet. Zunächst wurden die Abschnitte E7 bis E9 mit einem Skalpell voneinander abgesetzt. Um den Verlust von Nebenhodensekret zu verhindern, wurde das distale Ende des Abschnitts E9 mit einer Arterienklemme verschlossen. Die Abschnitte E7 und E8 wurden jeweils in eine sterile Petrischale (SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gegeben. Bis zum Slicing wurden die Abschnitte E7 und E8 mit 1 ml DPBS Lösung feucht gehalten. Bevor das Slicing der Abschnitte E7 und E8 erfolgte, wurden die Blutgefäße zwischen den Gangwindungen mit einer Schere und einer chirurgischen Pinzette entfernt. Der Abschnitt E9 wurde in einem Ständer fixiert. Vor der retrograden Spülung wurden das Bindegewebe und die Blutgefäße zwischen den Nebenhodengangwindungen reseziert, so konnten die Nebenhodengangwindungen begradigt werden, um die Spülung zu erleichtern.

## **3.6 Gewinnung von Nebenhodenspermien**

### **3.6.1 Slicing der Abschnitte E7 und E8**

Mit einem Slicing-Gerät (Bauanleitung siehe Anhang) wurde der Nebenhodengang von E7 und E8 mehrfach eingeschnitten und so eröffnet. Anschließend wurden beide Abschnitte unter Verwendung von 9 ml DPBS mit Druck gespült. Es erfolgte eine zehninütige Inkubation bei +37°C auf der Wärmeplatte (HT 200, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland), so dass die Spermien aus dem angeschnittenen Nebenhodengang heraus schwimmen konnten. Anschließend wurde das Sekret aus den Petrischalen mit einer 5 ml Pipette (Ergo One 5 ml, STAR LAB GmbH, Hamburg, Deutschland) in ein 15 ml Falconröhrchen (Zentrifugenröhrchen 15 ml, STAR LAB GmbH, Hamburg, Deutschland) pipettiert.

### **3.6.2 Retrograde Spülung des Abschnittes E9**

Nach Entfernung der Arterienklemme am distalen Ende des Abschnitts E9 und Begradigung der Gangwindungen wurde der Nebenhodengang distal mit einer Schere mehrfach eingeschnitten. Eine sterile, gekürzte 200 µl Pipettenspitze (STAR LAB GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde in das proximale Ende des Nebenhodenganges eingeführt und mit einer Klemme fixiert. Die retrograde Spülung des Nebenhodengangs erfolgte mit 10 ml DPBS aus einer 20 ml Spritze. Anschließend wurde mit der Spritze Luft in den Gang gedrückt, um die letzten Reste Spülflüssigkeit zu gewinnen. Das Sekret wurde in einem 50 ml Falconröhrchen aufgefangen. Zur anschließenden Zentrifugation wurde das Sekret mit einer 5 ml Pipette in ein 15 ml Falconröhrchen umgefüllt.

## **3.7 Untersuchung der Nebenhodenspermien**

Für jeden einzelnen Abschnitt des Nebenhodenschwanzes wurde ein Spermiogramm, gemäß eines spermatologischen Untersuchungsprotokolls, durchgeführt. Direkt nach der Gewinnung der Spülflüssigkeit wurden Volumen, Farbe, Konsistenz und die Anwesenheit von Beimengungen in der Spülflüssigkeit makroskopisch bestimmt.

Im Anschluss wurde je 1 ml der Ausgangsproben E7 bis E9 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Mikrozentrifugenröhrchen 1,5 ml Crystal Clear, STAR LAB GmbH, Hamburg, Deutschland) gegeben, um das Spermiogramm durchzuführen. Es folgte die Untersuchung der Dichte, des pH-Wertes, der Agglutination, des Fremdzellengehalt und der Motilität.

### **3.7.1 Dichtebestimmung mit der Zählkammer nach BÜRKER-TÜRK**

Die Dichtebestimmung erfolgte mit der Zählkammer nach BÜRKER-TÜRK (Optik Labor, Lancing, Großbritannien). Es wurden 10 µl der Spermienprobe mit 990 µl Aqua dest. in einem Reaktionsgefäß vermischt. Die Zählkammer wurde vorsichtig mit 10 µl der Verdünnung befüllt. Die Auszählung erfolgte in der vierhundertfachen Vergrößerung im

Phasenkontrast. Bei hoher Dichte der Spermien wurden 4 x 9 kleine Felder ausgezählt. Bei geringerer Dichte wurden 4 x 16 große Felder ausgezählt und die Dichte berechnet:

**Dichte** = Zahl der Spermien/ Zahl der ausgezählten Felder \* 400 bzw. 25 (Mio/ml).

1/400 mm<sup>2</sup>= Fläche der kleinen Felder

1/25 mm<sup>2</sup>= Fläche großen Felder

Kammerhöhe: 0,1 mm

### **3.7.2 Dichtebestimmung mit dem NucleoCounter®**

Mit dem NucleoCounter® (NucleoCounter® SP 100™, Chemometec, Allrød, Dänemark) wurde die Dichte der Spermien gemessen. Zur Analyse wurden 25 µl der Spermienprobe zweihundertfach in 5 ml Reagent (Reagent S100, Chemometec, Allrød, Dänemark) verdünnt. Durch das Reagenz werden die Zellmembranen lysiert und die Zellkerne freigesetzt. Die Dichtebestimmung muss unmittelbar im Anschluss erfolgen (<10 Sekunden). Mit der Einwegkassette (SP1 Cassette™, Chemometec, Allrød, Dänemark) wurden 60 µl der Probe aspiriert. Die Dichtemessung erfolgte in der Analysekammer der Kassette, das analysierte Probenvolumen betrug circa 3 µl. Die Zellkerne der Spermien werden anhand ihrer Größe identifiziert und von Zellkernen anderer Zellen oder Verdünnerpartikeln eindeutig unterschieden. Die Zellkerne werden gezählt und die Dichte wird nach einer Analysezeit von ca. 30 Sekunden in Millionen/ml auf dem Display des NucleoCounter® angezeigt. Als Grundlage für die Verdünnungen dienten die vom NucleoCounter® ermittelten Werte.

### **3.7.3 Spermengesamtzahl**

Die Spermengesamtzahl (Milliarden) wurde durch Multiplikation von Konzentration und Volumen bestimmt.

### **3.7.4 pH-Wert**

Es wurden 10 µl der Probe auf ein Indikatorpapier (MACHERY-NAGEL GmbH & Co KG, Düren, Deutschland) pipettiert und der pH-Wert gemessen.

### **3.7.5 Motilität**

Um die Motilität der Spermien zu beurteilen, wurden 10 µl der Probe auf einen, auf +37 °C angewärmten, Objektträger (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) gegeben, mit einem Deckglas (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) bedeckt und unter dem Mikroskop (CX41RF, OLYMPUS, JAPAN) betrachtet. Die Gesamtmotilität und die Prozentsätze vorwärts-, orts- und unbeweglicher Spermien wurden subjektiv geschätzt. Die subjektive Schätzung erfolgte mit einem Negativ-Hochkontrast-Objektiv (UPlan FINH 20x/0,50 Ph1 OLYMPUS, JAPAN) bei zweihundertfacher Vergrößerung im Phasenkontrast.

Zur objektiven Bewertung der Bewegungsmuster und Geschwindigkeiten der Spermien wurden je 6,5 µl der Proben auf einen, auf +37 °C angewärmten, Objektträger gegeben, mit einem Deckglas bedeckt und im Negativ-Hochkontrast-Objektiv bei zweihundertfacher Vergrößerung im Phasenkontrast mit der SpermVision® Software 3.5 (SpermVision® Software 3.5, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) analysiert.

Das CASA-System besteht aus einem Lichtmikroskop (CX 41, OLYMPUS, JAPAN) mit beheizter Scan-Stage (HT 200, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland), welches über eine Digitalkamera (CV- A10CL; JAI, Shanghai, China) mit dem Computer verbunden ist. Mit dem CASA-System (SpermVision® 3.5 Software) wurden Bewegungsmuster und Geschwindigkeiten der Spermien objektiv analysiert. Die Analyse erfolgte standardmäßig in sechs Feldern durch Aufnahme von 30 Videosequenzen mit 0,5 Sekunden pro Gesichtsfeld. Die Auflösung des Bildes betrug 768 (h) x 576 (v) Pixel. Die aufeinanderfolgenden Sequenzen wurden durch SpermVision® 3.5 analysiert und verglichen, so dass die Bewegungsmuster der Spermien rekonstruiert werden konnten. Die Geschwindigkeiten der Spermien wurden gemessen und folgende Parameter bestimmt: DCL, DAP, DSL, VCL, VAP, VSL, LIN, STR, WOB, BCF, ALH. Folgende Motilitätswerte der Spermien wurden angegeben: Unbewegliche Spermien, ortsbewegliche Spermien, vorwärtsbewegliche Spermien. Je nach Motilität und Bewegungsmuster sind die Strecken unterschiedlich farbig dargestellt. Die vorwärtsbeweglichen Spermien werden nochmals nach Art der Vorwärtsbeweglichkeit unterschieden: progressiv und kurvenlinear; progressiv und nichtlinear; progressiv und linear; progressiv und hyperaktiviert. Es werden Einzelwerte für jede Spermienzelle pro Feld, Durchschnittswerte der gesamten Spermienpopulation pro Feld und die Standardabweichungen berechnet und angegeben. Durch CASA können maximal 400 Spermien pro Gesichtsfeld analysiert werden. War die Dichte für die CASA zu hoch, so wurde die Probe verdünnt, nach der Verdünnung wurde die Motilität nochmals subjektiv geschätzt, um die Kompatibilität des Verdünners mit der Probe zu beurteilen.

### **3.7.6 Agglutination**

Das Auftreten und, wenn vorhanden, der Grad der Agglutination von Spermienköpfen wurde bestimmt. Die Agglutination wurde in nicht vorhanden, gering-, mittel- und hochgradig eingeteilt.

### **3.7.7 Fremdzellengehalt**

Die Präsenz und die Häufigkeit von Fremdzellen wurden in der, zur Motilitätsanalyse verwendeten, Probe bestimmt. Der Gehalt an Fremdzellen wurde in gering-, mittel- und hochgradig angegeben.

### **3.8 Zentrifugation der Proben**

Die Proben wurden mit 600 g bei +20 °C für 10 Minuten zentrifugiert (HERAEUS MEGAFUGE 16 R Centrifuge, Thermo Scientific, Deutschland). Der Überstand wurde mit einer 5 ml Pipette abpipettiert.

### **3.9 Konservierung von Nebenhodenspermien**

#### **3.9.1 Frischsamenkonservierung**

Die Vorverdünnung der Nebenhodenspermien erfolgte gemäß eines standardisierten Untersuchungsprotokolls. Unmittelbar im Anschluss an die Zentrifugation und das Abpipettieren des Überstands wurde das Spermienpellet im Verhältnis 1+1 mit EquiPro™ (EquiPro™, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) resuspendiert. Durch Schwenken und Schnipsen gegen den Grund des Falconröhrchens erfolgte die Resuspension des Spermienpellets.

Nach jedem Verdünnungsschritt wurde die Motilität subjektiv und objektiv bestimmt, um die Kompatibilität des Vorverdünners zu prüfen. Die Dichte der 1+1 vorverdünnten Spermien wurde mit dem NucleoCounter SP 100™ bestimmt. Das Ergebnis der Dichtebestimmung diente als Ausgangswert für die weiteren Verdünnungsschritte.

Durch weitere Zugabe des Vorverdünners wurde die Dichte der Nebenhodenspermien der Abschnitte E7 bis E9 auf 800 Millionen Spermien pro Milliliter eingestellt. Die Ergebnisse der Motilitäts- und Dichtebestimmung, die Menge des Verdünners, die Verdünnung und das Endvolumen wurden protokolliert.

##### **3.9.1.1 Haltetest**

Je 0,5 ml der Ausgangsproben E7 bis E9 wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Jede Probe wurde mit 1 ml EquiPro™ im Verhältnis 1+2 verdünnt und bei +4 °C im Kühlschrank eingelagert. Die Motilität wurde direkt, nach 24, 48, 72 und 96 Stunden geschätzt und mit der SpermVision® Software 3.5 bestimmt. Für die Motilitätsbestimmung wurden 6,5 µl der Probe auf einen Objektträger gegeben. Vor der Bestimmung der Motilität wurden die Objektträger für 1 Minute auf der Wärmeplatte bei +37 °C inkubiert. Die Ergebnisse wurden in ein Untersuchungsprotokoll eingetragen.

#### **3.9.2 Tiefgefrierkonservierung**

##### **3.9.2.1 Verdünnungsschritte**

Die Verdünnung der Nebenhodenspermien mit TG-Verdünner erfolgte nach einem standardisierten Protokoll. Es wurde eine 1+1 Verdünnung mit Gent-Verdünner (Gent Extender, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) auf 400 Millionen Spermien pro Milliliter durchgeführt. Nach der Verdünnung wurde die Motilität erneut bestimmt, um die Kompatibilität des Verdünners zu prüfen. Die Ergebnisse der Motilitätsbestimmung, die Menge des Verdünners, die Verdünnung und das Endvolumen wurden protokolliert.

### **3.9.2.2 Konfektionierung der Nebenhodenspermien**

Die beschrifteten Pailletten wurden, ihrer Chargenbeschriftung nach, in das Paillettenmagazin eingeordnet und mit einem Andrückblock festgepresst. Mit einer 5 ml Spritze und einer langen Kanüle (0,8 x 120 mm) wurden die Proben in die beschrifteten 0,5 ml Pailletten gefüllt. Für den Abschnitt E7 wurden für den linken und rechten Nebenhoden je zwölf Pailletten, für die Abschnitte E8 und E9 24 Pailletten pro Seite (insgesamt 312 Pailletten) befüllt. Zur Unterscheidung erhielten die linke und die rechte Seite jeweils unterschiedlich gefärbte Verschlusskugeln (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland). Der Verschluss der Pailletten erfolgte mit einem halbautomatischen Verschlussgerät (SFS 133, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland). Die Anzahl der Pailletten pro Abschnitte, Größe und Farbe der Pailletten und die Farbe der Verschlusskugeln wurden in einem Protokoll festgehalten.

### **3.9.2.3 Einfriermethoden**

#### ***3.9.2.3.1 Tiefgefrierkonservierung der Nebenhodenspermien mit der Schwimmrampe***

Die Hälfte der abgefüllten Pailletten (sechs Pailletten des Abschnitts E7 und zwölf Pailletten der Abschnitte E8 und E9) wurden mit der Schwimmrampe (Einfriereinheit, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) tiefgefroren. Es wurden ein schneller und ein langsamer Einfriervorgang durchgeführt (modifiziert nach ECOT et al. 2000). Die Höhe des Metallracks in der Schwimmrampe wurde auf 5 cm über dem Stickstoff eingestellt. Vorbereitend wurde der Flüssigstickstoff bis zur Markierung in die Styroporwanne gefüllt, die Wanne wurde geschlossen und für zehn Minuten equilibriert. Die Pailletten wurden auf dem Metallrack horizontal und gleichmäßig verteilt angeordnet. Die Schwimmrampe wurde vorsichtig auf die Oberfläche des flüssigen Stickstoffs aufgesetzt und die Wanne geschlossen. Zunächst befanden sich die Pailletten im Stickstoffdampf bei -160 °C und wurden nach zwanzig Minuten mit einer langen Pinzette in den flüssigen Stickstoff (-196 °C) verbracht. Danach wurden die Pailletten im Flüssigstickstoff in Gobelets (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) eingeordnet und in einen Stickstoffcontainer (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) überführt, wo die Pailletten für mindestens 24 Stunden gelagert wurden.

#### ***3.9.2.3.2 Tiefgefrierkonservierung der Nebenhodenspermien mit dem Einfrierautomaten***

Die andere Hälfte der abgefüllten Pailletten wurde mit dem Einfrierautomat (Ice Cube 14 S, SY-LAB Geräte GmbH, Neupurkersdorf, Österreich) tiefgefroren. Das Tiefgefrieren erfolgte nach einer programmierten Einfrierkurve. Es wurden ein schneller und ein langsamer Einfriervorgang durchgeführt. Die Pailletten wurden horizontal auf einem Metallrack angeordnet, das in die Gefrierkammer verbracht wurde. Durch Einblasen zerstäubten Stickstoffs wurde die Gefrierkammer auf die gewünschte Temperatur gekühlt. Nach

Erreichen der Endtemperatur wurden die Pailletten in Flüssigstickstoff umgelagert, in Goblets geordnet und für mindestens 24 Stunden in einem Container eingelagert.

### **3.9.2.3.3 Einfrierprogramme**

Es wurden vier verschiedene Einfrierprogramme zur Tiefgefrierung der Nebenhodenspermien durchgeführt (siehe Tab. 4). Jeweils ein schneller und ein langsamer Einfriervorgang wurden mit der Schwimmrampe und dem Einfrierautomaten vollzogen. Für den schnellen Einfriervorgang wurden die Nebenhodenspermien direkt, ohne vorherige Kühlung, nach der Konfektionierung tiefgefroren. Bei der Tiefgefrierung mit der Schwimmrampe wurden die Pailletten von Raumtemperatur (+20 °C) mit einer Einfrierrate von -1 °C pro Minute auf +4 °C heruntergekühlt, dann wurde die Temperatur mit einer Einfrierrate von -60 °C pro Minute auf -160 °C gesenkt und danach in den Flüssigstickstoff (-196 °C) verbracht. Der schnelle Einfriervorgang mit dem Einfrierautomaten wurde ebenfalls ohne vorherige Kühlung der Nebenhodenspermien durchgeführt. Die Nebenhodenspermien wurden von Raumtemperatur (+20 °C) mit einer Einfrierrate von -1 °C pro Minute auf +4 °C gekühlt, danach wurde deren Temperatur mit einer Einfrierrate von -60 °C pro Minute auf -140 °C eingestellt und in den flüssigen Stickstoff umgelagert.

Bei dem langsamen Einfriervorgang wurde der Tiefgefrierung eine Kühlung im Kühlschrank vorangestellt. Die Nebenhodenspermien wurden von Raumtemperatur (+20 °C) in den Kühlschrank gegeben und dort mit einer Kühlrate von -0,1 °C pro Minute auf +4 °C heruntergekühlt. Um Temperaturschwankungen zu vermeiden, wurden die auf Racks angeordneten Pailletten in Plastikboxen mit Deckeln gestellt und der Kühlschrank für die Zeit der Kühlung fest verschlossen und zwischendurch nicht geöffnet. Danach wurde der Einfriervorgang mit der Schwimmrampe oder dem Einfrierautomaten wie vorher beschrieben fortgesetzt.

**Tab. 4:** Einfrierprogramme für die Tiefgefrierung der Nebenhodenschwanzspermien mit der Schwimmrampe und dem Einfrierautomaten mit bzw. ohne vorangegangene Kühlung

Einfrier-vorgang	Kühlung vor TG (°C/ Min)	Einfriermethode	Einfrierprotokoll (°C/ Min)
1. Schnell, im Stickstoffdampf (SRS)	Keine Kühlung	Schwimmrampe, 5 cm über Flüssigstickstoff/ 20 Minuten	Von +20 °C bis +4 °C (KR -1 °C/ Min); +4 °C bis -140 °C (FR -60 °C/ Min); N
2. Langsam, im Stickstoffdampf (SRL)	+20 °C bis +4 °C (KR -0,1 °C/ Min)		+4 °C bis -140 °C (FR -60 °C/ Min); N
3. Schnell, im Einfrierautomat (ICS)	Keine Kühlung	Einfrierautomat	Von +20 °C bis +4 °C (KR -1 °C/ Min); +4 °C bis -140 °C (FR -60 °C/ Min); N
4. Langsam, im Einfrierautomat (ICL)	+20 °C bis +4 °C (KR -0,1 °C/ Min)		+4 °C bis -140 °C (FR -60 °C/ Min); N

### 3.10 Auftauprobe

#### 3.10.1 Motilitätsanalyse

Für die Nebenhodenschwanzabschnitte E7 bis E9 des linken und rechten Nebenhodens wurden Auftauprobe durchgeführt, es wurde für jeden Einfriervorgang eine Auftauprobe angefertigt. Das Auftauen der Proben (je eine Paillette pro Abschnitt) erfolgte mit einem Auftaugerät (MT 35/42, Minitüb GmbH, Tiefenbach, Deutschland) bei +38 °C für zwanzig Sekunden. Die Paillette wurde aufgeschnitten und die Probe wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Minute Inkubation auf der Wärmeplatte bei +37 °C wurde die Gesamtmotilität sowie die Anteile an vorwärts-, orts- und unbeweglichen Spermien der jeweiligen Probe im Negativ-Hochkontrast-Objektiv bei zweihundertfacher Vergrößerung im Phasenkontrast mit der SpermVision® Software 3.5 analysiert. Im Falle einer, für die CASA zu hoch konzentrierten, Probe wurde diese weiter mit EquiPro™ verdünnt.

#### 3.10.2 Dichtebestimmung

Die Dichte wurde mit dem NucleoCounter SP 100™ gemessen und mit der Zählkammer nach BÜRKER-TÜRK bestimmt, die Spermien Gesamtzahl wurde berechnet (Mio/ml).

### **3.10.3 Haltetest der Auftauprobe**

Für den Haltetest wurde die Probe 1+2 mit EquiPro™ verdünnt und bei +4 °C im Kühlschrank eingelagert. Die Motilität wurde direkt, nach 1, 2, 24 und 48 Stunden subjektiv geschätzt und mit der SpermVision® Software 3.5 gemessen. Für die Motilitätsbestimmung wurden je 6,5 µl der Proben entnommen und auf einen, auf +37 °C angewärmten, Objektträger gegeben. Vor der Bestimmung der Motilität wurden die Objektträger für eine Minute auf der Wärmeplatte bei +37 °C inkubiert.

### **3.11 Auswertung und Statistik**

Die statistische Analyse wurde mit der Software JMP® (Version 10.0.0; SAS Institute Inc., Cary, NC) durchgeführt. Da die Daten nicht normalverteilt waren (Shapiro-Wilk-Test), wurden sie als Median mit den Extremwerten (min – max) angegeben und die Effekte der untersuchten Parameter mithilfe des signed ranked Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben geprüft.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Hengste**

Bei den Hengsten handelte es sich um Warm- und Vollblüter zwischen drei und vierzehn Jahren, die in der Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie der FU Berlin zur Kastration vorgestellt wurden. Keiner der Hengste war zuvor im Deckeinsatz.

### **4.2 Präoperative Untersuchung der Hengste**

Alle Hengste waren klinisch gesund. Die andrologische Untersuchung war unauffällig.

### **4.3 Makroskopische Untersuchung des Nebenhodens**

#### **4.3.1 Nebenhodengewicht und -volumen**

Es wurden jeweils zehn linke und rechte Nebenhoden gewogen und deren Volumen bestimmt. Nachfolgend wurden die Medianwerte für das Gewicht und Volumen errechnet. Für den linken Nebenhoden wurde ein Gewicht von 41,4 (32,2 – 61,7) g ermittelt. Die rechten Nebenhoden waren 39,0 (31,6 – 61,2) g schwer. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gewichten der linken und rechten Nebenhoden ermittelt werden. Die Wasserverdrängung für die Bestimmung der Volumina für den linken und rechten Nebenhoden betragen 44 (20 – 70) ml und 55 (30 – 70) ml, im Wasserverdrängungsvolumen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen linken und rechten Nebenhoden.

#### **4.3.2 Vermessung des Nebenhodenschwanzes**

Die Länge, Breite und Höhe des linken Nebenhodenschwanzes betragen: 53,2 (29,9 – 71,5), 19,7 (13,6 – 23,1) und 24,5 (20,4 – 44,8) mm. Der Umfang der linken Nebenhodenschwänze erreichte 67,5 (60,0 – 80,0) mm. Bei der Vermessung der rechten Nebenhodenschwänze ergaben sich folgende Werte für die Länge, Breite, Höhe und den Umfang: 51,9 (33,8 – 75,2) mm, 20,3 (15,2 – 41,9) mm, 24,5 (17,8 – 52,5) mm, 70,0 (60,0 – 80,0) mm. Die Nebenhodenschwanzvolumina der linken Nebenhodenschwänze betragen im Median 12588,1 (8781,18 – 21016,1) mm<sup>3</sup>, die der rechten Nebenhodenschwänze 13872,4 (6773,23 – 50440) mm<sup>3</sup>. Der Anteil des Nebenhodenschwanzvolumens an dem Nebenhodengesamtvolumen betrug links 28,15 (20,24 – 52,55) und rechts 34,15 (11,29 – 55,66) %. Für keines der Maße Länge, Breite, Höhe, Umfang und Volumen ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den rechten und linken Nebenhoden.

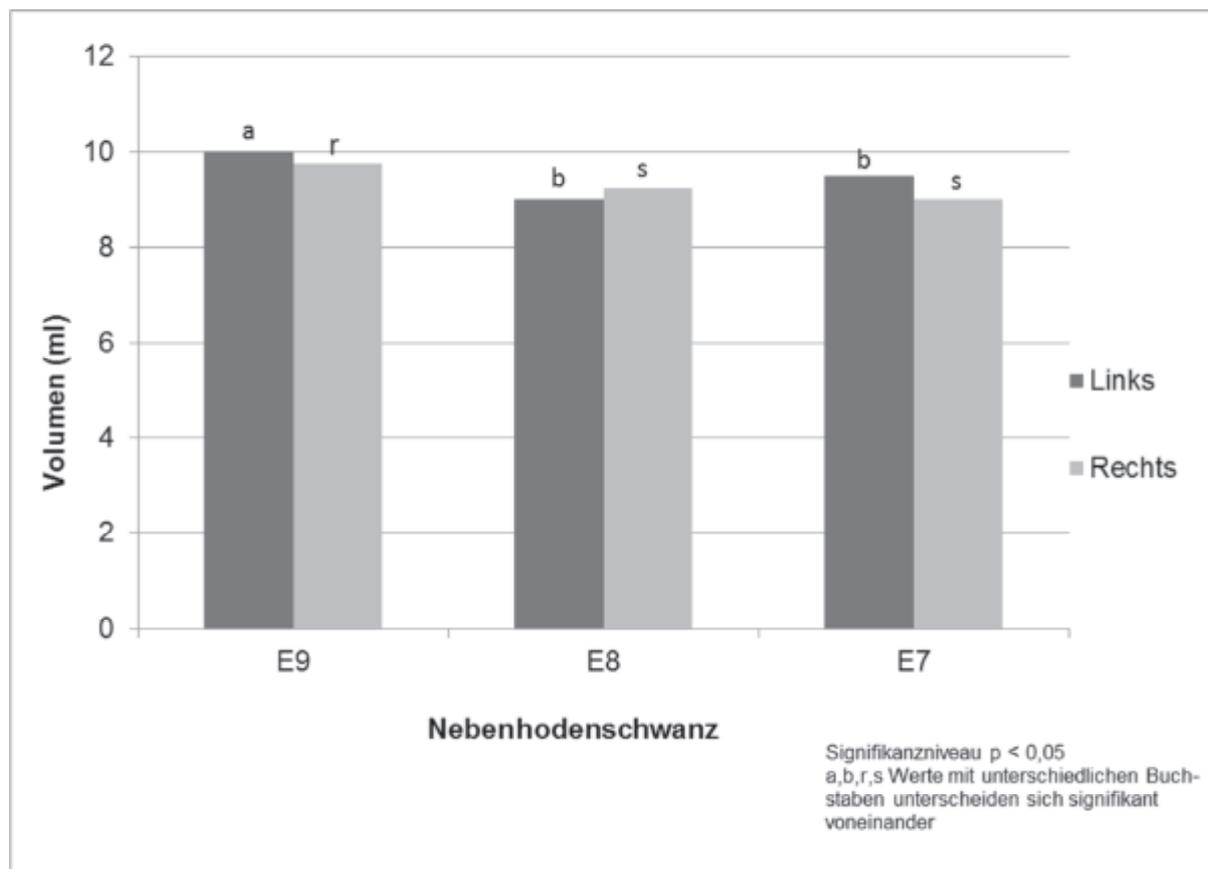
#### **4.3.3 Konsistenz des Nebenhodenschwanzes**

Bei der Palpation zeigten alle Nebenhodenschwänze eine pralle Konsistenz, die Nebenhodengänge waren bei allen Nebenhoden gut fühlbar.

## 4.4 Untersuchung der Nebenhodenspermien

### 4.4.1 Makroskopische Untersuchung der Nebenhodenspülflüssigkeit

Das Volumen der Spülflüssigkeit der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 ist in Abb. 3 dargestellt. Die Medianwerte der linken Nebenhoden lagen für den Abschnitt E9 bei 10 (7,5 – 11,0) ml, für E8 bei 9,0 (7,0 – 9,5) ml und für E7 bei 9,5 (8,0 – 9,5) ml. Die Medianwerte für den rechten Nebenhoden betragen für den Abschnitt E9 9,8 (7,0 – 11,0) ml, für E8 9,3 (8,0 – 9,5) ml und für E7 9,0 (8,0 – 10,0) ml. Im Vergleich der Volumina mit den jeweiligen Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodenschwanzes ergab sich ein signifikanter Unterschied (Links:  $p = 0,0120$ ; Rechts:  $p = 0,0253$ ). Vergleicht man die Abschnitte E9 und E8 sowie E9 und E7 des linken Nebenhodenschwanzes direkt in Bezug auf das Volumen der Spülflüssigkeit hin, so zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0119$  bzw.  $p = 0,0272$ ). Dieses Ergebnis trat ebenfalls beim direkten Vergleich der Volumina von E9 und E8 sowie E9 und E7 des rechten Nebenhodenschwanzes ( $p = 0,0486$  bzw.  $p = 0,0186$ ) auf. In beiden Vergleichen war das Volumen der Spülflüssigkeit von E9 signifikant größer als die Volumina von E8 und E7. Der Vergleich der Volumina von E7 und E8 des linken und rechten Nebenhodenschwanzes untereinander ergab keinen signifikanten Unterschied.



**Abb. 3:** Volumen der Spülflüssigkeit aus den Nebenhodenschwanzabschnitten E7 – E9 im Seitenvergleich

Für das Volumen der Spülflüssigkeit des linken und rechten Nebenhodenschwanzabschnittes E9 und das Nebenhodengewicht sowie -volumen wurde eine mittlere bis starke,

positive Korrelation festgestellt. Bei den Größenparametern Länge, Breite und Höhe des Nebenhodenschwanzes korrelierte die Nebenhodenschwanzhöhe stark positiv mit dem Volumen des linken Abschnitts E9. Es wurde eine mittlere negative Korrelation zwischen der Nebenhodenschwanzhöhe und dem Volumen der Spülflüssigkeit des rechten Abschnittes E9 herausgefunden. Eine mittlere positive Korrelation ergab sich für den Zusammenhang der Nebenhodenschwanzbreite und dem Flüssigkeitsvolumen der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 des rechten Nebenhodens sowie der Abschnitte E8 und E9 des linken Nebenhodens. Es wurde eine negative mittlere Korrelation zwischen Flüssigkeitsvolumen nach Spülung und der Nebenhodenschwanzbreite für den Abschnitt E9 festgestellt. Außerdem wurde ein mittlerer Korrelationskoeffizient für den Bezug von Nebenhodenschwanzumfang und Flüssigkeitsvolumen des linken Abschnitts E9 errechnet. Zwischen dem Nebenhodenschwanzvolumen und dem Volumen der Spülflüssigkeit des linken Abschnitts E9 ergab sich eine positive mittlere Korrelation. Für den rechten Abschnitt E9 ergab sich eine negative mittlere Korrelation (siehe Anhang Tab. 5).

Die bei der makroskopischen Untersuchung der Nebenhodenspülflüssigkeit festgestellte Konsistenz, Farbe und Beimengungen unmittelbar nach der Spülung der Nebenhodenschwanzabschnitte sind in Tab. 6 dargestellt.

**Tab. 6:** Makroskopische Untersuchung der Nebenhodenspülflüssigkeit der Abschnitte E7 – E9

Parameter	E9		E8		E7	
	Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
<b>Farbe</b>						
weiß	9/10	9/10	0/10	0/10	0/10	0/10
weiß-rosa	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10
braun-weiß	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10
grau-weiß	0/10	0/10	7/10	7/10	4/10	7/10
hellgrau	0/10	0/10	1/10	2/10	2/10	2/10
hellbraun	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10
braun-grau	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10
rot-grau	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	1/10
fleischfarben	0/10	0/10	1/10	0/10	2/10	0/10
<b>Konsistenz</b>						
molzig	8/10	8/10	1/10	0/10	1/10	0/10
magermilch	0/10	0/10	4/10	2/10	3/10	0/10
milchig	2/10	2/10	1/10	0/10	1/10	0/10
wässrig	0/10	0/10	4/10	8/10	5/10	10/10
<b>Beimengungen</b>						
keine	10/10	10/10	6/10	7/10	6/10	5/10
ggr. Gewebeflocken	0/10	0/10	3/10	2/10	3/10	4/10
mgr. Gewebeflocken	0/10	0/10	1/10	1/10	1/10	1/10

#### 4.4.2 Dichtebestimmung und Spermigesamtzahl der Spermien der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9

Für die Nebenhodenschwanzabschnitte des linken Nebenhodens ergaben sich die folgenden Medianwerte für die Spermienkonzentration bei der Bestimmung mit dem NucleoCounter® (siehe Abb. 4, Tab. 7) und der Zählkammer (siehe Abb. 5, Tab. 7). Sowohl bei der Bestimmung mit dem NucleoCounter®, als auch mit der Zählkammer konnte ein

hochsignifikanter Unterschied festgestellt werden, wurden die Spermienkonzentrationen mit den verschiedenen Nebenhodenabschnitten E7 – E9 ins Verhältnis gesetzt ( $p = 0,0001$ ). Im direkten Vergleich der Spermienkonzentrationen der Abschnitte E9 und E8 sowie E9 und E7 miteinander, ergab sich ebenfalls eine hohe Signifikanz in deren Unterschied ( $p = 0,0002$ ). Es konnte eine deutliche Zunahme in der Spermienkonzentration von E7 zu E9 festgestellt werden. Die Spermienkonzentration des Nebenhodenschwanzabschnitts E9 war deutlich höher, als die von E7 und E8. Auch der Vergleich der Spermienkonzentrationen von E8 und E7, bestimmt mit dem NucleoCounter®, zeigte einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,0257$ ). Der Unterschied in der Spermienkonzentration von E8 und E7, ermittelt mit der Zählkammer, war ebenfalls signifikant ( $p = 0,0312$ ). Mit beiden Methoden wurde eine höhere Spermienkonzentration in E8 als in E7 nachgewiesen.

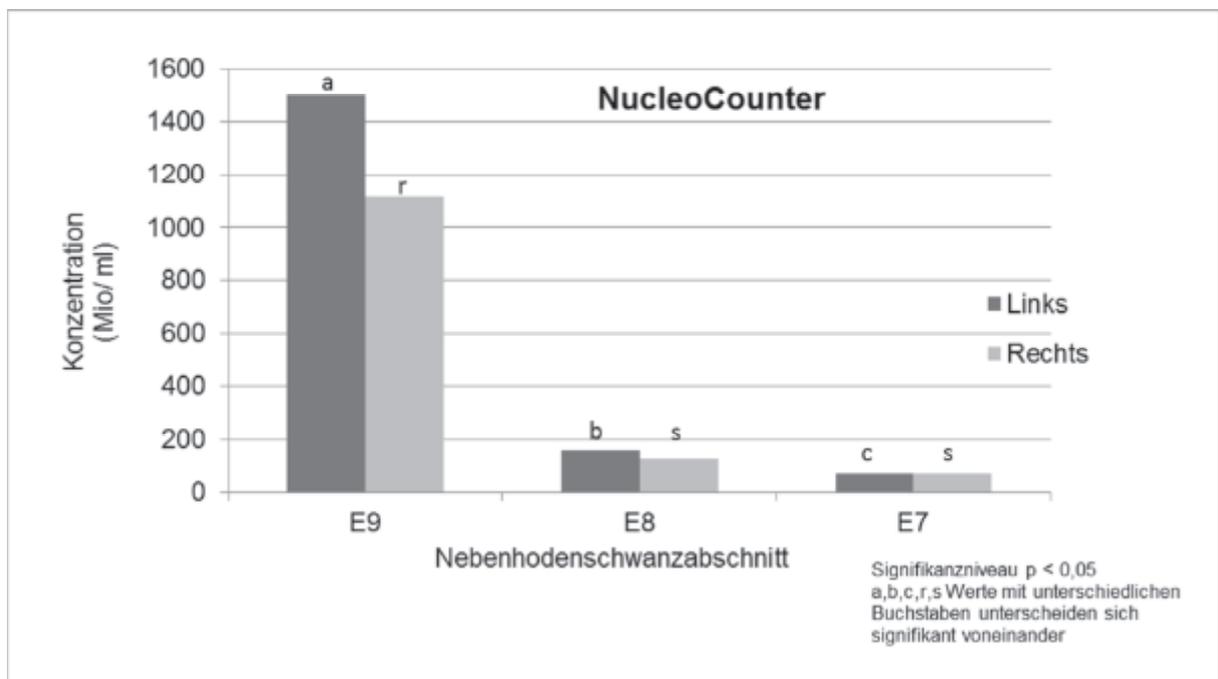
In den rechten Nebenhodenschwanzabschnitten wurden mittels NucleoCounter® und Zählkammer, die in den Abb. 4, 5 und der Tab. 7 dargestellten, Werte ermittelt. Auch bei der Untersuchung der Spermienkonzentration der Abschnitte des rechten Nebenhodenschwanzes konnte, sowohl bei der Bestimmung mit dem NucleoCounter®, als auch mit der Zählkammer ein hochsignifikanter Unterschied bei dem Vergleich der Spermienkonzentration mit den verschiedenen Nebenhodenabschnitten E7 – E9 ( $p < 0,0001$ ) festgestellt werden. Der Vergleich der Spermienkonzentrationen der Abschnitte E9 und E8 sowie E9 und E7, bestimmt mit dem NucleoCounter®, ergab ebenfalls einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,0004$ ;  $p = 0,0003$ ). Wurden die Spermienkonzentrationen der Abschnitte E9 und E8 sowie E9 und E7, bestimmt mit der Zählkammer, direkt miteinander verglichen, so ergab sich ebenfalls eine hohe Signifikanz ( $p = 0,0003$ ;  $p = 0,0002$ ). Die Spermienkonzentration von E9, bestimmt mit beiden Methoden, war viel höher als in den Abschnitten E7 und E8. Der Vergleich der Spermienkonzentrationen von E8 und E7, bestimmt mit dem NucleoCounter®, ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,0756$ ). Der Unterschied in der Spermienkonzentration von E8 und E7, ermittelt mit der Zählkammer, war ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,0757$ ).

**Tab. 7:** Median-, Minimal- und Maximalwerte der Spermienkonzentration, bestimmt mittels NucleoCounter® und Zählkammer in den linken und rechten Nebenhodenabschnitten E7 – E9

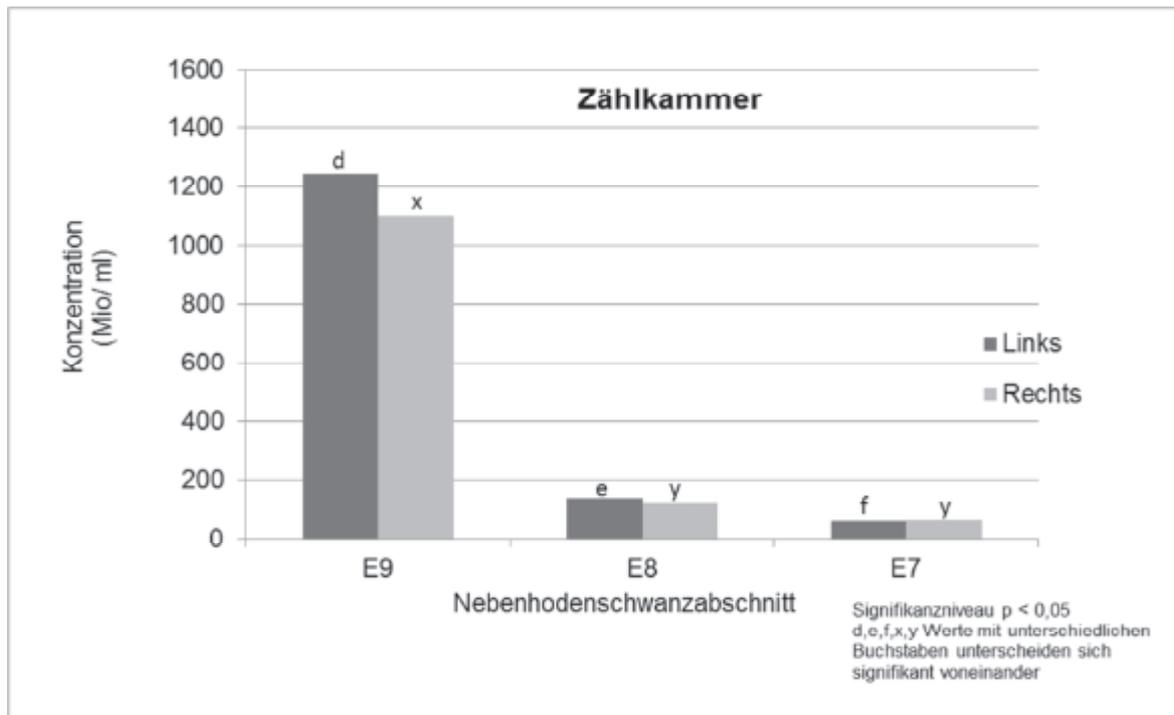
Spermienkonz. (Mio/ml)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
NC	Median	1501 <sup>a</sup>	1115 <sup>r</sup>	158,42 <sup>b</sup>	126,7 <sup>s</sup>	72,46 <sup>c</sup>	70,45 <sup>s</sup>
	Min.	727,8	283,6	51,05	46,43	38,39	20,3
	Max.	1858	1764	382,3	560,9	302,3	345,6
ZK	Median	1244,44 <sup>d</sup>	1100 <sup>x</sup>	123,1 <sup>e</sup>	123,1 <sup>y</sup>	62,61 <sup>f</sup>	65,04 <sup>y</sup>
	Min.	744,44	444,44	51,9	46,48	28,13	17,19
	Max.	1944,44	1733,33	330,8	583,2	252,34	281,25

p < 0,05 ist signifikant.

a,b,c,d,e,f,s,r,x,y: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander.



**Abb. 4:** Spermienkonzentration der Nebenhodenschwanzabschnitte im Vergleich zwischen linkem und rechtem Nebenhoden, bestimmt mit dem NucleoCounter®



**Abb. 5:** Spermienkonzentration der Nebenhodenschwanzabschnitte im Vergleich zwischen linkem und rechtem Nebenhoden, bestimmt mit der Zählkammer

Die Spermienkonzentration wurde für die einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte und die zwei unterschiedlichen Methoden berechnet. Anhand der mit dem NucleoCounter® und der Zählkammer gemessenen Spermienkonzentrationen wurden die Median, Minimal- und Maximalwerte für die Spermienkonzentration in den linken und rechten Nebenhodenschwanzabschnitten berechnet (Abb. 6, 7, Tab. 8). Vergleicht man die Spermienkonzentration mit den linken und rechten Nebenhodenschwanzabschnitten, so konnte man sowohl bei der Bestimmung mit der Zählkammer als auch mit dem NucleoCounter® einen hochsignifikanten Unterschied feststellen ( $p < 0,0001$ ). Die Spermienkonzentration nahm von E7 bis E9 deutlich zu.

Für die Spermienkonzentration, berechnet nach manueller und maschineller Konzentrationsbestimmung, ergab sich bei dem Vergleich von E9 und E7 sowie E9 und E8 der linken Nebenhodenschwanzabschnitte ein hochsignifikanter Unterschied ( $p = 0,0002$ ). Aus dem Abschnitt E9 konnten deutlich mehr Spermien gewonnen werden als aus den Abschnitten E7 und E8. Der Vergleich der Spermienkonzentration, nach Zählkammer- und NucleoCounter®-Bestimmung, von E8 und E7 ergab keinen signifikanten Unterschied. Die Spermienkonzentration beider Abschnitte war vergleichbar. Für die Spermienkonzentration der rechten Nebenhodenschwanzabschnitte wurde im Vergleich von E9 und E8 (Zählkammer:  $p = 0,0003$ , NucleoCounter®:  $p = 0,0008$ ) sowie E9 und E7 (Zählkammer, NucleoCounter®:  $p = 0,0002$ ) bei beiden Methoden ein hochsignifikanter Unterschied festgestellt. Der Vergleich

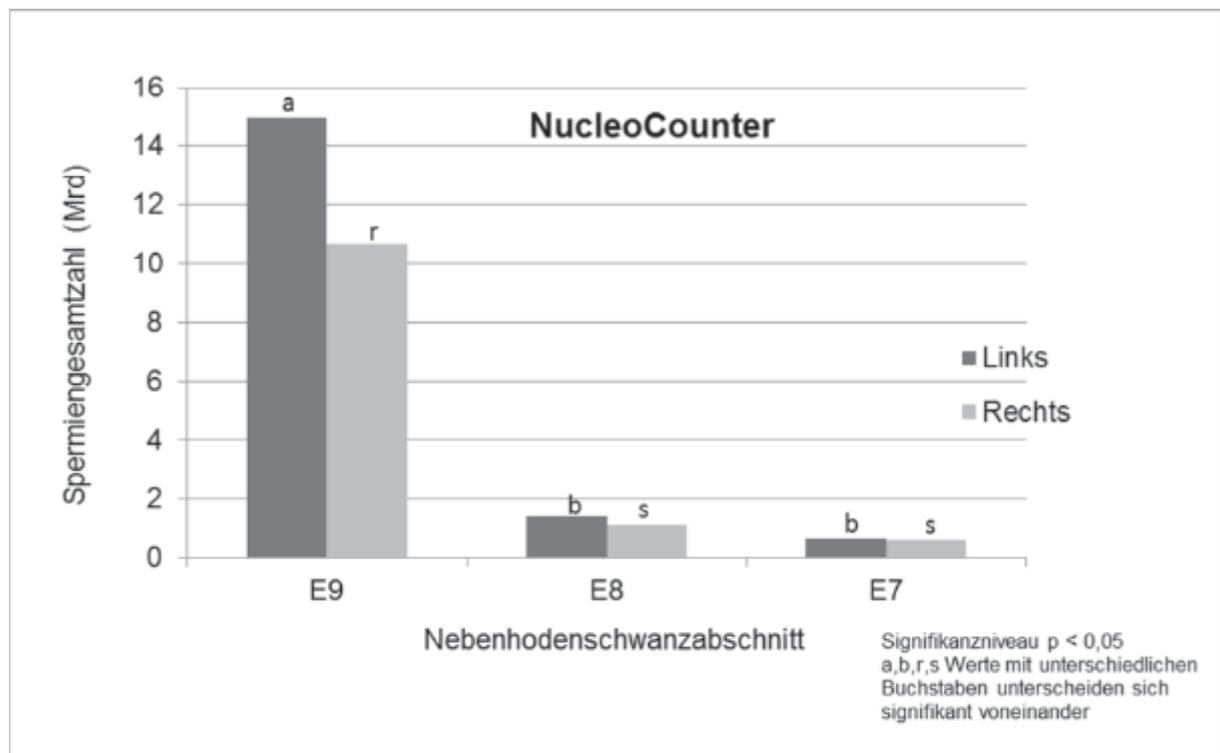
der Spermien Gesamtzahl, nach Zählkammer- und NucleoCounter®-Bestimmung, von E8 und E7 ergab keinen Unterschied.

**Tab. 8:** Median-, Minimal- und Maximalwerte der Spermien Gesamtzahl, bestimmt mittels NucleoCounter® und Zählkammer in den linken und rechten Nebenhodenabschnitten E7 – E9

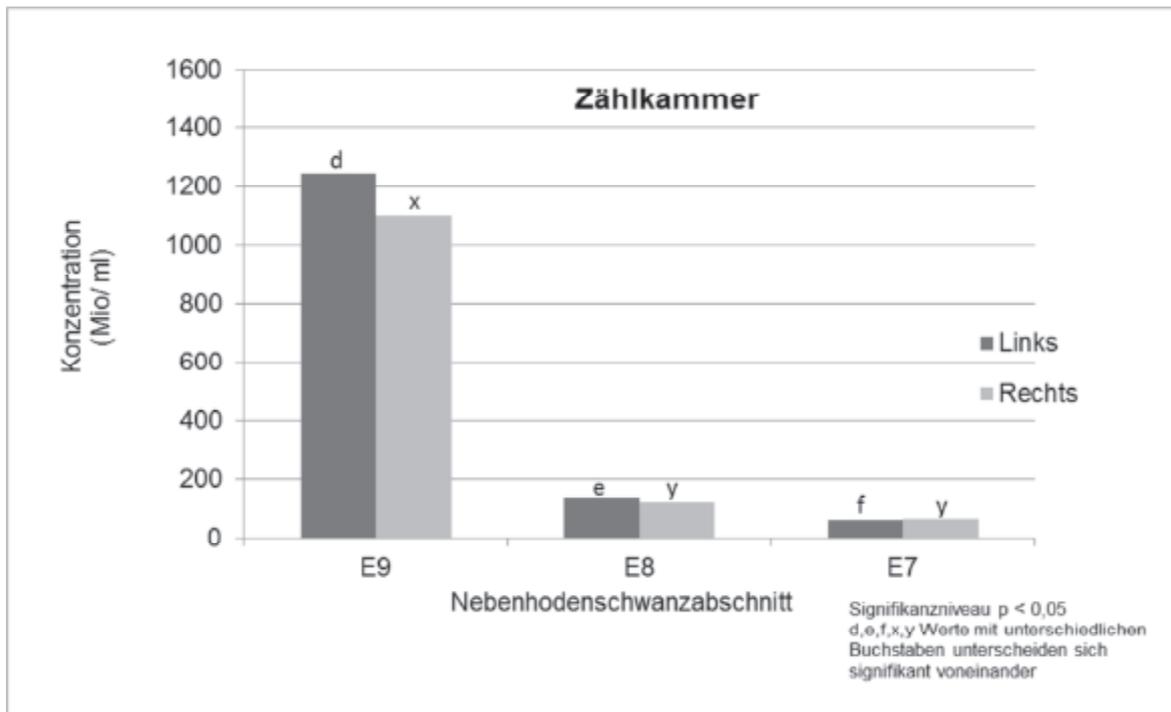
SPGZ. (Mrd)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
NC	Median	14,97 <sup>a</sup>	10,69 <sup>r</sup>	1,39 <sup>b</sup>	1,12 <sup>s</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,60 <sup>s</sup>
	Min.	7,28	1,99	0,46	0,44	0,35	0,18
	Max.	20,02	19,40	3,63	5,33	2,87	3,46
ZK	Median	11,89 <sup>e</sup>	10,72 <sup>x</sup>	1,19 <sup>f</sup>	1,09 <sup>y</sup>	0,59 <sup>f</sup>	0,57 <sup>y</sup>
	Min.	7,44	4,04	0,47	0,44	0,27	0,15
	Max.	20,66	19,07	3,14	5,54	2,40	2,81

p < 0,05 ist signifikant.

a,b,e,f,s,r,x,y: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander.



**Abb. 6:** Spermien Gesamtzahl der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte im Vergleich zwischen linkem und rechtem Nebenhoden, bestimmt mit dem NucleoCounter®

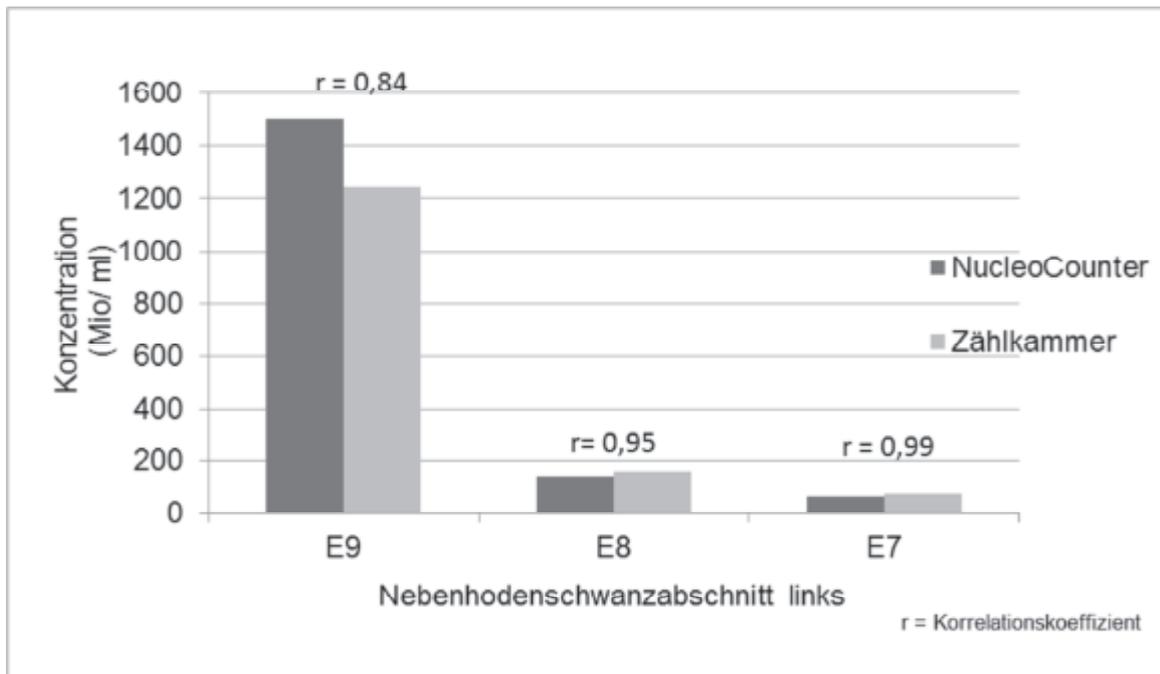


**Abb. 7:** Spermigesamtzahl der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte im Vergleich zwischen linkem und rechtem Nebenhoden, bestimmt mit der Zählkammer

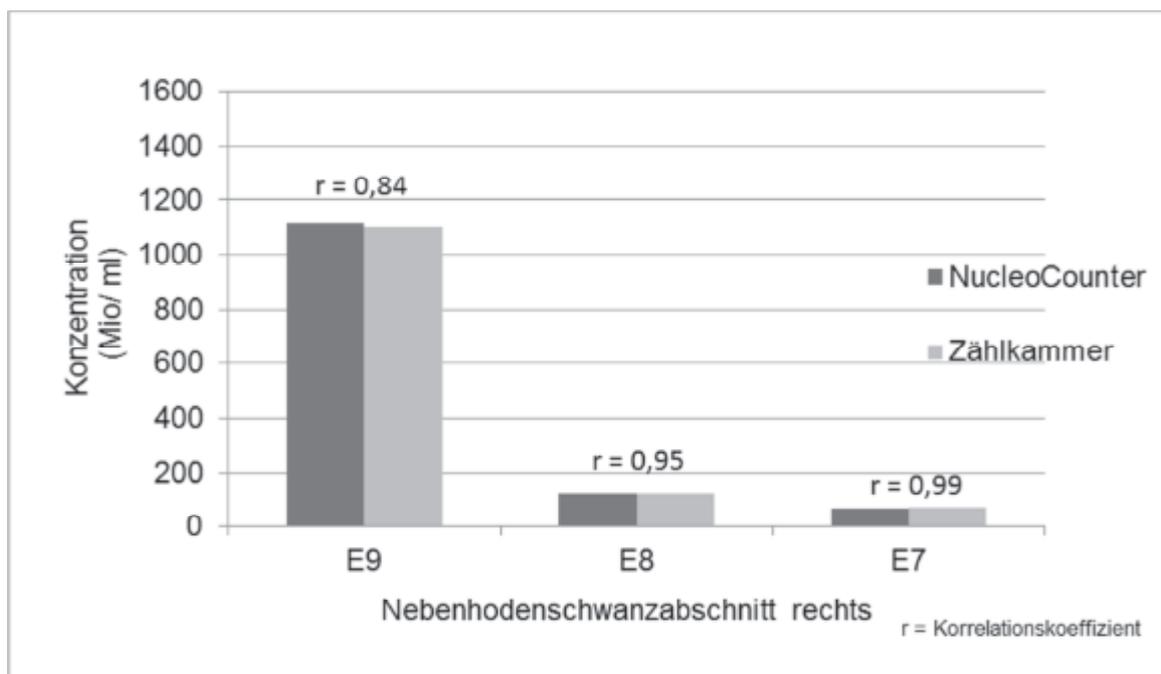
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Spermienkonzentration und Spermigesamtzahl des Abschnitts E9 deutlich höher sind als in den Abschnitten E8 und E7, unabhängig davon mit welcher Methode diese bestimmt wurden.

#### 4.4.2.1 Vergleich der Dichtebestimmung mit der Zählkammer nach BÜRKER-TÜRK und dem NucleoCounter®

Um die Methoden zur Dichtebestimmung zu vergleichen, wurde die Spermienkonzentration in der Spülflüssigkeit der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte jeweils per NucleoCounter® und mit der Zählkammer bestimmt (siehe Abb. 8 und 9). Für die maschinelle und manuelle Dichtebestimmung ergab sich für alle Abschnitte, unabhängig von der Nebenhodenseite, eine starke Korrelation. Für E7 ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,99, für E8 0,95 und für E9 0,84.



**Abb. 8:** Vergleich der Spermienkonzentration der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte des linken Nebenhodens, bestimmt mit der Zählkammer und dem NucleoCounter®



**Abb. 9:** Vergleich der Spermienkonzentration der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte des rechten Nebenhodens, bestimmt mit der Zählkammer nach und dem NucleoCounter®

#### **4.4.2.2 Der Zusammenhang zwischen Gewicht, Volumen und Größe des Nebenhodens bzw. des Nebenhodenschwanzes mit der Spermienkonzentration und Spermiengesamtzahl der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9**

Die Korrelationskoeffizienten für den Zusammenhang zwischen Nebenhodengewicht und -volumen, Nebenhodenschwanzlänge, -breite, -höhe, -umfang und -volumen mit der Spermienkonzentration und -gesamtzahl der Abschnitte E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodenschwanzes werden in Tab. 9 (siehe Anhang) angegeben.

Das Nebenhodengesamtgewicht und -volumen beeinflusst die Spermienkonzentration und -gesamtzahl in allen Nebenhodenschwanzabschnitten nur schwach. Es konnte nur eine sehr schwache bzw. schwache Korrelation zwischen den Merkmalen herausgefunden werden.

Es wurde eine mittlere negative Korrelation zwischen der Nebenhodenschwanzlänge und der Spermienkonzentration und -gesamtzahl im Abschnitt E8 ermittelt. Wohingegen die Nebenhodenschwanzlänge mittel bis stark negativ mit der Spermienkonzentration und -gesamtzahl in Abschnitt E7 des linken Nebenhodenschwanzes korrelierte, allerdings nur schwach mit der des rechten Nebenhodens.

Für die Nebenhodenschwanzbreite ergab sich in den Abschnitten E7 und E8 ein mittlerer bis starker positiver Zusammenhang zu deren Spermienkonzentration und -gesamtzahl. Wurden Spermienkonzentration und -gesamtzahl mit der Nebenhodenschwanzhöhe in Bezug gesetzt, so ergab sich für den linken Abschnitt E7 ein stark positiver, für den rechten Abschnitt E7 ein schwach positiver Korrelationskoeffizient. Für die manuell bestimmte Spermienkonzentration des linken Abschnitts E8 ergab sich eine schwache Korrelation mit der Höhe, für alle anderen Werte ergab sich hier eine starke Korrelation.

Das Nebenhodenschwanzvolumen war stark positiv mit der manuell bestimmten Spermienkonzentration und -gesamtzahl des linken Abschnitts E9 korreliert. Im Vergleich dazu ergab sich eine mittlere negative Korrelation für den Bezug zwischen dem Nebenhodenschwanzvolumen und der Spermienkonzentration sowie -gesamtzahl im rechten Abschnitt E9.

Für die Relation von Nebenhodenschwanzumfang, Spermienkonzentration und -gesamtzahl des linken Nebenhodenschwanzes ergab sich ein starker positiver Zusammenhang. Mit Ausnahme der manuell bestimmten Spermienkonzentration und -gesamtzahl des Abschnitts E9, hier wurde eine schwache Korrelation angegeben. In den Abschnitten des rechten Nebenhodens wurde eine mittlere positive Korrelation für den Zusammenhang zwischen Nebenhodenumfang und Spermienkonzentration sowie -gesamtzahl ermittelt.

#### 4.4.3 pH-Wert

Von jeder Probe wurde der pH-Wert bestimmt (siehe Tab. 10).

**Tab. 10:** pH-Wert der Nebenhodenspülflüssigkeit der Abschnitte E7 – E9

Nebenhodenabschnitt	Links	Rechts
E9	6,85 (6,5 – 7,5)	7,0 (6,5 – 7,0)
E8	7,0 (6,5 – 7,5)	6,6 (6,5 – 7,0)
E7	7,0 (6,5 – 7,2)	6,75 6,5 – 7,2

#### 4.4.4 Agglutination

In nur wenigen Proben wurde eine Agglutination der Spermien gesehen. Keine der Proben aus den rechten Nebenhodenschwänzen wies Agglutinationen auf. In 10 % der Proben der Nebenhodenschwanzsegmente E8 und E7 des linken Nebenhodens wurde eine Spermienagglutination festgestellt.

#### 4.4.5 Fremdzellengehalt

Der Fremdzellengehalt der Nebenhodenspülflüssigkeit wurde bestimmt. Es ergaben sich die, in der Tab. 11 dargestellten, Ergebnisse.

**Tab. 11:** Fremdzellengehalt der Nebenhodenspülflüssigkeit der Abschnitte E7 – E9

Fremdzellengehalt	E9		E8		E7	
	Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
keine Fremdzellen	3/10	1/10	2/10	0/10	0/10	0/10
ggr.	1/10	4/10	3/10	5/10	4/10	5/10
mgr.	2/10	2/10	3/10	3/10	5/10	5/10
nicht ausgewertet	4/10	3/10	2/10	2/10	1/10	0/10

## 4.5 Motilität und Geschwindigkeiten der Nebenhodenspermien der Segmente E7 – E9 vor der Kryokonservierung

### 4.5.1 Motilität der Nebenhodenspermien nach der Verdünnung mit EquiPro™

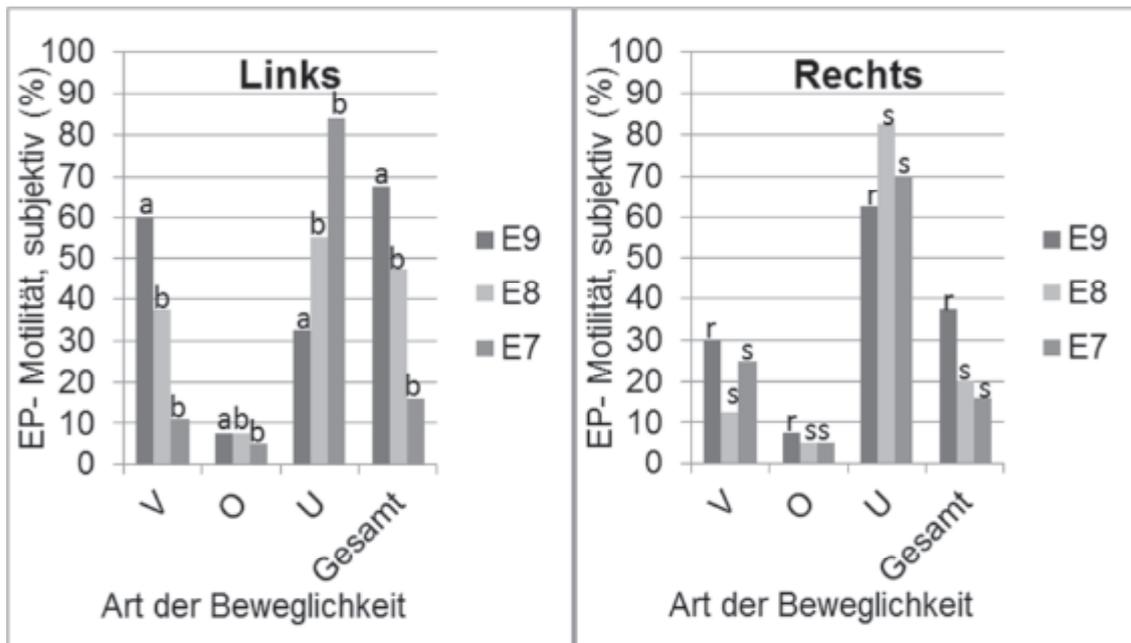
Die höchste Vorwärts- und Gesamtbeweglichkeit wurde für die Spermien des Abschnitts E9 festgestellt, nachfolgend für die von E8 und E7. Es wurde eine höhere Vorwärts- und Gesamtbeweglichkeit bei den Spermien des linken Nebenhodens festgestellt. Im Vergleich der subjektiv bestimmten Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien von E9 und E8 sowie E9 und E7 des linken Nebenhodens, zeigten die Spermien von E9 eine höhere Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit als die Spermien von E7 und E8. Der Unterschied war hochsignifikant ( $p = 0,0007$ ). Auch bei den Spermien des rechten Nebenhodens waren die Spermien von E9 beweglicher als die von E7 und E8. Für die Vorwärtsbeweglichkeit von E9 und E7 konnte ein hochsignifikanter ( $p = 0,0007$ ) und für E9 und E8 ein sehr signifikanter Unterschied ( $p = 0,0019$ ) festgestellt werden. In der Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien von E9 und E8 sowie E9 und E7 wurde ein sehr signifikanter Unterschied erhoben ( $p = 0,0018$  bzw.  $0,0019$ ). Die Beweglichkeit der Spermien von E7 und E8 des linken und rechten Nebenhodens war vergleichbar, es ergab sich kein signifikanter Unterschied. Nach der Verdünnung mit EquiPro™ wurden bei den Spermien des Nebenhodenabschnitts E7 – E9 folgende Motilität als Median-, Minimal- und Maximalwerte in der subjektiven Bestimmung festgestellt (siehe Tab. 12 und Abb. 10).

**Tab. 12:** Subjektiv geschätzte Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 nach Verdünnung mit EquiPro™

Beweglichkeit (EP)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
V (%)	Median	60 <sup>a</sup>	30 <sup>r</sup>	37,5 <sup>b</sup>	12,5 <sup>s</sup>	11 <sup>b</sup>	25 <sup>s</sup>
	Min.	5	1	0	0	2	0
	Max.	80	70	70	80	80	70
O (%)	Median	7,5 <sup>a</sup>	7,5 <sup>r</sup>	7,5 <sup>b</sup>	5 <sup>s</sup>	5 <sup>b</sup>	5 <sup>s</sup>
	Min.	2	1	1	2	2	3
	Max.	30	15	20	10	20	25
Gesamt (%)	Median	67,5 <sup>a</sup>	37,5 <sup>r</sup>	47,5 <sup>b</sup>	20 <sup>s</sup>	16 <sup>b</sup>	32,5 <sup>s</sup>
	Min.	7	2	2	5	6	4
	Max.	85	80	80	85	85	80

$p < 0,05$  ist signifikant.

a,b,r,s: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander.



**Abb. 10:** Subjektiv bestimmte Motilität der, mit EquiPro™ verdünnten, Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9

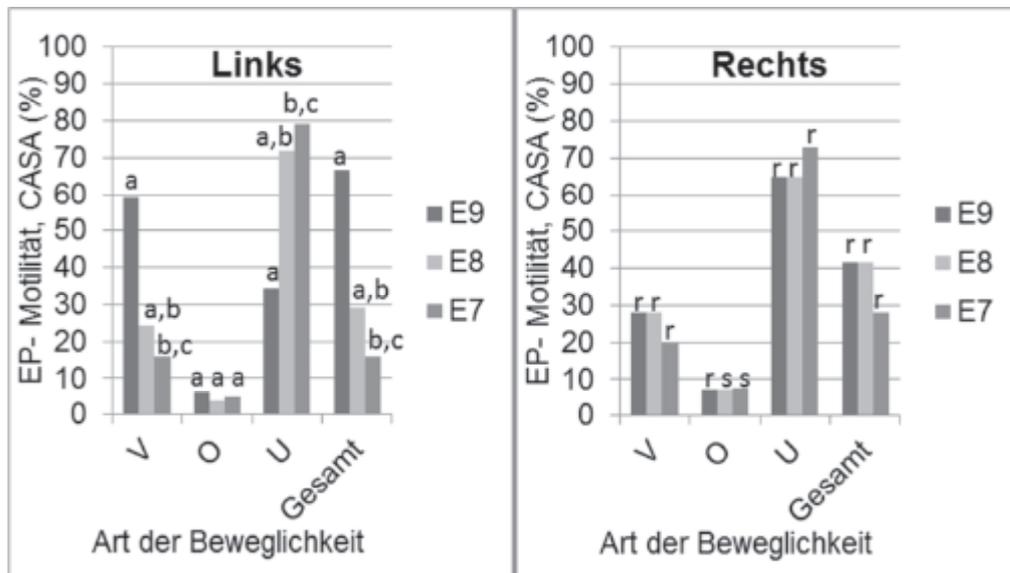
Auch in der objektiven Untersuchung der Beweglichkeit war für die Spermien von E9, gefolgt von denen für E8 und E7, die größte Vorwärts- und Gesamtbeweglichkeit feststellbar. Vergleich man die Vorwärts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien von E9 und E7 des linken Nebenhodens, so konnte ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0376$ ) festgestellt werden. Bei der Untersuchung der Beweglichkeit der Spermien des rechten Nebenhodens lieferte nur der Vergleich der Ortsbeweglichkeit der Spermien von E9 und E8 einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,0376$ ). Die Spermien von E9 zeigten eine höhere Ortsbeweglichkeit. Ebenfalls waren die Spermien des linken Nebenhodens im Vergleich zu denen des rechten Nebenhodens beweglicher. Bei der Bestimmung mit CASA ergaben sich folgende Median-, Minimal- und Maximalwerte für die Beweglichkeit der Spermien der Abschnitte E7 – E9 (siehe Tab. 13 und Abb. 11).

**Tab. 13:** Objektiv bestimmte Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 nach Verdünnung mit EquiPro™

Beweglichkeit (EP)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
V (%)	Median	59,40 <sup>a</sup>	28,15 <sup>r</sup>	24,19 <sup>a,b</sup>	24,18 <sup>r</sup>	16,06 <sup>b,c</sup>	19,65 <sup>r</sup>
	Min.	2,89	0,384	1,41	1,41	1,89	2,15
	Max.	82,69	73,72	78,76	78,76	59,77	67,56
O (%)	Median	6,27 <sup>a</sup>	7,08 <sup>r</sup>	3,84 <sup>a</sup>	3,83 <sup>s</sup>	4,84 <sup>a</sup>	7,50 <sup>r,s</sup>
	Min.	1,34	1,08	2,19	2,19	0,90	2,27
	Max.	11,59	33,14	9,57	9,57	11,54	10,12
Gesamt (%)	Median	66,62 <sup>a</sup>	41,60 <sup>r</sup>	29,13 <sup>a,b</sup>	29,13 <sup>r</sup>	20,95 <sup>b,c</sup>	27,89 <sup>r</sup>
	Min.	4,58	1,46	23,61	3,61	4,56	6,56
	Max.	89,30	81,82	88,33	88,33	71,31	77,69

p < 0,05 ist signifikant.

a,b,c,r,s: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander.



**Abb. 11:** Mittels CASA bestimmte Motilität der, mit EquiPro™ verdünnten, Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9

#### 4.5.2 Geschwindigkeitsparameter und Bewegungsmuster der Nebenhodenspermien nach der Verdünnung mit EquiPro™

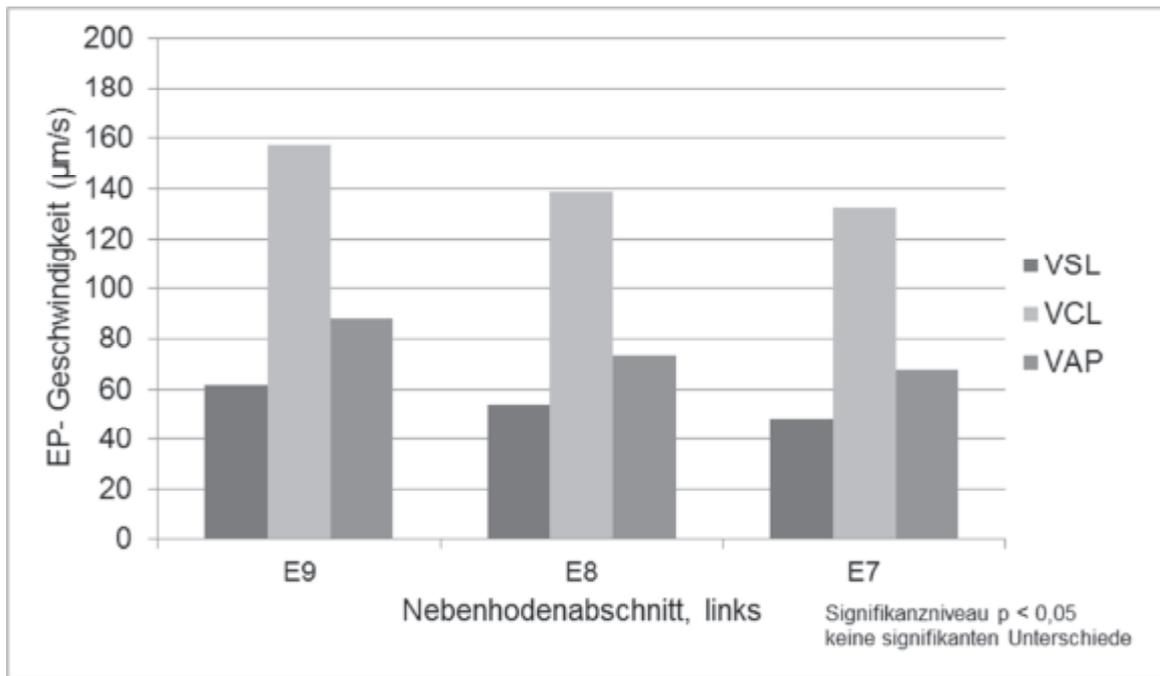
Bei der CASA wurden die Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP der Nebenhodenspermien der Abschnitte E7 – E9 nach der Verdünnung mit EquiPro™ bestimmt. Wie in Abb. 12 – 16 ersichtlich zeigten die Spermien der Abschnitte E7 – E9 ein ähnliches Bewegungsmuster. Es konnten keinerlei Unterschiede in den Geschwindigkeitsparametern und Bewegungsmustern der Spermien von E9, E8 und E7 des linken und rechten Nebenhodens festgestellt werden. Tab. 14 und Abb. 12 – 16 zeigen die Medianwerte, Minimal- und Maximalwerte der CASA-Parameter VSL, VCL, VAP, LIN, STR, WOB und ALH.

**Tab. 14:** Median- Minimal- und Maximalwerte der VSL, VCL, VAP, LIN, STR, WOB und ALH der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9 nach der Verdünnung mit EquiPro™

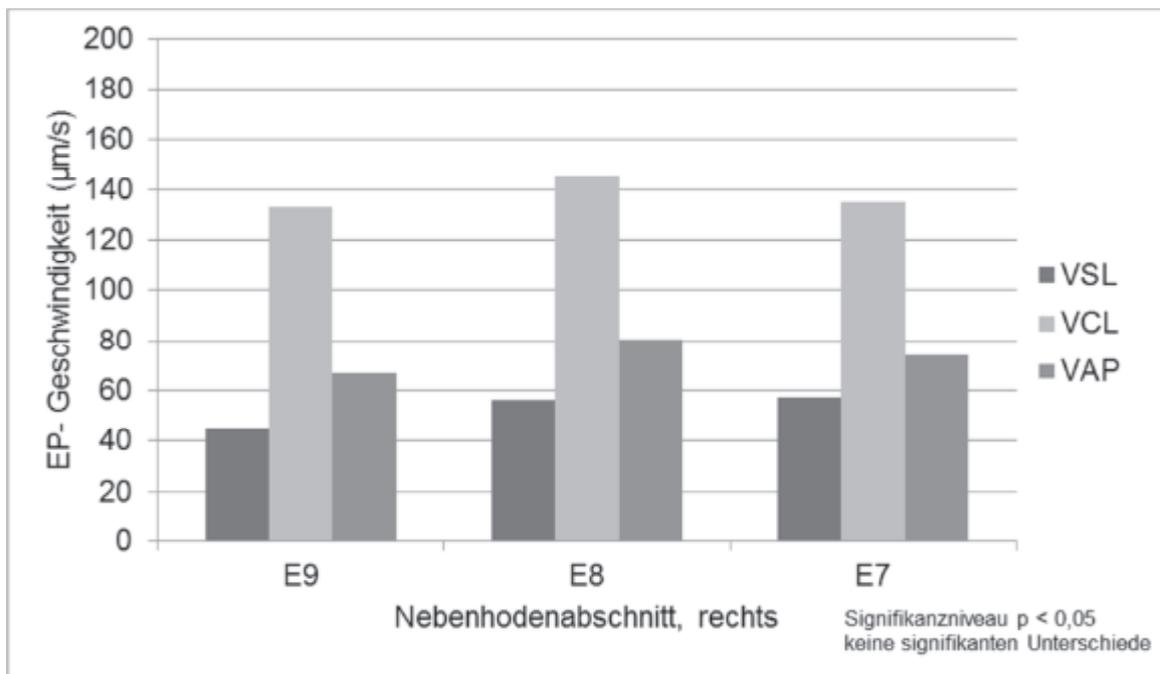
CASA-Parameter (EP)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
VSL (µm/s)	Median	61,70	44,91	53,75	56,44	48,16	57,05
	Min.	24,53	22,68	11,85	32,58	26,29	16,10
	Max.	64,58	63,42	70,33	67,15	63,97	64,18
VCL (µm/s)	Median	157,51	133,11	138,56	145,55	132,52	135,15
	Min.	75,39	52,46	34,73	72,39	63,50	42,24
	Max.	175,49	174,91	185,78	166,50	149,11	182,07
VAP (µm/s)	Median	87,87	66,83	73,33	80,68	67,90	73,96
	Min.	36,36	34,51	15,98	41,06	34,60	27,19
	Max.	94,65	91,49	100,48	86,49	81,06	91,67
LIN	Median	0,37	0,36	0,40	0,39	0,37	0,37
	Min.	0,30	0,21	0,1	0,31	0,31	0,11
	Max.	0,42	0,45	0,45	0,45	0,47	0,52
STR	Median	0,70	0,69	0,72	0,72	0,69	0,72
	Min.	0,6	0,38	0,21	0,54	0,53	0,18
	Max.	0,74	0,72	0,77	0,82	0,82	0,80
WOB	Median	0,54	0,52	0,54	0,54	0,53	0,52
	Min.	0,50	0,35	0,13	0,40	0,40	0,20
	Max.	0,58	0,66	0,58	0,60	0,57	0,67
ALH (Hz)	Median	3,92	3,59	3,49	3,56	3,26	3,45
	Min.	1,86	1,86	0,69	1,91	1,71	1,25
	Max.	4,43	4,47	4,51	4	4,03	4,46

p < 0,05 ist signifikant.

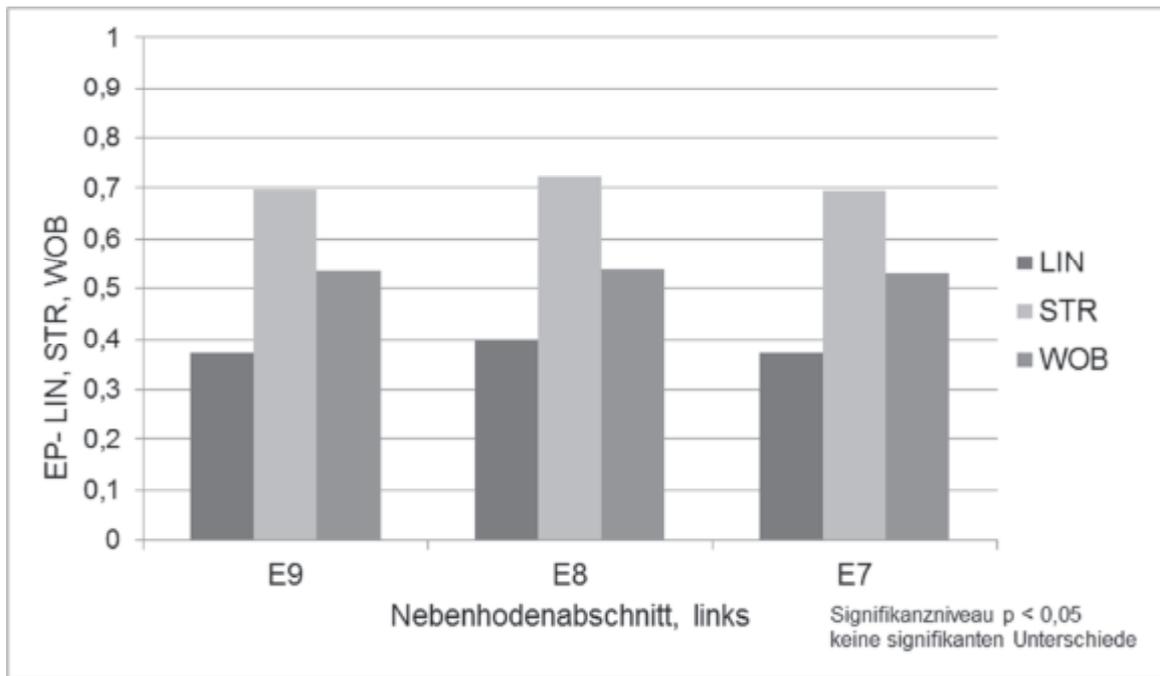
Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Geschwindigkeitsparametern und Bewegungsmustern der Spermien von E7 bis E9 des linken und rechten Nebenhodens nach Verdünnung mit EquiPro™ festgestellt.



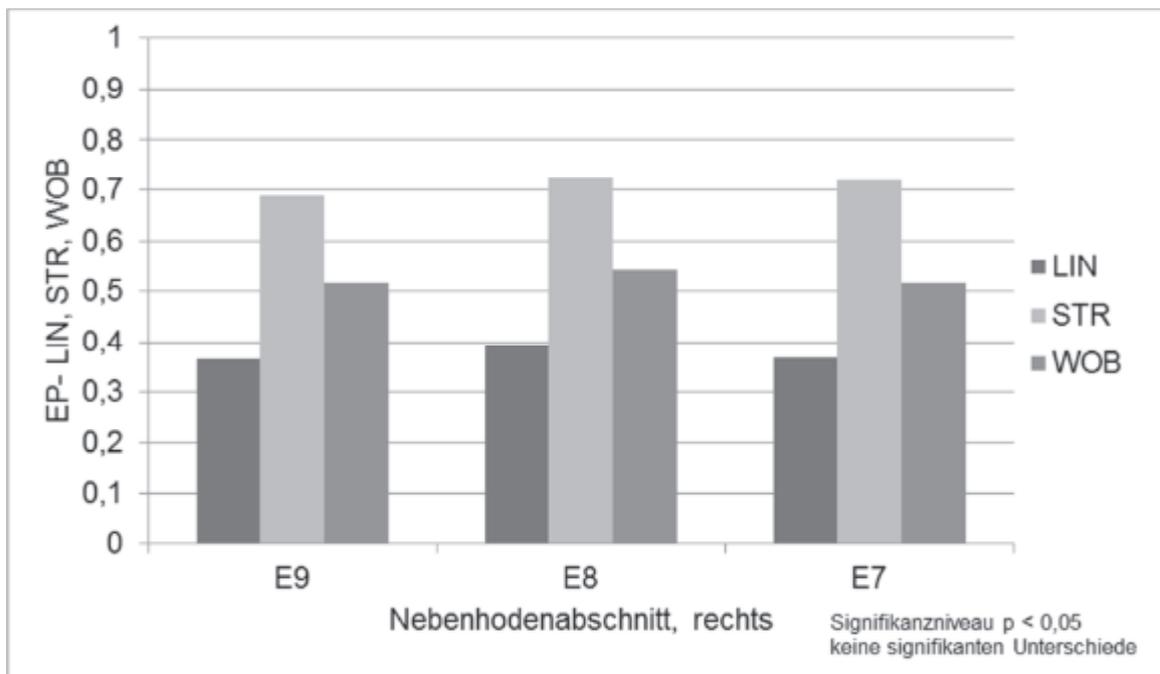
**Abb. 12:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP der Spermien von E7 – E9 des linken Nebenhodens nach der Verdünnung mit EquiPro™



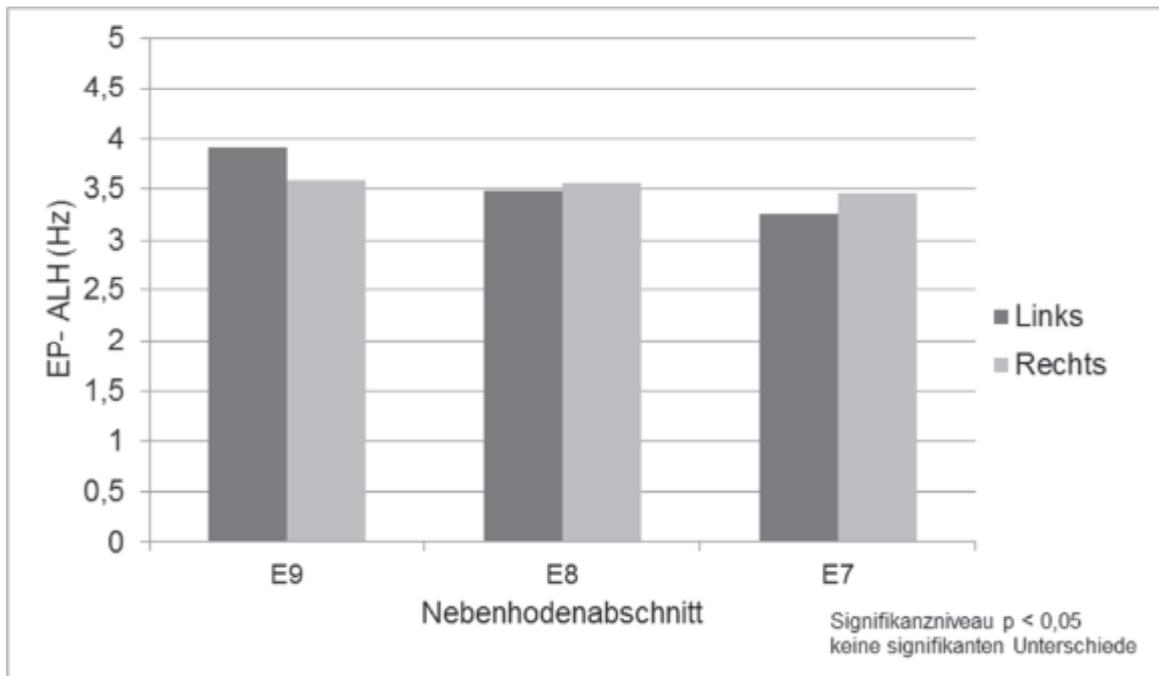
**Abb. 13:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP der Spermien von E7 – E9 des rechten Nebenhodens nach der Verdünnung mit EquiPro™



**Abb. 14:** LIN, STR und WOB der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens nach Verdünnung EquiPro™



**Abb. 15:** LIN, STR und WOB der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens nach Verdünnung mit EquiPro™



**Abb. 16:** ALH der Spermien der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich nach Verdünnung mit EquiPro™

#### 4.5.3 Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach der Lagerung bei +4 °C (Haltetest)

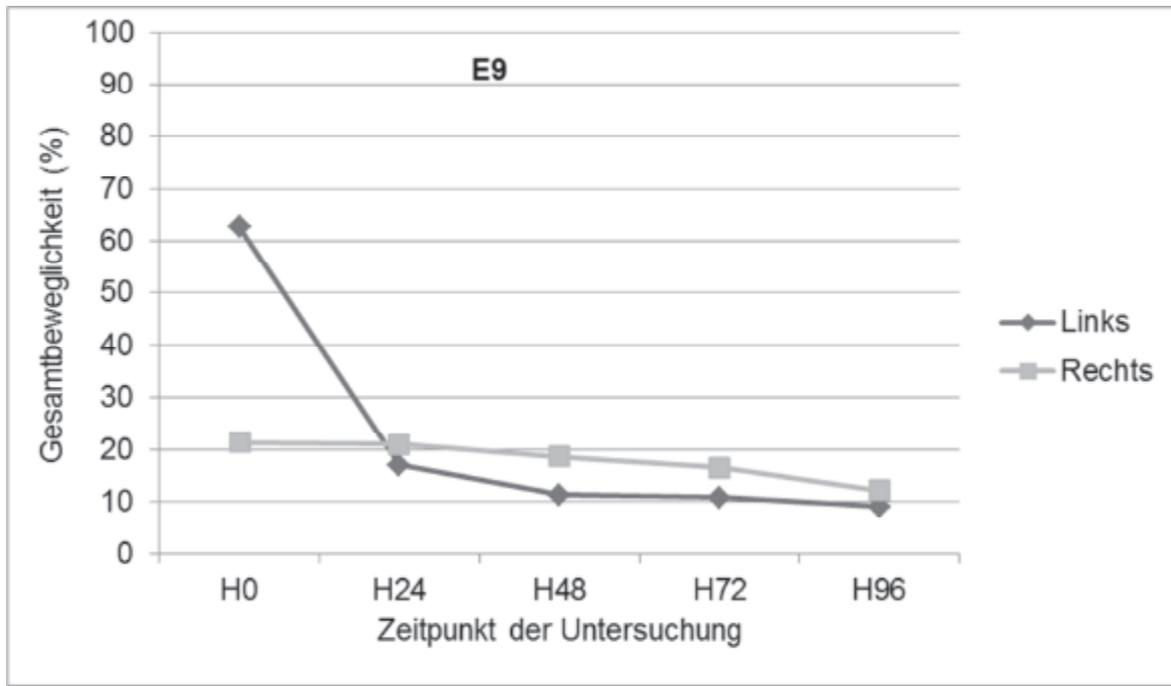
Die Haltbarkeit der Spermien wurde mittels subjektiver Schätzung und objektiver Bestimmung der Beweglichkeit mit CASA ermittelt. Die Beweglichkeit wurde direkt nach der Verdünnung mit EquiPro™, nach 24, 48, 72 und 96 Stunden Kühlung bestimmt.

Die Spermien von E9 des linken Nebenhodens zeigten die höchste Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit von den Abschnitten E7 – E9 zum Zeitpunkt 0. Es wurde ein signifikanter Unterschied in der Gesamtbeweglichkeit der Spermien zum Zeitpunkt 0 zwischen den Abschnitten E9 und E8 sowie E9 und E7 festgestellt ( $p = 0,0452$  bzw.  $0,0257$ ). Auch die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien unterschied sich zwischen den Abschnitten E9 und E7 signifikant ( $p = 0,0452$ ).

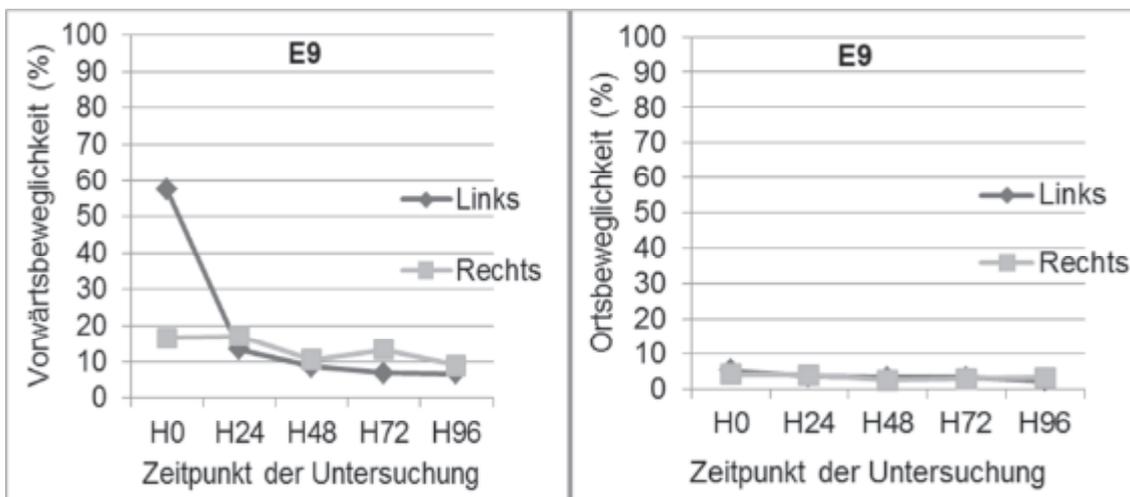
Es erfolgte eine starke Reduktion der Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit innerhalb der ersten 24 Stunden. Die Ortsbeweglichkeit der Spermien von E9 und E7 unterschied sich nach 24 Stunden signifikant voneinander ( $p = 0,0312$ ), die Spermien von E9 zeigten eine höhere Ortsbeweglichkeit als die von E7.

Nach 48, 72 und 96 Stunden blieben Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit auf einem konstant niedrigen Niveau. Die Spermien von E9 zeigten nach 48 Stunden eine höhere Ortsbeweglichkeit als die von E7 und E8, der Unterschied war signifikant ( $p = 0,0376$  bzw.  $0,0312$ ). Die anfängliche Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien von E9 des rechten Nebenhodens waren deutlich niedriger als die des linken Nebenhodens, der Wert blieb über die Stunden (24, 48, 72, 96) aber konstant. Die Ortsbeweglichkeit betrug über die gesamte Zeit ein gleichmäßig niedriges Niveau (siehe Abb. 17 und 18).

Nach 24 Stunden wurde ein signifikanter Unterschied in der Ortsbeweglichkeit zwischen den Spermien von E9 und E7 ( $p = 0,0211$ ) festgestellt. Die Median-, Minimal- und Maximalwerte der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien des Abschnittes E9 des linken und rechten Nebenhodenschwanzes nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden werden in der Tab. 15 angegeben.



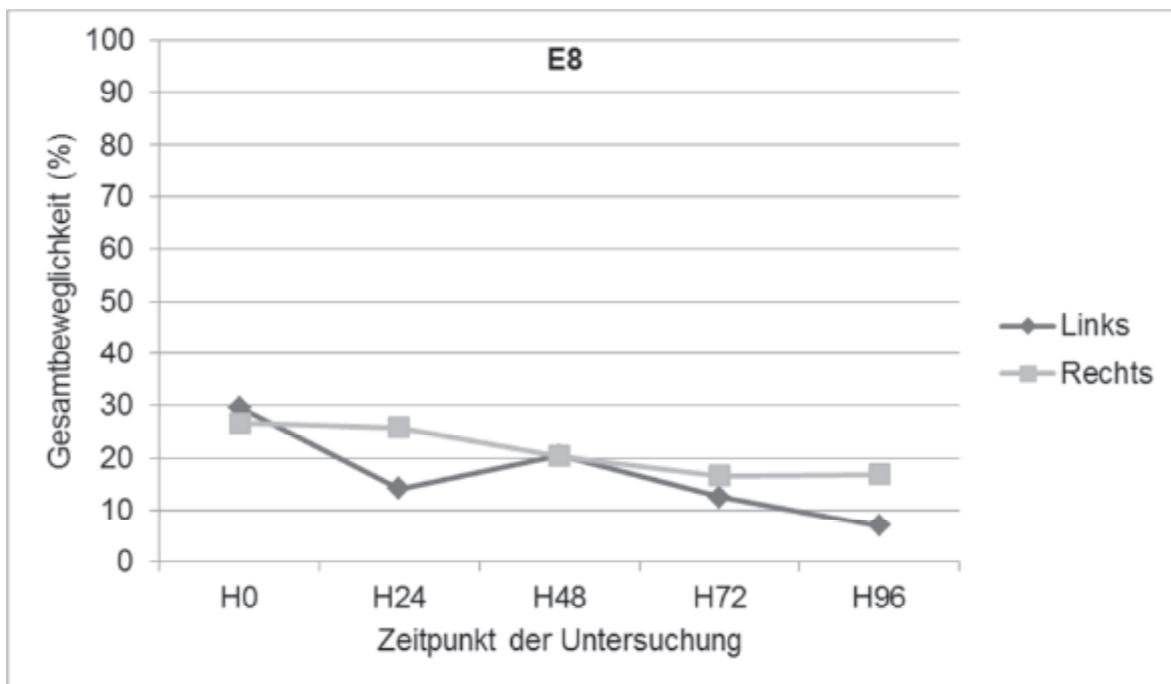
**Abb. 17:** Gesamtbeweglichkeit (%) der Spermien des linken und rechten Abschnitts E9 direkt, nach 24, 48, 72 und 96 Stunden.



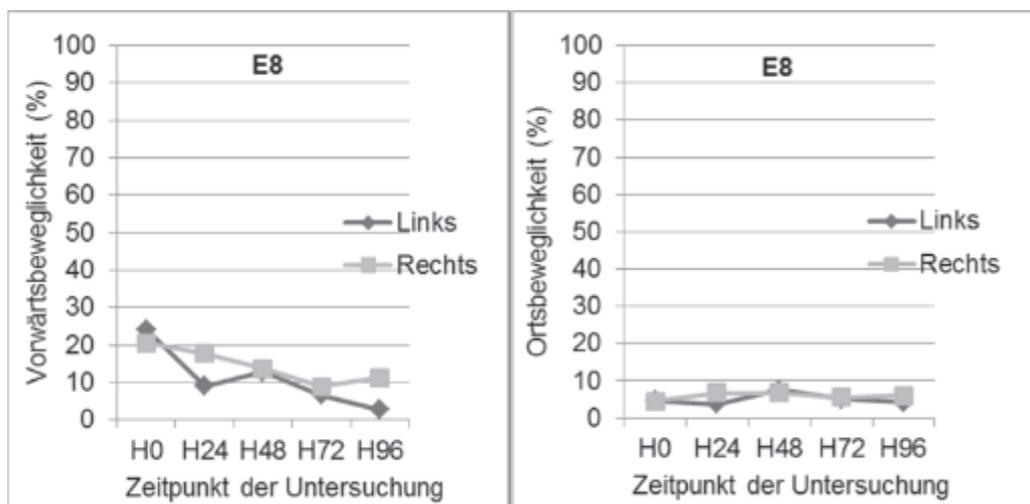
**Abb. 18:** Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit (%) der Spermien des Abschnitts E9 nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden

Insgesamt waren Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien von E8 beider Nebenhoden geringer als die von E9. Die Spermien des linken und rechten Nebenhodens waren ähnlich beweglich. Die Reduktion innerhalb der ersten 24 Stunden zeigte sich nicht so drastisch wie bei E9 und war nur bei den Spermien des linken Nebenhodens zu verzeichnen.

Bei den Spermien von E8 des rechten Nebenhodens war eine sukzessive, leichte Reduktion beider Werte in dem Zeitraum von 24 bis 96 Stunden zu vermerken. Bei den Spermien des linken Nebenhodens zeigte sich ein geringer Anstieg der Gesamtbeweglichkeit nach 48 Stunden. Die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien des rechten Abschnitts E8 erhöhte sich nach 96 Stunden nochmal geringgradig im Vergleich zu dem Wert nach 72 Stunden (siehe Abb. 19 und 20). Die Median-, Minimal- und Maximalwerte der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien des Abschnitts E8 des linken und rechten Nebenhodenschwanzes nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden werden in der Tab. 15 angegeben.

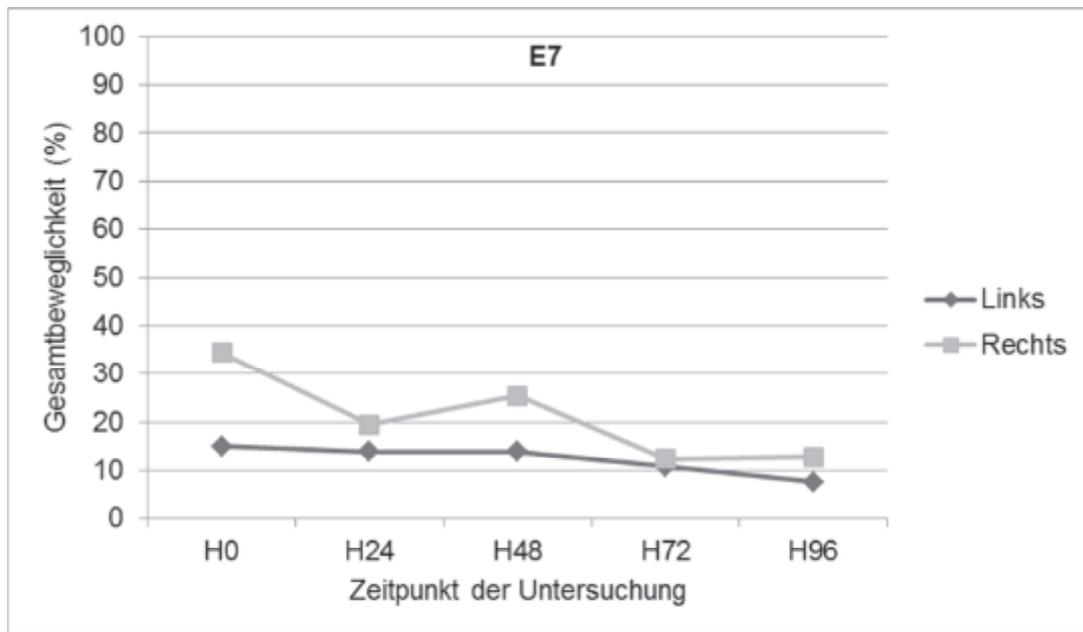


**Abb. 19:** Gesamtbeweglichkeit (%) der Spermien des linken und rechten Abschnitts E8 direkt nach Gewinnung, nach 24, 48, 72 und 96 Stunden

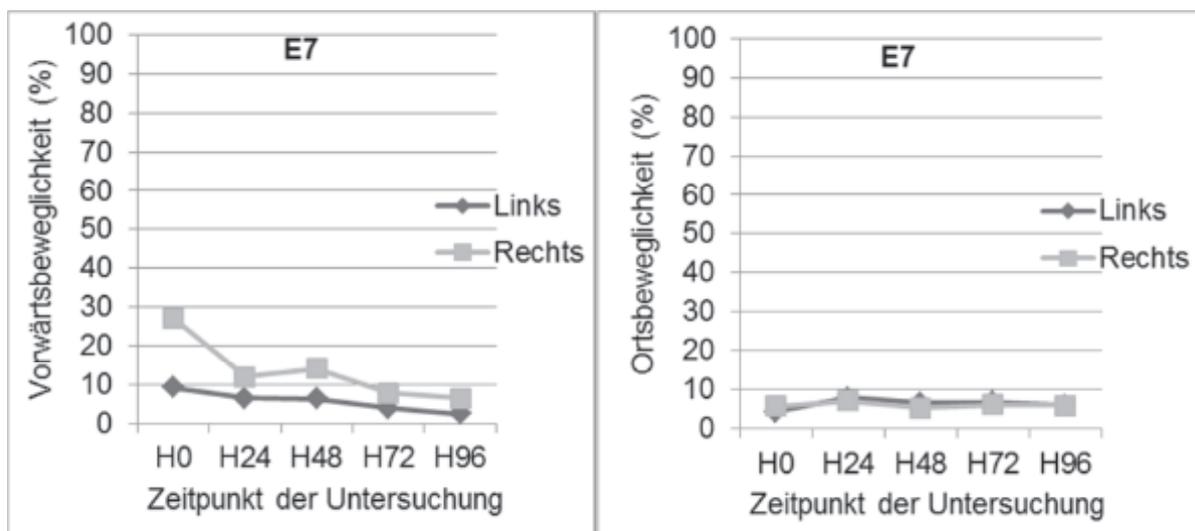


**Abb. 20:** Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit (%) der Spermien des Abschnitts E8 nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden

Die Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit von E7 war in beiden Nebenhoden geringer, als die von E8. Sowohl Gesamt- als auch Vorwärtsbeweglichkeit waren bei den Spermien des rechten Nebenhodens größer als bei denen des Linken. Die Spermien des rechten Nebenhodens zeigten einen deutlichen Abfall der Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit nach 24 Stunden und einen leichten Anstieg beider Werte nach 48 Stunden. Die Werte der Spermien des linken Nebenhodens zeigten ein stetiges, leichtes Absinken mit der Zeit (siehe Abb. 21 und 22). Die Median-, Minimal- und Maximalwerte der Vorwärts- Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien des Abschnittes E7 des linken und rechten Nebenhodenschwanzes nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden werden in der Tab. 15 angegeben.



**Abb. 21:** Gesamtbeweglichkeit (%) der Spermien des linken und rechten Abschnitts E7 direkt, nach 24, 48, 72 und 96 Stunden



**Abb. 22:** Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit (%) der Spermien des Abschnitts E7 nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden

**Tab. 15:** Median-, Minimal- und Maximalwerte der Gesamt-, Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens nach 0, 24, 48, 72, und 96 Stunden bei +4 °C

Beweglichkeit (Haltetest)				Zeitpunkt				
				H0	H24	H48	H72	H96
<b>E9</b>	Gesamt (%)	Li	Median	62,62	17,01	11,24	10,74	9,06
			Min.	2,78	1,17	1,40	2,01	1,84
			Max.	90,04	49,94	87,63	31,36	39,27
		Re	Median	21,32	20,88	18,58	16,47	12,13
			Min.	1,46	1,51	2,98	1,81	0,83
			Max.	73,31	62,15	41,12	39,58	27,08
	V (%)	Li	Median	57,54	13,25	8,58	6,89	6,70
			Min.	0,58	0,16	0	0	0,12
			Max.	87,50	45,76	19,68	6,89	29,25
		Re	Median	16,68	17,06	10,54	13,32	8,97
			Min.	0,22	0,25	0,31	0,07	0
			Max.	65,51	58,17	33,31	33,69	22,14
	O (%)	Li	Median	5,28	3,74	33,31	3,29	2,40
			Min.	2,20	1,01	1,40	0,59	0,96
			Max.	10,44	7,91	67,95	7,02	18,43
		Re	Median	4,20	4,04	2,67	3,04	3,37
			Min.	1,17	1,25	1,40	1,61	0,83
			Max.	7,81	7,35	10,16	7,25	5,07

**Tab. 15:** Fortsetzung

<b>E8</b>	Gesamt (%)	Li	Median	29,61	14,16	20,44	12,59	7,02
			Min.	2,96	3,68	4,04	5,18	2,12
			Max.	86,45	36,75	39,78	33,62	33,12
		Re	Median	26,70	25,84	20,36	16,66	16,85
			Min.	2,76	5,17	3,84	3,81	4,06
			Max.	72,25	67,81	65,87	56,74	33,16
	V (%)	Li	Median	24,24	9,01	12,71	6,65	2,67
			Min.	1,12	2,15	0,82	0,98	0,09
			Max.	81,67	29,95	29,71	25,89	21,16
		Re	Median	20,61	17,69	13,74	8,85	11,23
			Min.	1,10	2,05	1,16	0,96	0,29
			Max.	63,97	59,53	55,49	46,20	25,38
O (%)	Li	Median	4,68	3,68	7,43	5,10	4,14	
		Min.	1,80	1,24	3,16	1,08	1,45	
		Max.	6,43	10,68	13,22	10,31	16,61	
	Re	Median	4,54	6,72	6,71	5,56	5,93	
		Min.	1,66	2,5	2,68	2,85	1,90	
		Max.	12,20	13,42	13,50	10,54	10,82	
<b>E7</b>	Gesamt (%)	Li	Median	15,04	13,96	13,94	10,82	7,56
			Min.	1,70	4,5	3,10	2,13	3,80
			Max.	67,87	40,87	44,58	29,94	23,09
		Re	Median	34,47	19,49	25,47	12,41	12,78
			Min.	5,37	6,60	4,86	5,11	4,13
			Max.	70,51	53,61	64,12	56,04	47,76
	V (%)	Li	Median	9,24	6,43	6,38	3,87	2,43
			Min.	1,72	1,16	0,92	0	0
			Max.	63,63	31,19	33,54	20,26	7,81
		Re	Median	27,14	11,93	14,08	7,79	6,41
			Min.	1,32	2,18	0,42	0,91	0
			Max.	61,99	42,31	52,56	40,91	36,3
	O (%)	Li	Median	4,40	7,88	6,57	6,81	6,04
			Min.	0	2,79	2,17	2,13	2,43
			Max.	9,03	13,34	12,36	14,02	15,29
		Re	Median	5,85	7,16	5,31	6,19	6,13
			Min.	2,55	1,97	2,83	3,19	3,22
			Max.	8,54	13,25	18,14	15,13	13,66

#### 4.5.4 Motilität der Nebenhodenspermien mit Gent-Verdünner

Bei Verdünnung mit dem Gent-Verdünner zeigten die Spermien von E9 vor den Spermien von E8 und E7 die höchste Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit. Die Spermien des linken Nebenhodens waren im Nebenhodenabschnitt E9 beweglicher als die des Rechten. Die Unterschiede in der subjektiv bestimmten Beweglichkeit zwischen den Abschnitten E7 – E9 waren allesamt nicht signifikant. Bei den Spermien von E8 und E7 waren die Spermien des rechten Nebenhodens beweglicher. Für die subjektive geschätzte Beweglichkeit der Spermien der Abschnitte E7 – E9 werden die Median- sowie die Minimal- und Maximalwerte angegeben (siehe Tab. 16).

**Tab. 16:** Subjektiv geschätzte Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 nach Verdünnung mit Gent-Verdünner

Beweglichkeit (Gent)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
V (%)	Median	40	32,5	37,5	65	15	37,5
	Min.	2	2	4	2	2	2
	Max.	85	70	80	80	80	80
O (%)	Median	10	7,5	5	7,5	5	5
	Min.	5	2	4	5	3	2
	Max.	20	20	20	15	20	25
Gesamt (%)	Median	45	55	50	30	75	47,5
	Min.	10	20	15	10	15	15
	Max.	93	96	92	93	95	96

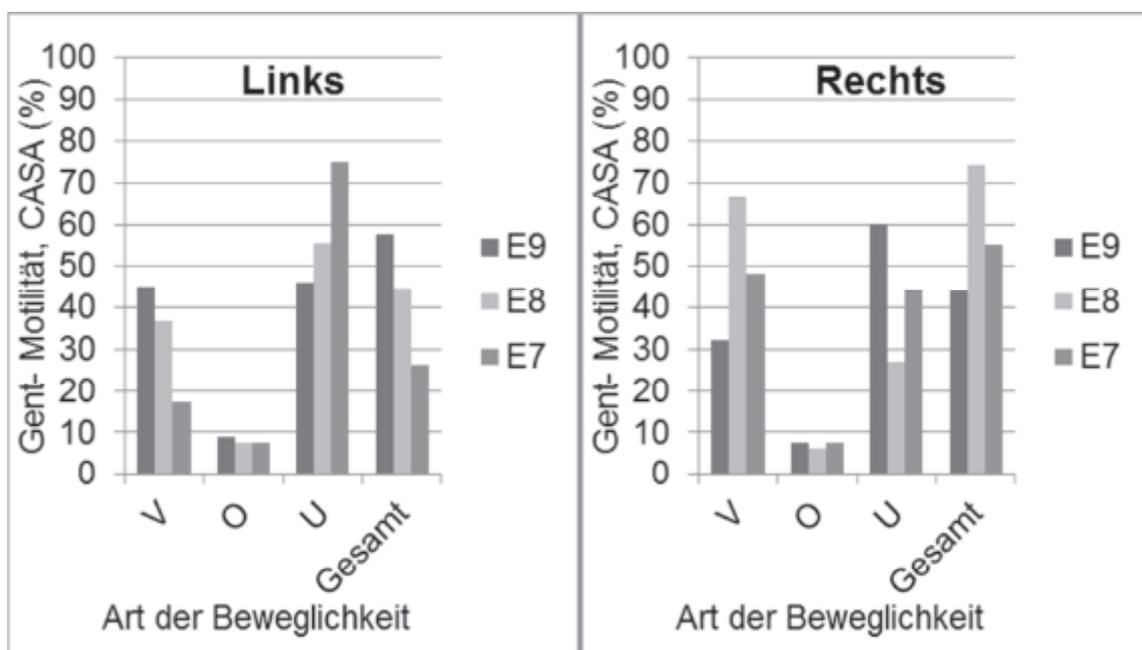
Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der, subjektiv bestimmten, Motilität der Spermien von E7 bis E9 des linken und rechten Nebenhodens nach Verdünnung mit Gent-Verdünner festgestellt.

Nach der Verdünnung mit Gent-Verdünner wurde die Motilität objektiv mittels CASA bestimmt. In der Untersuchung der Spermien von E7 – E9 des linken Nebenhodens ist die höchste Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit für E9, gefolgt von E8 und E7, zu verzeichnen. Bei der Analyse der Spermien des rechten Nebenhodens zeigten die Spermien von E8 vor den Spermien von E7 und E9 die höchste Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit. Die Unterschiede in der Beweglichkeit der Spermien zwischen den Abschnitten des linken und rechten Nebenhodens waren nicht signifikant (siehe Abb. 23). Für die objektiv bestimmte Beweglichkeit der Spermien der Abschnitte E7 – E9 werden die Median- sowie die Minimal- und Maximalwerte angegeben (siehe Tab. 17).

**Tab. 17:** Objektiv bestimmte Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 nach Verdünnung mit Gent-Verdünner

Beweglichkeit (Gent)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
V (%)	Median	45,06	32,32	36,75	66,53	17,26	48,07
	Min.	1,011	0,77	3,82	1,51	2,67	0,43
	Max.	82,84	67,19	71,04	17,89	83,34	81,15
O (%)	Median	8,78	7,71	7,59	6,31	7,67	7,71
	Min.	2,98	4,21	1,1	1,51	1,63	2,01
	Max.	17,13	17,40	13,49	17,89	17,91	9,70
Gesamt (%)	Median	57,70	44,13	44,78	74,30	26,32	55,15
	Min.	6,15	5,82	8,45	6,04	6,16	2,67
	Max.	85,82	79,1	79,79	86,36	87,6	89,66

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der objektiv bestimmten Motilität der Spermien von E7 bis E9 des linken und rechten Nebenhodens nach Verdünnung mit Gent-Verdünner festgestellt.



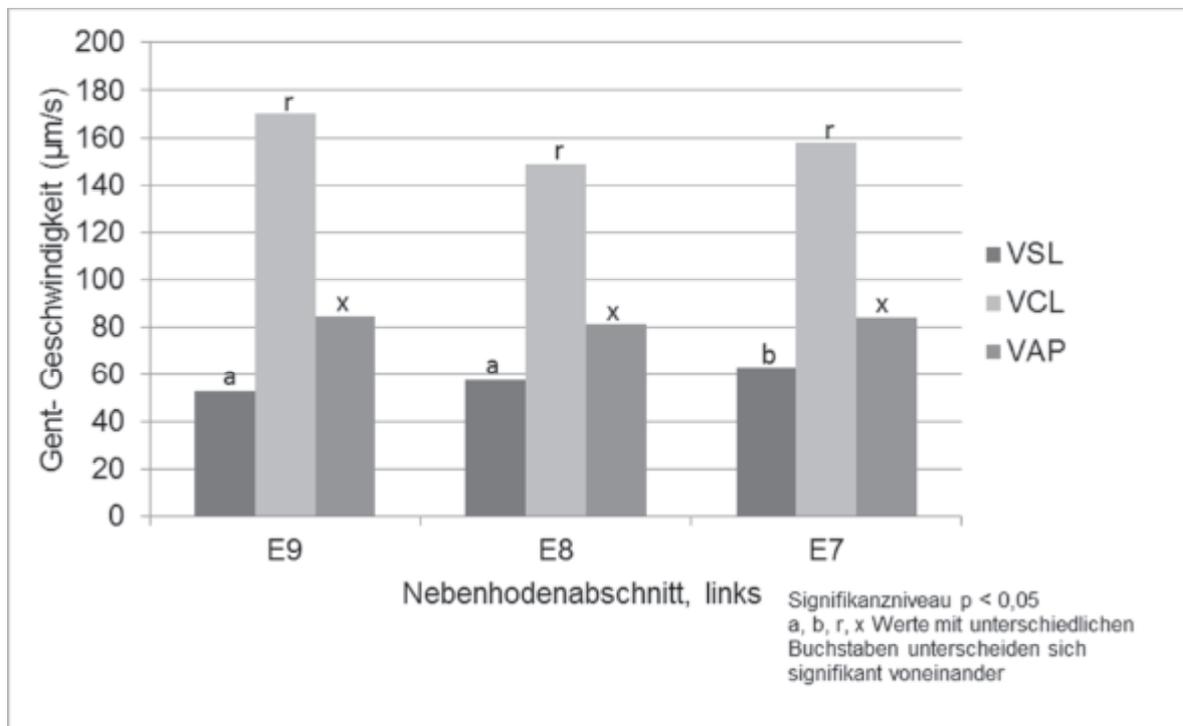
Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der objektiv bestimmten Motilität der Spermien von E7 bis E9 des linken und rechten Nebenhodens nach Verdünnung mit Gent-Verdünner festgestellt.

**Abb. 23:** Mittels CASA bestimmte Motilität der, mit Gent-Verdünner verdünnten, Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9

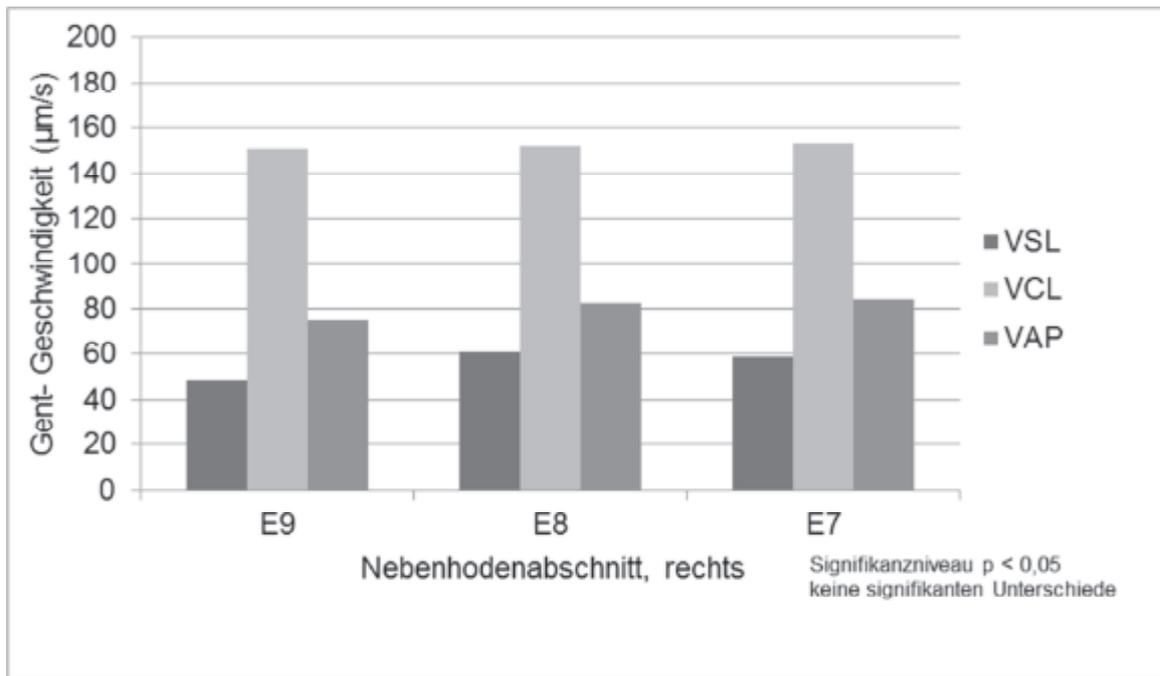
#### 4.5.5 Geschwindigkeitsparameter der Nebenhodenspermien mit Gent-Verdünner

Bei der CASA wurden die Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP der Nebenhodenspermien der Abschnitte E7 – E9 nach der Verdünnung mit Gent bestimmt. Auf Grundlage der Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP wurden die LIN, STR und WOB der Nebenhodenspermien nach der Verdünnung mit dem Gent-Verdünner errechnet. Auch die seitliche Kopfauslenkung ALH wurde gemessen. Für die Spermien aller drei Nebenhodenschwanzabschnitte ergab sich eine ähnliche Verteilung der Geschwindigkeiten sowie der LIN, STR und WOB (siehe Abb. 24 – 27).

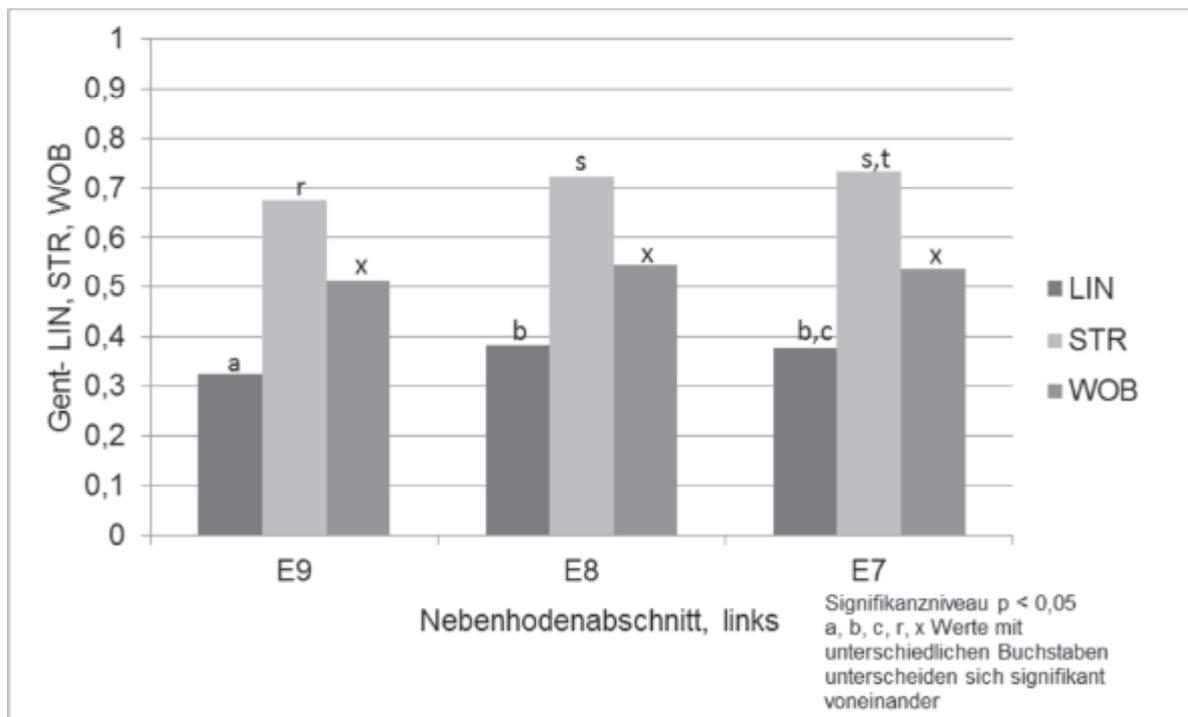
Wurde die VSL der Spermien von E7 und E9 miteinander verglichen, so ergab sich für die Spermien von E7 eine höhere VSL, der Unterschied war signifikant ( $p = 0,0211$ ). Die STR der Spermien von E9 und E8 sowie E9 und E7 des linken Nebenhodens unterschieden sich ebenfalls signifikant ( $p = 0,0211$ , bzw.  $0,0172$ ), die STR von E9 war in beiden Fällen niedriger als von E7 und E8. Bei den Spermien des rechten Nebenhodens war die STR von E9 signifikant niedriger als von E8 ( $p = 0,0101$ ). Für die LIN ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Die LIN von E9 war niedriger im Vergleich von E9 und E8 des linken und rechten Nebenhodens ( $p = 0,0376$ , bzw.  $0,0028$ ) sowie von E9 und E7 des linken und rechten Nebenhodens ( $p = 0,0311$ , bzw.  $0,0451$ ). Die ALH war bei Spermien von E9 am höchsten gefolgt von denen von E8 und E7. Die Spermien des linken Nebenhodens zeigten höhere Werte für die ALH als die des rechten Nebenhodens (siehe Abb. 28). Es werden die Medianwerte, Minimal- und Maximalwerte der CASA-Parameter angegeben (siehe Tab. 18).



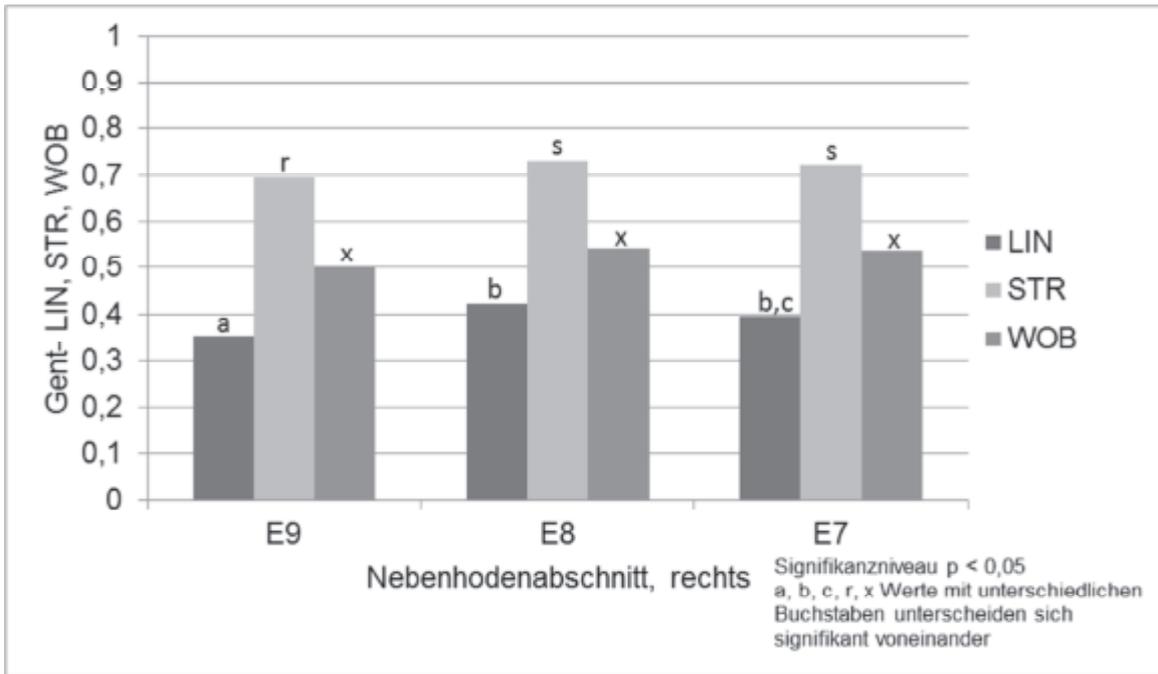
**Abb. 24:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP der Spermien von E7 – E9 des linken Nebenhodens nach Verdünnung mit Gent-Verdüner



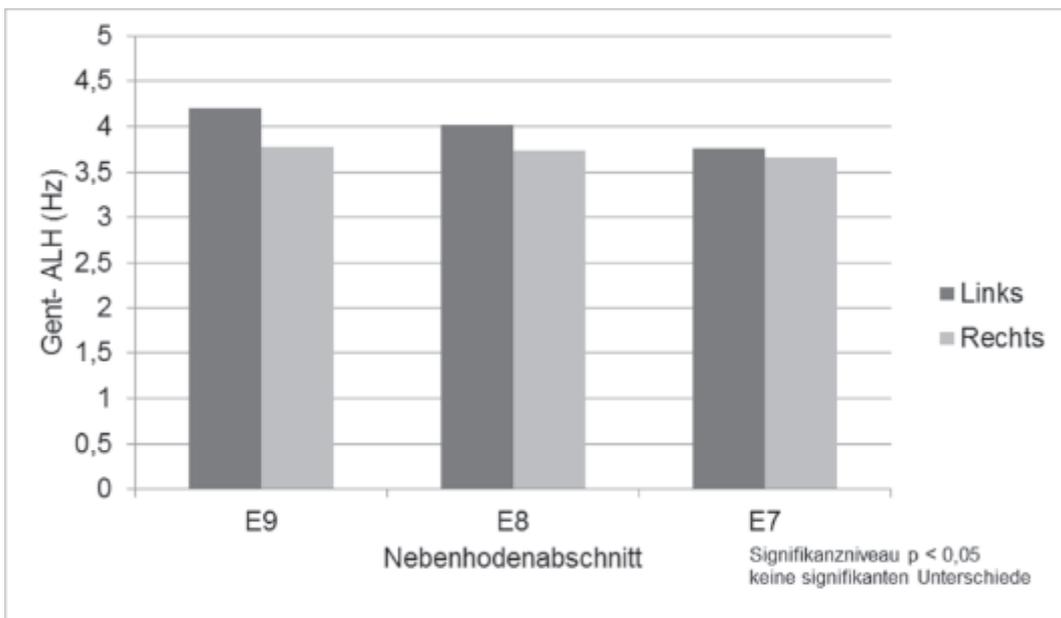
**Abb. 25:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP der Spermien von E7 – E9 des rechten Nebenhodens nach Verdünnung mit Gent-Verdünner



**Abb. 26:** LIN, STR und WOB der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens nach Verdünnung mit Gent-Verdünner



**Abb. 27:** LIN, STR und WOB der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens nach Verdünnung mit Gent-Verdünner



**Abb. 28:** ALH der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich nach Verdünnung mit Gent-Verdünner

**Tab. 18:** Median-, Minimal- und Maximalwerte der VSL, VCL, VAP, LIN, STR, WOB und ALH der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9 nach der Verdünnung mit Gent-Verdünner

CASA-Parameter (Gent)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	52,79 <sup>a</sup>	48,70 <sup>r</sup>	57,24 <sup>a,b</sup>	61,28 <sup>r</sup>	62,87 <sup>b</sup>	58,62 <sup>r</sup>
	Min.	21,12	29,30	46,78	44,39	52,18	20,32
	Max.	66,50	69,24	69,01	77,75	75,41	101,16
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	170,44 <sup>a</sup>	150,75 <sup>r</sup>	148,77 <sup>a</sup>	151,76 <sup>r</sup>	157,63 <sup>a</sup>	153,23 <sup>r</sup>
	Min.	63,12	73,35	105,40	116,80	121,08	80,11
	Max.	198,06	186,46	177,68	188,04	206,25	202,88
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	84,58 <sup>a</sup>	75,07 <sup>r</sup>	80,97 <sup>a</sup>	82,66 <sup>r</sup>	83,97 <sup>a</sup>	84,37 <sup>r</sup>
	Min.	34,55	37,51	64,37	116,804	71,65	38,34
	Max.	96,74	95,45	96,55	100,08	109,47	118,35
LIN	Median	0,33 <sup>a</sup>	0,35 <sup>r</sup>	0,38 <sup>b</sup>	0,42 <sup>s</sup>	0,38 <sup>b,c</sup>	0,40 <sup>s,t</sup>
	Min.	0,28	0,23	0,33	0,26	0,33	0,11
	Max.	0,41	0,40	0,46	0,46	0,45	0,53
STR	Median	0,67 <sup>a</sup>	0,70 <sup>r</sup>	0,72 <sup>b</sup>	0,73 <sup>s</sup>	0,73 <sup>b,c</sup>	0,72 <sup>s</sup>
	Min.	0,53	0,47	0,60	0,54	0,64	0,22
	Max.	0,71	0,72	0,80	0,79	0,80	0,85
WOB	Median	0,51 <sup>a</sup>	0,5 <sup>r</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,54 <sup>r</sup>	0,54 <sup>a</sup>	0,54 <sup>r</sup>
	Min.	0,47	0,28	0,51	0,48	0,44	0,20
	Max.	0,58	0,58	0,61	0,62	0,61	0,63
ALH (Hz)	Median	4,20 <sup>a</sup>	3,78 <sup>r</sup>	4,02 <sup>a</sup>	3,73 <sup>r</sup>	3,77 <sup>a</sup>	3,65 <sup>r</sup>
	Min.	1,91	1,74	2,78	2,57	2,79	1,60
	Max.	5,07	4,81	4,66	4,24	5,01	4,24

p < 0,05 ist signifikant.

a,b,c,r,s,t: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander.

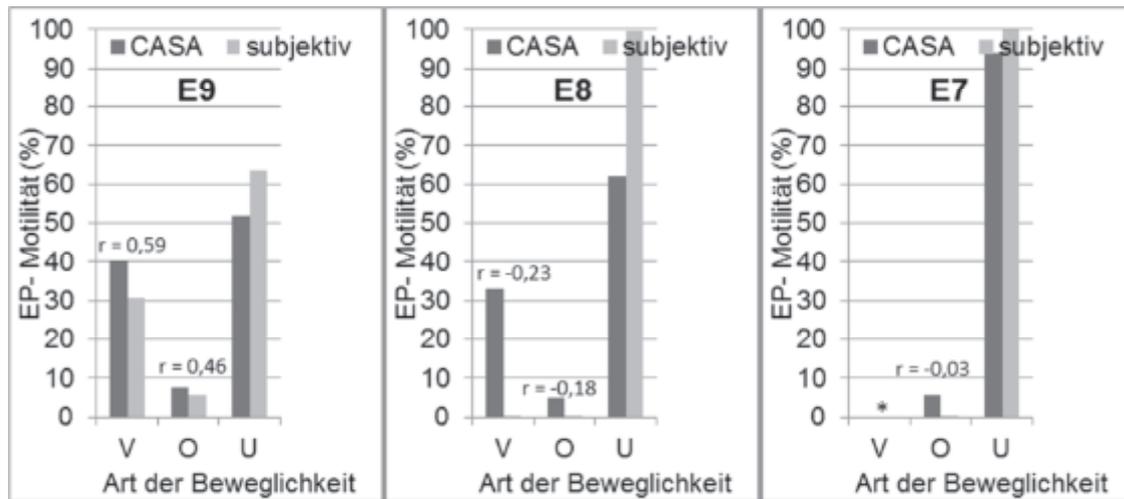
#### 4.5.6 Methodenvergleich der subjektiv und objektiv bestimmten Motilität, der mit EquiPro™ verdünnten Spermien

Im Vergleich der Methoden der subjektiven und objektiven Bestimmung der Beweglichkeit der Spermien, konnte keine Korrelation der Messmethoden bei den Abschnitten E7 und E8 festgestellt werden (siehe Abb. 29). Für die objektive und subjektive Bestimmung der Gesamtbeweglichkeit der, mit EquiPro™ verdünnten, Spermien des Abschnitts E7 und E8 ergab sich eine negative Korrelation von -0,22 und -0,24. Zwischen der objektiven und subjektiven Bestimmung der Gesamtbeweglichkeit ergab sich für die Spermien des Abschnitts E9 eine positive Korrelation von 0,53.

Hinsichtlich der Vorwärtsbeweglichkeit der, mit EquiPro™ verdünnten, Proben korrelierten die beiden Methoden für die Spermien der Abschnitte E8 mit -0,23 nur sehr schwach. Die Korrelation für den Abschnitt E7 konnte nicht ermittelt werden, da die Anzahl der vorwärtsbeweglichen Spermien zu gering war. Es ergab sich eine positive Korrelation für die Spermien von E9 mit 0,59.

Bei der Ermittlung der Ortsbeweglichkeit der Spermien wurde eine negative Korrelation im Methodenvergleich der Spermien von E7 und E8 mit -0,03 und -0,18 herausgefunden. Für

die Ortsbeweglichkeit ergab sich ebenfalls eine positive Korrelation der Methoden für die Spermien von E9 von 0,46.



r = Korrelationskoeffizient

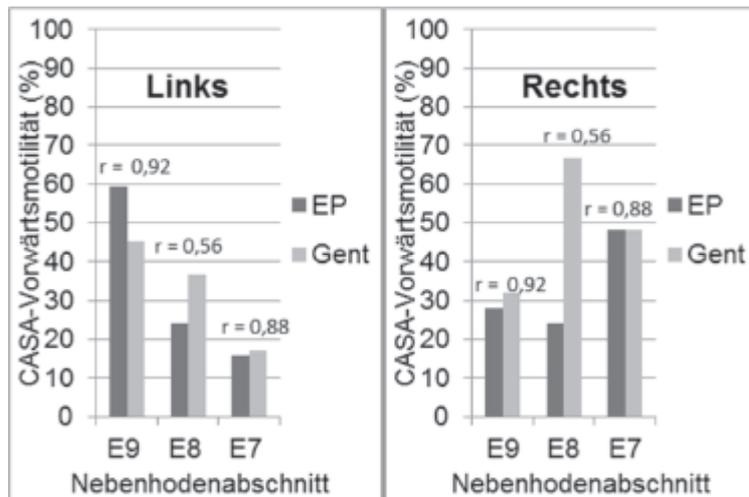
\*Korrelationskoeffizient konnte nicht ermittelt werden, da die Anzahl der vorwärtsbeweglichen Spermien zu gering war.

**Abb. 29:** Vergleich der Motilität, subjektiv und objektiv bestimmt, der mit EquiPro™ verdünnten Spermien der Abschnitte E7 – E9

#### 4.5.7 Auswirkung der verschiedenen Verdüner auf die subjektiv und objektiv bestimmte Motilität der Nebenhodenspermien, Methodenvergleich der Verdünnung mit EquiPro™ und Gent-Verdünner

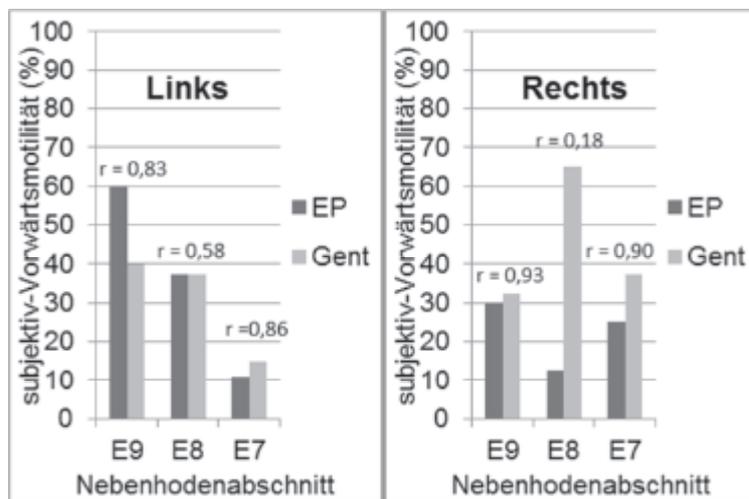
Die Beweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien, subjektiv geschätzt oder mittels CASA bestimmt, der Abschnitte E7 – E9 ist vom Verdünnertyp abhängig. Stark positive Korrelationen ergaben sich sowohl für die subjektiv, als auch die objektiv bestimmte Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien von E9 und E7 des linken und rechten Nebenhodens. Die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien von E8 wies im Verdünnervergleich nur eine mittlere bis geringe positive Korrelation auf. Zwischen der, mit CASA bestimmten, Gesamtmotilität und dem Verdünnertyp, EquiPro™ oder Gent-Verdünner, ergab sich eine stark positive Korrelation für die Abschnitte E7 und E9 des linken und rechten Nebenhodens. Für die Spermien des Abschnitts E8 ergab sich eine mittlere, positive Korrelation. Eine schwache, positive Korrelation ergab sich für die Ortsbeweglichkeit, unabhängig von der Art der Bestimmung, der Abschnitte E7 des linken Nebenhodens und E8 beider Nebenhoden.

Die Ortsbeweglichkeit der Spermien des Abschnitts E8 des rechten Nebenhodens zeigte eine starke Korrelation zwischen den Verdünnertypen. Die Spermien der Abschnitte E7 und E8 beider Nebenhodenhoden zeigten mit Gent-Verdünner verdünnt eine höhere Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit. Auch bei den Spermien von E9 des rechten Nebenhodens ließ sich eine geringfügig höhere Beweglichkeit in der Gent-Verdünnung feststellen. Nur die Spermien des linken Abschnitts E9 zeigten eine höhere Beweglichkeit in der Verdünnung mit EquiPro™ (siehe Abb. 30 und 31, siehe Anhang Tab. 19).



r = Korrelationskoeffizient

**Abb. 30:** Vergleich der Vorwärtsbeweglichkeit, bestimmt mittels CASA, der Spermien der Abschnitte E7 – E9 je nach Verdünnertyp



r = Korrelationskoeffizient

**Abb. 31:** Vergleich der Vorwärtsbeweglichkeit, subjektiv geschätzt, der Spermien der Abschnitte E7 – E9 je nach Verdünnertyp

#### 4.6 Tiefgefrierbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien der Segmente E7 – E9 nach der Kryokonservierung mit verschiedenen Einfriermethoden (Auftauproben)

Durch das Tiefgefrieren wurde bei den Spermien aller Nebenhodenschwanzsegmente, unabhängig von der Einfriermethode, eine starke Reduktion der Beweglichkeit festgestellt. Die Minimal- und Maximalwerte der Gesamtbeweglichkeit lagen für E9 zwischen 0,43 und 30,51 %, für E8 zwischen 0,09 und 35,37 % und für E7 zwischen 0,43 und 50,50 %. Die Gesamt-, Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit der Spermien des rechten Nebenhodens war nach dem Auftauen höher, als die der Spermien des linken Nebenhodens. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Beweglichkeit zwischen den Spermien der verschiedenen Nebenhodenschwanzabschnitte festgestellt werden. Es ergaben sich allerdings signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) in der Spermienbeweglichkeit, wurden die Auftauergebnisse der

unterschiedlichen Einfrierprogramme SRS, SRL, ICS und ICL miteinander verglichen. Wurden die Geschwindigkeitsparameter der Spermien zwischen den einzelnen Abschnitten und zwischen den Einfrierprogrammen verglichen, so waren signifikante Unterschiede ersichtlich.

#### 4.6.1 Motilität und Geschwindigkeitsparameter der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach dem Tiefgefrieren mit der Schwimmrampe ohne Kühlung (SRS)

Wurden die Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 mit dem Einfrierprogramm SRS tiefgefroren, so ergaben sich nach dem Auftauen die nachfolgend angegebenen Median-, Minimal und Maximalwerte für die Motilität der Spermien (siehe Tab. 20, Abb. 32). Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens festgestellt.

**Tab. 20:** Mittels CASA bestimmte Vorwärts-, Orts-, und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien, tiefgefroren mit SRS, nach dem Auftauen

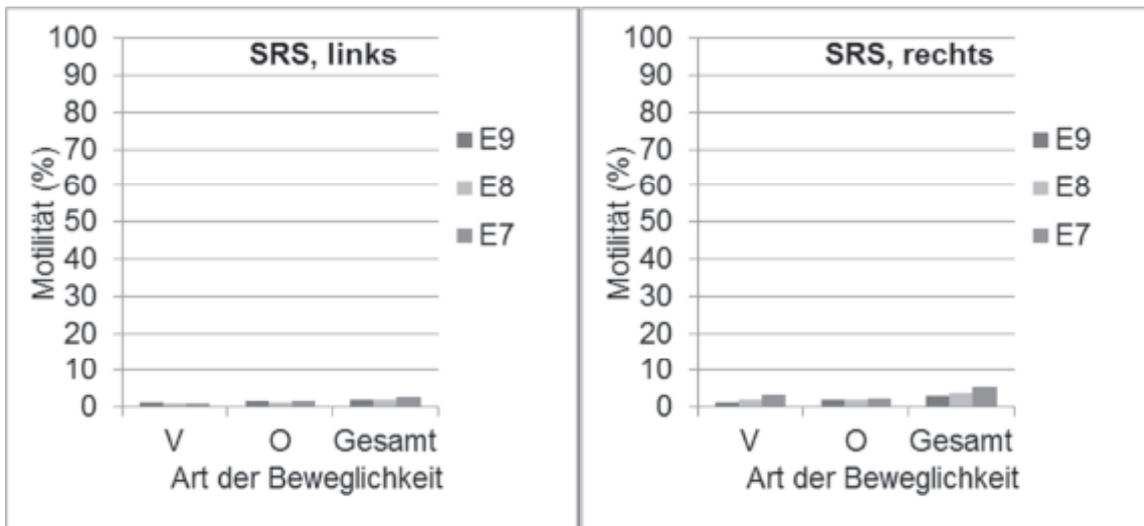
Beweglichkeit (SRS)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
V (%)	Median	1,11	1,12	0,86	1,93	0,99	3,36
	Min.	0,05	0,12	0,09	0,07	0,15	0,39
	Max.	6,82	8,10	4,34	20,44	6,70	15,59
O (%)	Median	1,60	1,81	1,29	1,78	1,5	2,12
	Min.	0,34	0,53	0	0,88	0	0,24
	Max.	2,98	6,41	2,74	5,97	4,42	6,0
Gesamt (%)	Median	2,1	2,81	1,86	3,67	2,69	5,3
	Min.	0,69	0,95	1,01	0,99	0,54	1,35
	Max.	8,95	14,50	7,08	26,41	8,36	17,80

Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens feststellbar.

Im Vergleich der Auftauergebnisse der vier verschiedenen Einfrierprogramme bezüglich der Vorwärts-, Orts-, und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Die Ortsbeweglichkeit der Spermien von E7 und E8 des linken und rechten Nebenhodens, eingefroren mit SRS, war nach dem Auftauen signifikant niedriger als die Ortsbeweglichkeit der Spermien, eingefroren mit ICS, desselben Abschnitts.

Auch die Gesamtbeweglichkeit der Spermien von E8 des linken und rechten Nebenhodens war signifikant niedriger bei den mit SRS tiefgefrorenen, als bei denen mit ICS und ICL tiefgefroren Spermien (siehe Tab. 20, 24 und 26 sowie Abb. 32 und 44).



Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 32:** Motilität (%) der Spermien der linken und rechten Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9, tiefgefroren mit Einfrierprogramm SRS, nach dem Auftauen

Die Analyse der Geschwindigkeitsparameter und Bewegungsmuster der aufgetauten Nebenhodenschwanzspermien, nach Tiefgefrierung mit SRS, lieferte die nachfolgend beschriebenen Median-, Minimal- und Maximalwerte (siehe Tab. 21).

**Tab. 21:** CASA Parameter der Nebenhodenschwanzspermien nach dem Auftauen, tiefgefroren mit SRS

CASA-Parameter (SRS)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	40,30	38,05	37,08	46,36	53,77	47,12
	Min.	3,79	10,31	3,97	4,22	10,13	14,37
	Max.	49,39	51,83	61,48	64,41	66,03	72,93
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	113,05	118,96	102,90	105,67	107,20	119,93
	Min.	11,23	22,86	4,50	4,22	22,46	34,32
	Max.	137,09	152,62	146,91	146,98	128,96	133,59
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	56,80	60,97	50,10	57,75	53,77	62,27
	Min.	5,25	15,55	4,52	4,27	10,13	17,82
	Max.	73,04	72,06	76,69	75,79	66,03	85,38
LIN	Median	0,31	0,33	0,36	0,38	0,26	0,40
	Min.	0,06	0,19	0,13	0,17	0,07	0,21
	Max.	0,38	0,47	0,42	0,56	0,50	0,58
STR	Median	0,63	0,63 <sup>a</sup>	0,72	0,78 <sup>b</sup>	0,53	0,76 <sup>b,c</sup>
	Min.	0,12	0,38	0,15	0,16	0,13	0,40
	Max.	0,78	0,77	0,79	0,87	0,88	0,86
WOB	Median	0,46	0,47	0,47	0,51	0,40	0,53
	Min.	0,08	0,28	0,17	0,17	0,08	0,26
	Max.	0,51	0,70	0,54	0,65	0,57	0,67
ALH (Hz)	Median	2,71	2,79	2,47	2,63	2,48	2,79
	Min.	0,25	0,72	0,40	0,46	0,46	1,00
	Max.	3,31	3,62	3,09	3,47	3,29	3,39

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

Der Vergleich der Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP sowie LIN, STR, WOB und ALH der Spermien der verschiedenen Nebenhodenschwanzabschnitte lieferte die folgenden Ergebnisse (siehe Abb. 33 – 37).

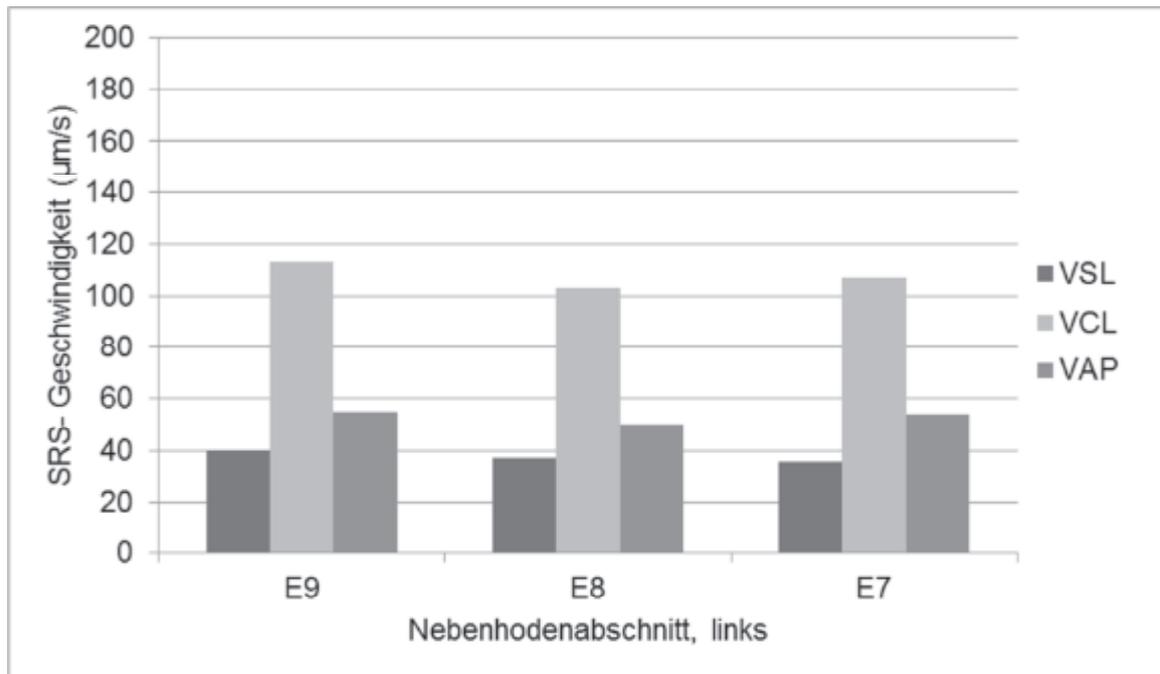
Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spermien der einzelnen Abschnitte in der VSL, VCL und VAP des linken und rechten Nebenhodens festgestellt.

Auch die LIN, STR, WOB und ALH der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte des linken Nebenhodens unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Lediglich die STR der Spermien des Abschnitts E9 des rechten Nebenhodens war signifikant niedriger ( $p < 0,05$ ) als die von E8 und E7 (siehe Tab. 21 und Abb. 36). Alle anderen Geschwindigkeitsparameter der Spermien der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens unterschieden sich nicht voneinander.

Wurden die Geschwindigkeitsparameter der, mit den vier verschiedenen Einfrierprogrammen tiefgefroren Spermien, verglichen, so ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

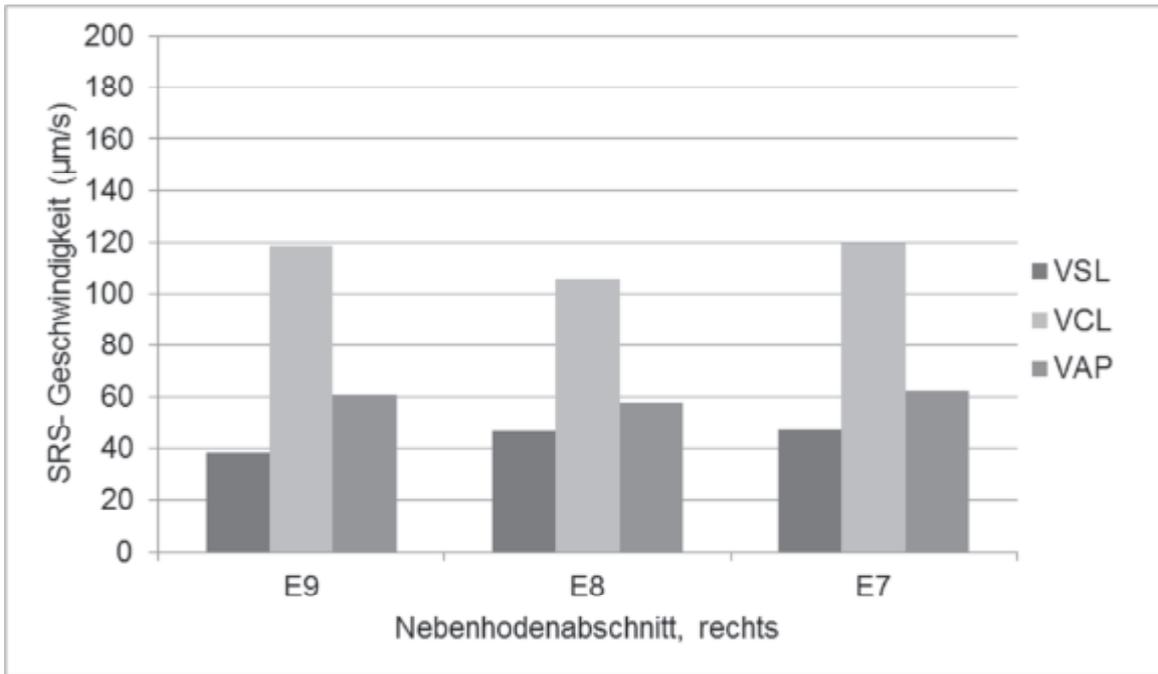
Die VSL, VCL, VAP und ALH der Spermien aus den Abschnitten E7 und E8 beider Nebenhodenschwänze, tiefgefroren mit SRS, waren signifikant niedriger als VSL, VCL, VAP und ALH aus denselben Abschnitten, tiefgefroren mit ICL (siehe Tab. 21 und 27 sowie Abb. 33, 34, 37, 51, 52 und 55).

Demnach waren die Spermien, welche mit SRS tiefgefroren wurden langsamer und zeigten eine niedrigere Kopfauslenkung, als die Spermien, die mit ICL tiefgefroren wurden.



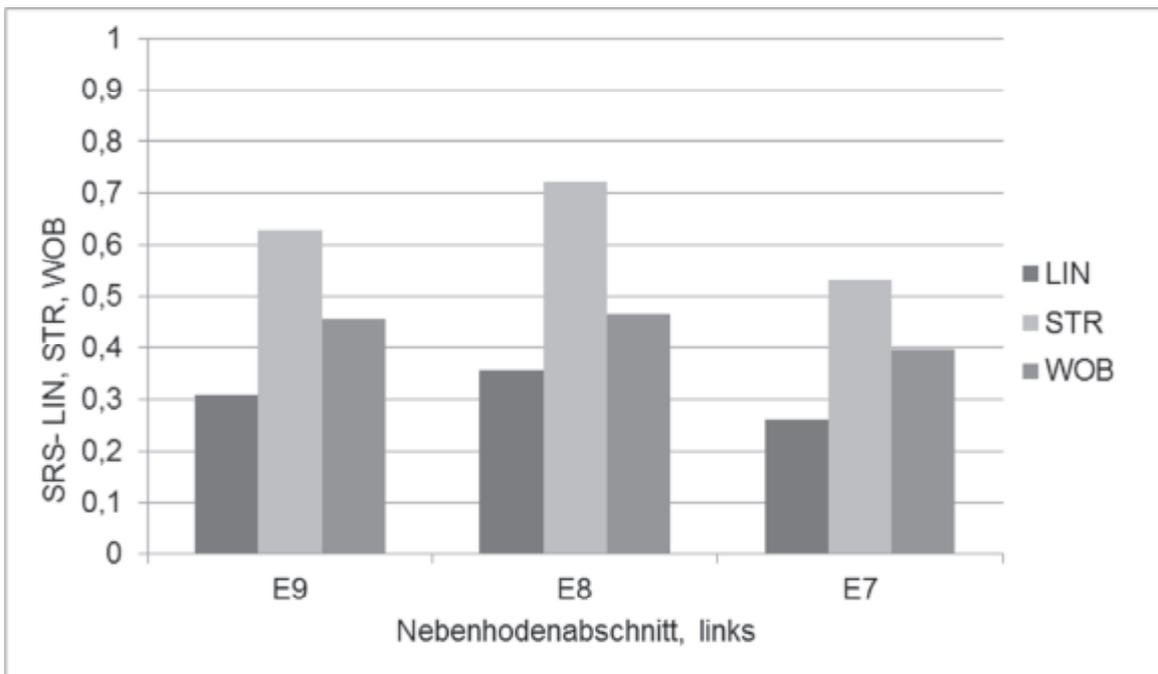
Es waren keine signifikanten Unterschiede in der VSL, VCL, VAP zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 33:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit SRS tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des linken Nebenhodens



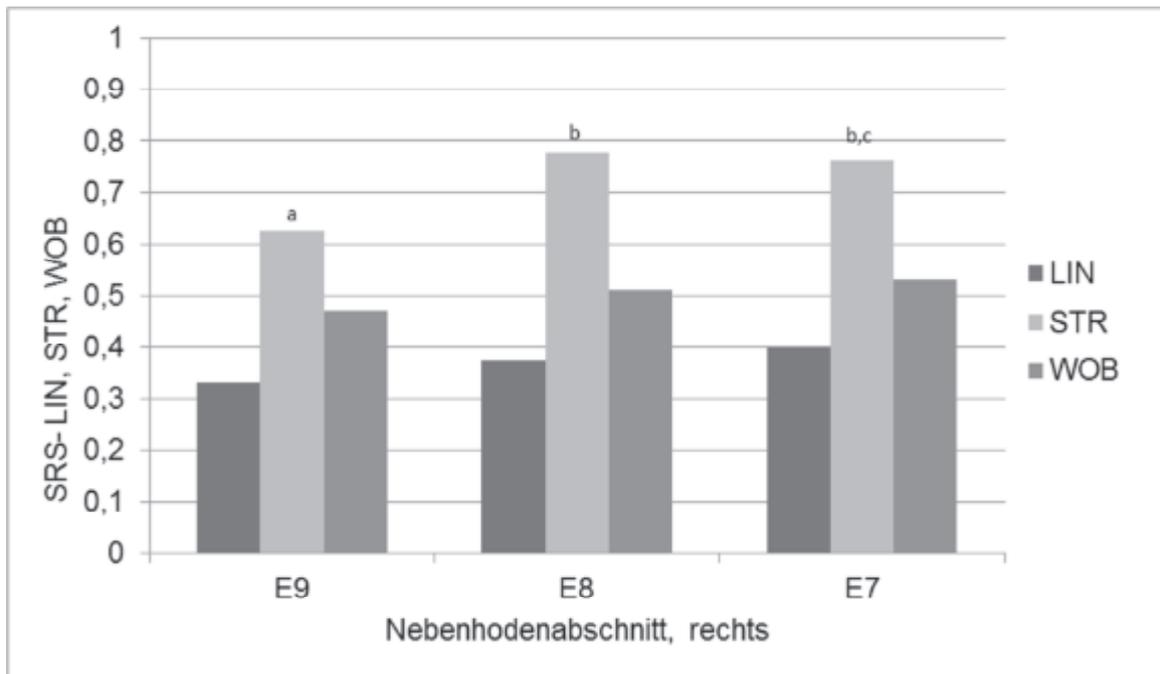
Es waren keine signifikanten Unterschiede in der VSL, VCL, VAP zwischen den Abschnitten E7 – E9 des rechten Nebenhodens feststellbar

**Abb. 34:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit SRS tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des rechten Nebenhodens



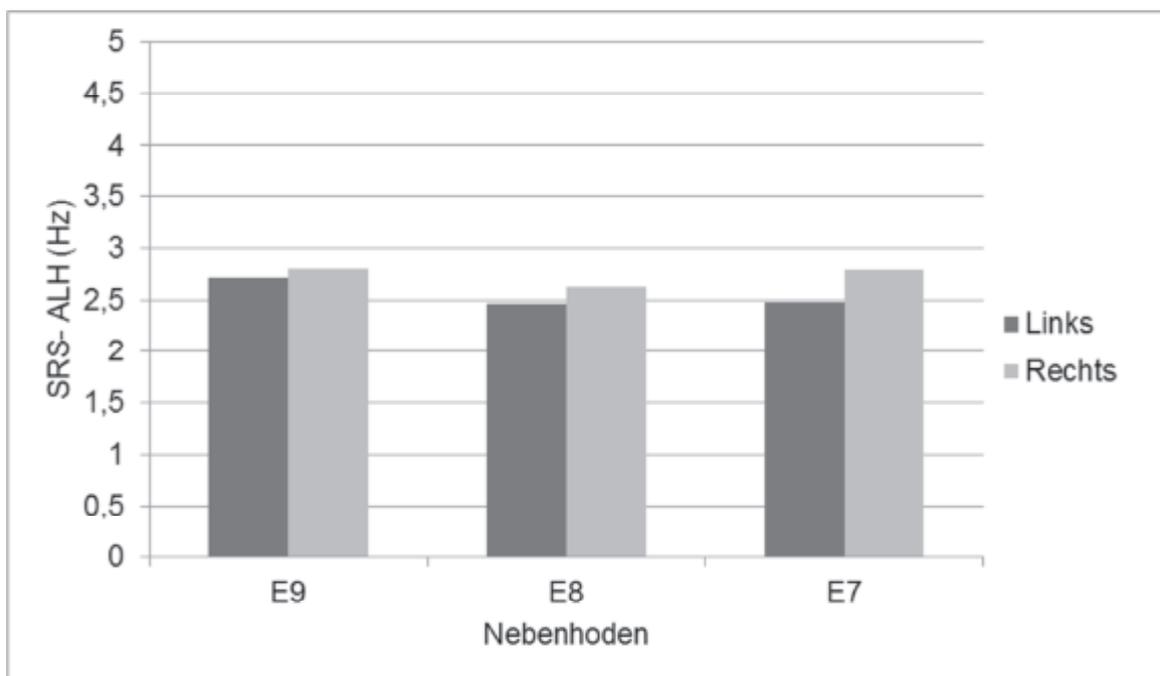
Es waren keine signifikanten Unterschiede in der LIN, STR, WOB zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 35:** LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRS, der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens



a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

**Abb. 36:** LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRS, der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens



Es waren keine signifikanten Unterschiede in der ALH zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 37:** ALH der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRS, der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich

#### 4.6.2 Motilität und Geschwindigkeitsparameter der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach dem Tiefgefrieren mit der Schwimmrampe mit vorausgegangener Kühlung (SRL)

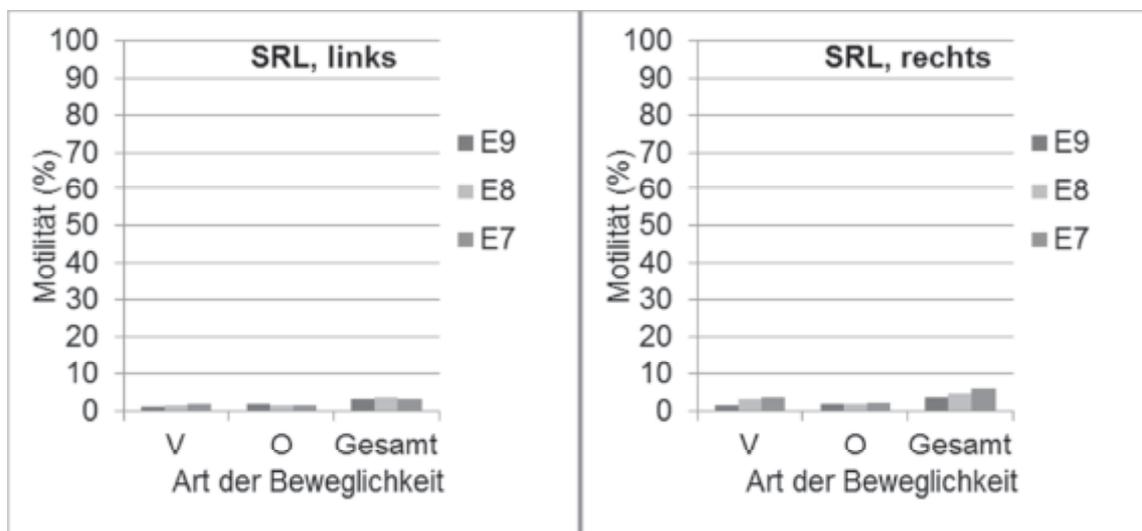
Nach dem Auftauen der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 mit dem Einfrierprogramm SRL ergaben sich die angegebenen Median-, Minimal und Maximalwerte

für die Motilität der Spermien (Tab. 22 und Abb. 38). Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens festgestellt. Auch der Vergleich der Beweglichkeit der Spermien, tiefgefroren mit SRL, mit der Spermienbeweglichkeit der Proben, die mit den anderen drei Einfrierprogrammen tiefgefroren wurden, lieferte keine signifikanten Unterschiede.

**Tab. 22:** Mittels CASA bestimmte Vorwärts-, Orts-, und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien, tiefgefroren mit SRL, nach dem Auftauen

Beweglichkeit (SRL)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
V (%)	Median	1,36	1,55	1,64	3,21	1,77	3,57
	Min.	0,07	0,15	0,34	0,36	0,39	0,10
	Max.	5,23	8,54	4,41	20,11	7,34	32,02
O (%)	Median	1,84	1,84	1,62	2,08	1,45	2,36
	Min.	0,68	0,10	0,88	0,78	0	0,35
	Max.	4,64	4,19	3,09	5,91	3,44	7,98
Gesamt (%)	Median	3,14	3,66	3,56	4,71	3,2	6,06
	Min.	0,82	0,46	1,21	2,16	1,31	0,81
	Max.	9,33	11,28	6,79	26,02	10,78	40

Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens feststellbar.



**Abb. 38:** Motilität (%) der Spermien der linken und rechten Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9, tiefgefroren mit Einfrierprogramm SRL, nach dem Auftauen

Wurden die Spermien, nach Tiefgefrierung mit SRL, aufgetaut, so waren folgende Geschwindigkeitsparameter zu messen, diese sind nachfolgend in Median-, Minimal- und Maximalwerte angegeben (Tab. 23).

**Tab. 23:** CASA Parameter der Nebenhodenschwanzspermien nach dem Auftauen, tiefgefroren mit SRL

CASA-Parameter (SRL)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	42,23	40,48 <sup>a</sup>	44,12	49,57 <sup>a,b</sup>	40,61	59,75 <sup>b</sup>
	Min.	2,52	8,82	26,23	13,93	16,09	7,36
	Max.	53,84	53,99	55,73	62,06	58,19	87,77
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	112,51	115,94	121,26	112,59	119,17	131,39
	Min.	8,19	24,98	75,16	47,15	44,60	23,73
	Max.	134,73	146,17	133,39	150,59	141,24	183,37
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	57,37	61,10 <sup>r</sup>	60,91	63,55 <sup>r,s</sup>	55,91	74,09 <sup>s</sup>
	Min.	4,17	11,61	39,02	21,33	22,74	10,68
	Max.	70,00	70,83	67,45	74,90	74,31	106,07
LIN	Median	0,36	0,37	0,71	0,77	0,30	0,44
	Min.	0,05	0,12	0,54	0,21	0,11	0,05
	Max.	0,42	0,43	0,84	0,84	0,44	0,51
STR	Median	0,67	0,70 <sup>x</sup>	0,72	0,73 <sup>x,y</sup>	0,61	0,82 <sup>y</sup>
	Min.	0,53	0,47	0,60	0,54	0,22	0,11
	Max.	0,71	0,72	0,80	0,79	0,81	0,86
WOB	Median	0,51	0,50	0,50	0,51	0,42	0,54
	Min.	0,47	0,28	0,37	0,14	0,17	0,07
	Max.	0,58	0,58	0,54	0,60	0,55	0,59
ALH (Hz)	Median	0,81	3,06	2,92	2,79	2,83	3,04
	Min.	0,33	0,98	1,34	1,05	1,04	0,50
	Max.	3,82	3,46	3,32	3,36	3,47	3,70

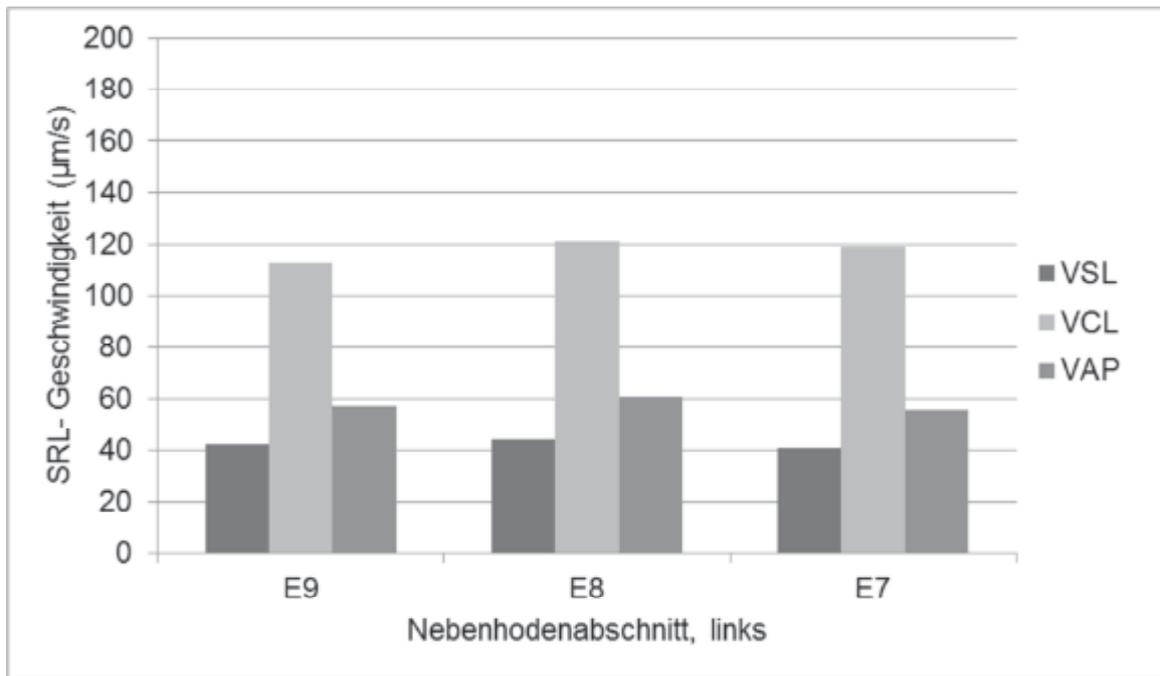
a,b,r,s,x,y: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

Der Vergleich der Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP sowie der LIN, STR, WOB und ALH der Spermien der verschiedenen Nebenhodenschwanzabschnitte lieferte die folgenden Ergebnisse (siehe Abb. 39 – 43).

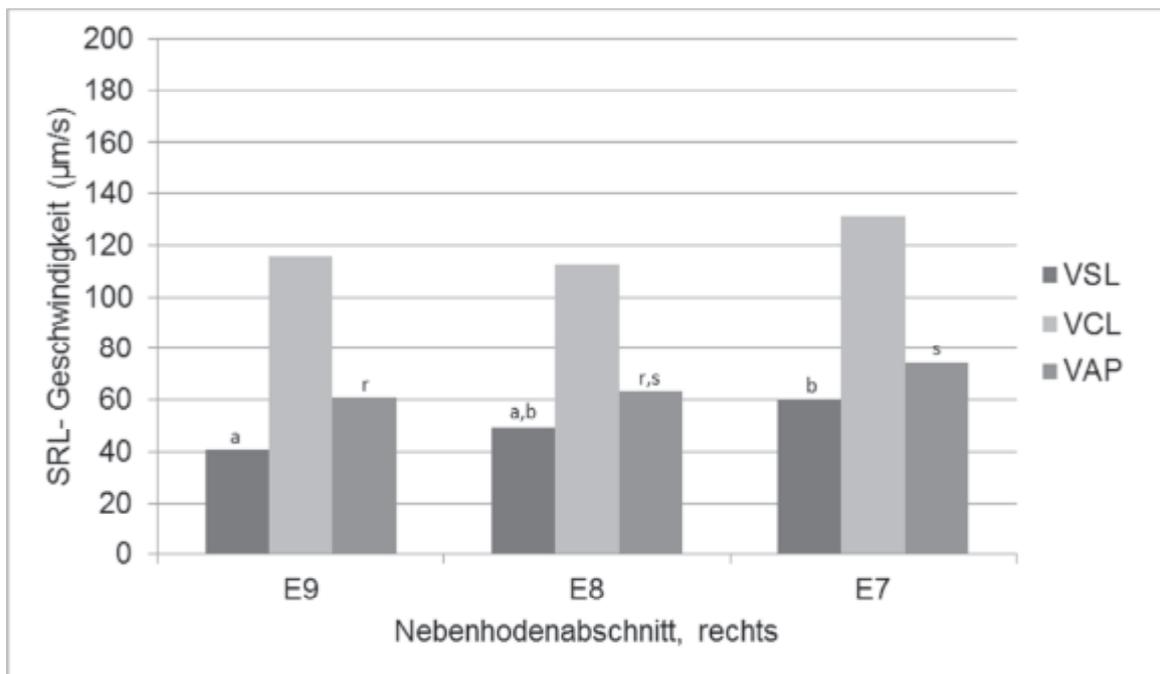
Die Geschwindigkeitsparameter der Spermien von E7 – E9 des linken Nebenhodens unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Bei der Untersuchung der Spermien des rechten Nebenhodens zeigten die Spermien von E7 signifikant höhere Werte für die VSL, VAP und STR, als die von E9 ( $p < 0,05$ ). Es konnte demnach eine höhere Geschwindigkeit auf der geraden Strecke bei den Spermien von E7 als von E9 nachgewiesen werden. Alle anderen Geschwindigkeitsparameter der Spermien des rechten Nebenhodens unterschieden sich nicht signifikant voneinander (siehe Tab. 23, Abb. 39 – 43).

Es ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede im Vergleich der Geschwindigkeitsparameter der Spermien, tiefgefroren mit SRL, mit den Spermien, die mit den drei anderen Einfrierprogrammen tiefgefroren wurden.

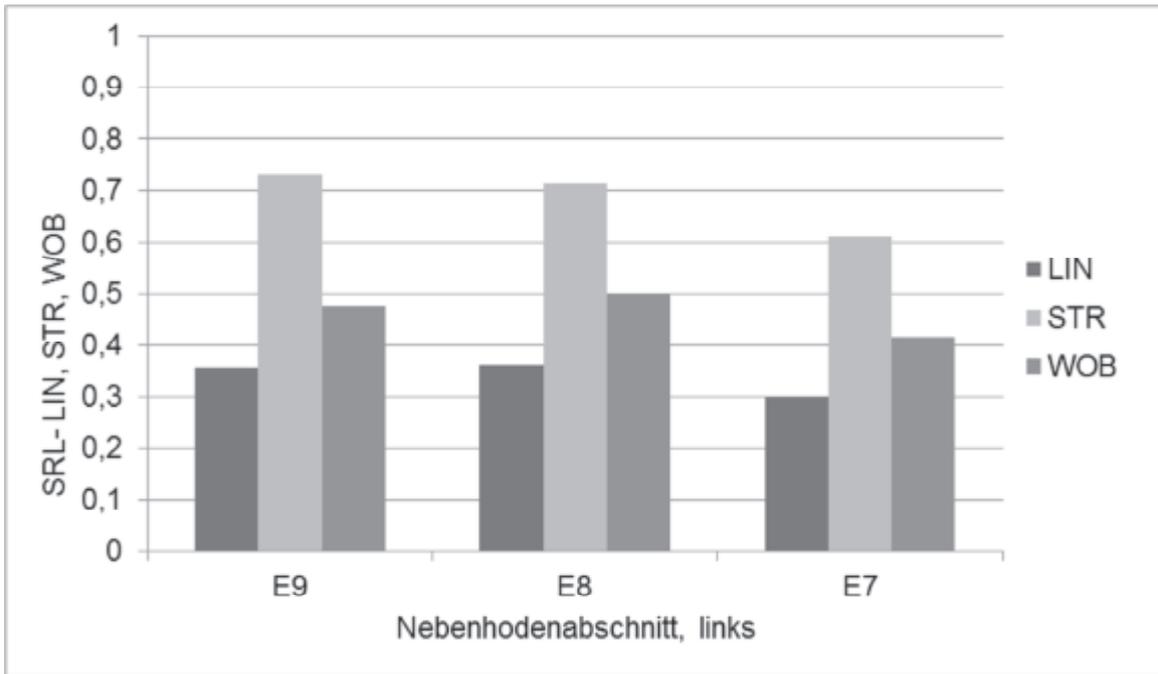


**Abb. 39:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit SRL tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des linken Nebenhodens



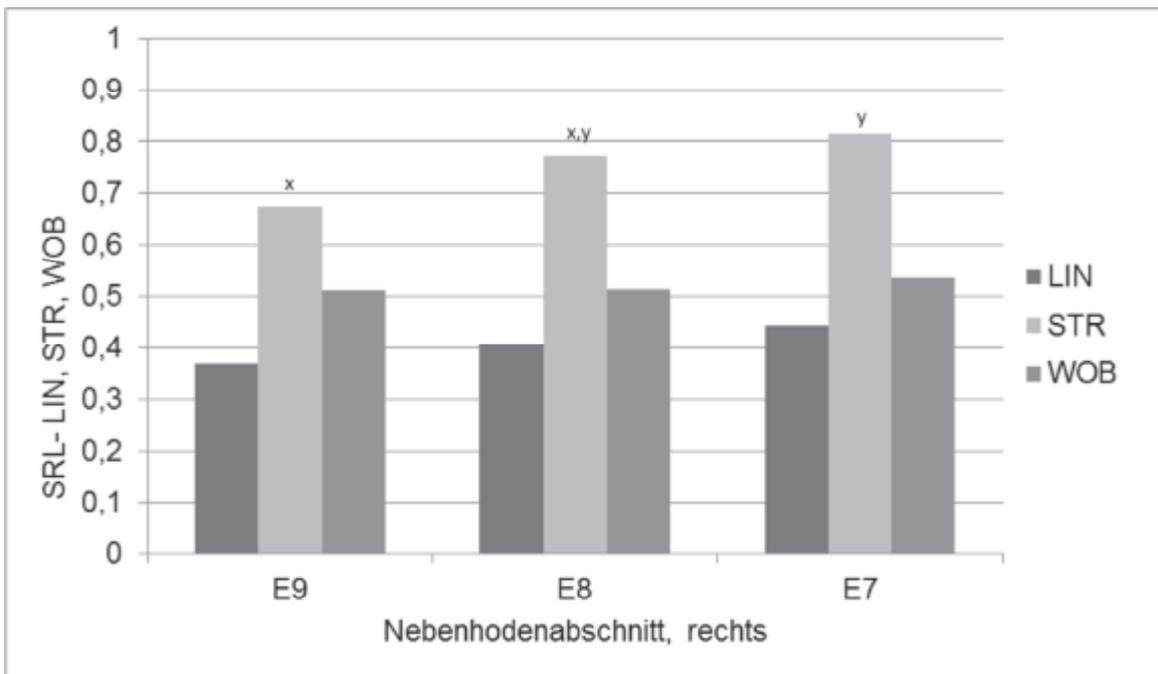
a,b,r,s: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

**Abb. 40:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit SRL tiefgefrorenen, Nebhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des rechten Nebenhodens



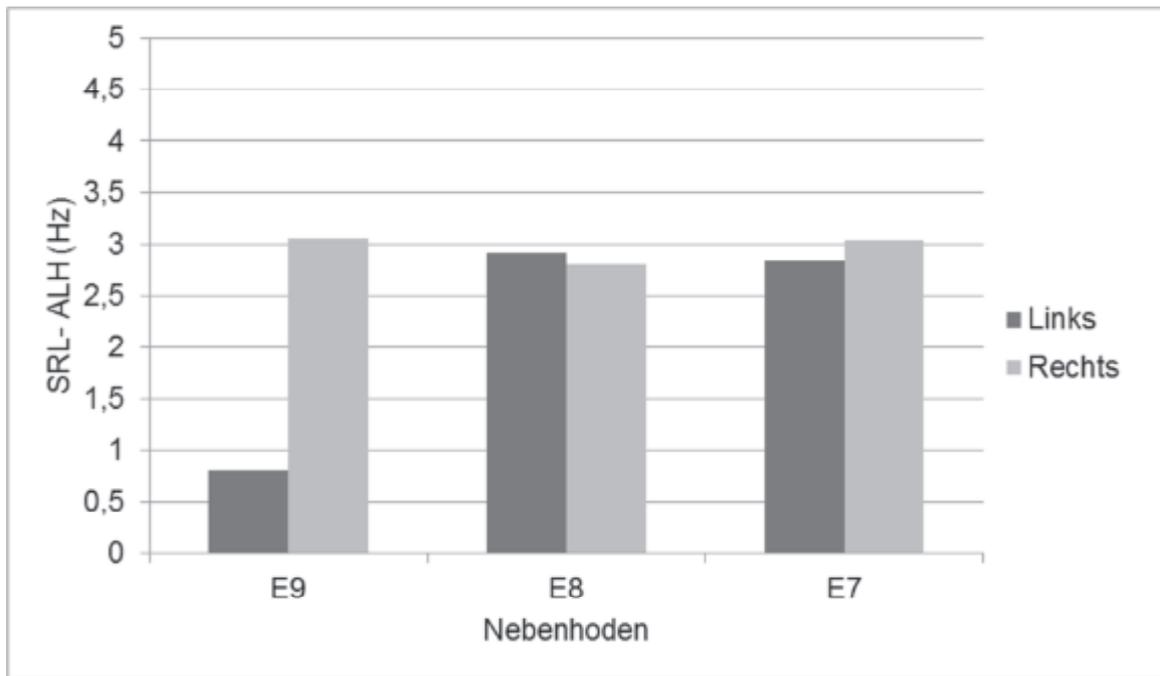
Es waren keine signifikanten Unterschiede in der LIN, STR, WOB zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 41:** LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRL, der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens



x,y: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

**Abb. 42:** LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRL, der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens



Es waren keine signifikanten Unterschiede in der ALH zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 43:** ALH der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRL, der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich

#### **4.6.3 Motilität und Geschwindigkeitsparameter der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach dem Tiefgefrieren mit dem Einfrierautomat ohne Kühlung (ICS)**

Bei der Untersuchung der Auftauprobe der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9, tiefgefroren mit dem Einfrierprogramm ICS, ergaben sich die nachfolgend angegebenen Median-, Minimal und Maximalwerte für die Motilität der Spermien (siehe Tab.24 und Abb. 44). Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens festgestellt.

**Tab. 24:** Mittels CASA bestimmte Vorwärts-, Orts-, und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien, tiefgefroren mit ICS, nach dem Auftauen

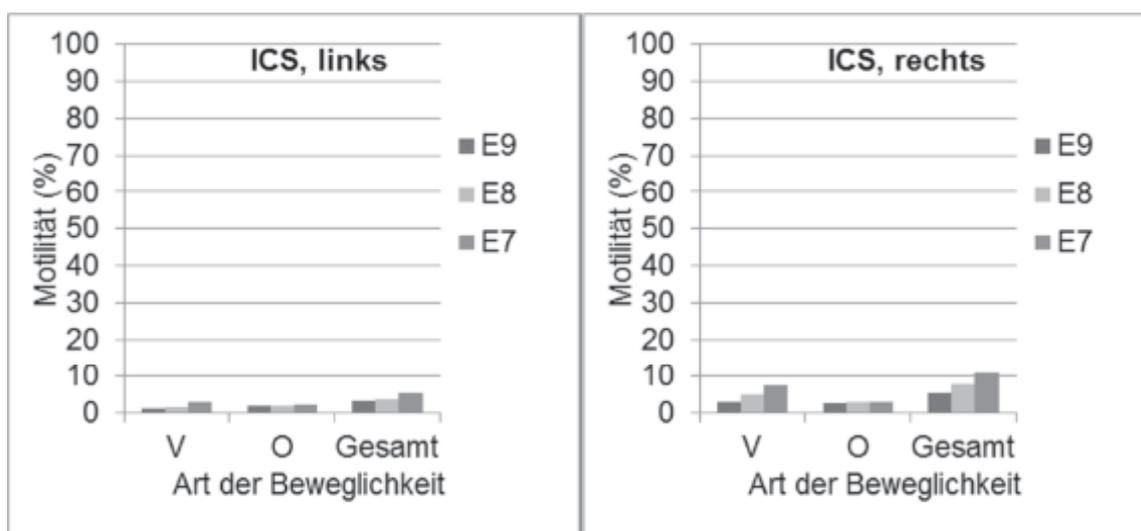
Beweglichkeit (ICS)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
V (%)	Median	1,39	2,86	1,69	4,87	2,98	7,28
	Min.	0,11	0,15	0,07	0,71	0,175	0
	Max.	6,2	13,92	7,32	23,93	12,33	33,37
O (%)	Median	1,79	2,57	1,94	2,86	2,16	2,82
	Min.	0,64	0,43	0,73	1,36	0,11	0,57
	Max.	3,22	16,60	5,98	11,44	4,62	6,46
Gesamt (%)	Median	3,21	5,49	3,58	7,64	5,25	10,93
	Min.	0,75	0,66	1,57	2,47	0,53	1,55
	Max.	9,42	30,51	13,15	35,37	16,95	39,83

Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens feststellbar.

Im Vergleich der Auftauergebnisse der vier verschiedenen Einfrierprogramme miteinander bezüglich der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Die Ortsbeweglichkeit der Spermien von E7 und E8 des linken und rechten Nebenhodens, eingefroren mit ICS, war nach dem Auftauen signifikant höher als die Ortsbeweglichkeit der Spermien, eingefroren mit SRS, desselben Abschnitts.

Die Spermien von E8 des linken und rechten Nebenhodens, tiefgefroren mit ICS, zeigten außerdem eine signifikant höhere Gesamtbeweglichkeit als die mit SRS tiefgefrorenen Spermien (siehe Tab. 20 und 24 sowie Abb. 32 und 44).



Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 44:** Motilität (%) der Spermien der linken und rechten Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9, tiefgefroren mit Einfrierprogramm ICS, nach dem Auftauen

Die Analyse der Geschwindigkeitsparameter der aufgetauten Nebenhodenschwanzspermien, nach Tiefgefrierung mit ICS, lieferte die nachfolgend beschriebenen Median-, Minimal- und Maximalwerte (siehe Tab. 25).

**Tab. 25:** CASA Parameter der Nebenhodenschwanzspermien nach dem Auftauen, tiefgefroren mit ICS

CASA-Parameter (ICS)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	40,30	44,12	40,69	52,68	41,43	50,34
	Min.	9,28	9,29	2,68	32,70	12,52	0
	Max.	52,02	53,99	56,71	61,10	57,72	70,56
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	122,58	117,00	122,16	115,55	123,09	126,31
	Min.	15,68	25,27	14,28	68,88	30,49	0
	Max.	147,43	154,06	155,10	143,11	154,94	147,65
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	Median	57,22	58,18	60,13	67,39	57,91	65,51
	Min.	10,99	13,99	4,92	40,58	15,63	0
	Max.	67,73	76,10	70,64	72,95	74,08	77,75
LIN	Median	0,34	0,37 <sup>a</sup>	0,36	0,43 <sup>b</sup>	0,32	0,39 <sup>b,c</sup>
	Min.	0,21	0,06	0,03	0,33	0,12	0
	Max.	0,39	0,38	0,45	0,56	0,44	0,58
STR	Median	0,69	0,71 <sup>r</sup>	0,76	0,81 <sup>s</sup>	0,70	0,77 <sup>s,t</sup>
	Min.	0,28	0,14	0,09	0,62	0,26	0
	Max.	0,76	0,78	0,81	0,86	0,78	0,90
WOB	Median	0,46	0,49 <sup>x</sup>	0,48	0,54 <sup>y</sup>	0,42	0,54 <sup>x,y</sup>
	Min.	0,25	0,07	0,06	0,45	0,17	0,07
	Max.	0,59	0,56	0,56	0,65	0,55	0,59
ALH (Hz)	Median	3,22	3,02	2,89	2,62	2,96	2,88
	Min.	0,87	0,60	0,35	1,59	0,65	0
	Max.	3,61	4,24	3,64	3,20	3,44	3,48

a,b,c,r,s,t,x,y: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

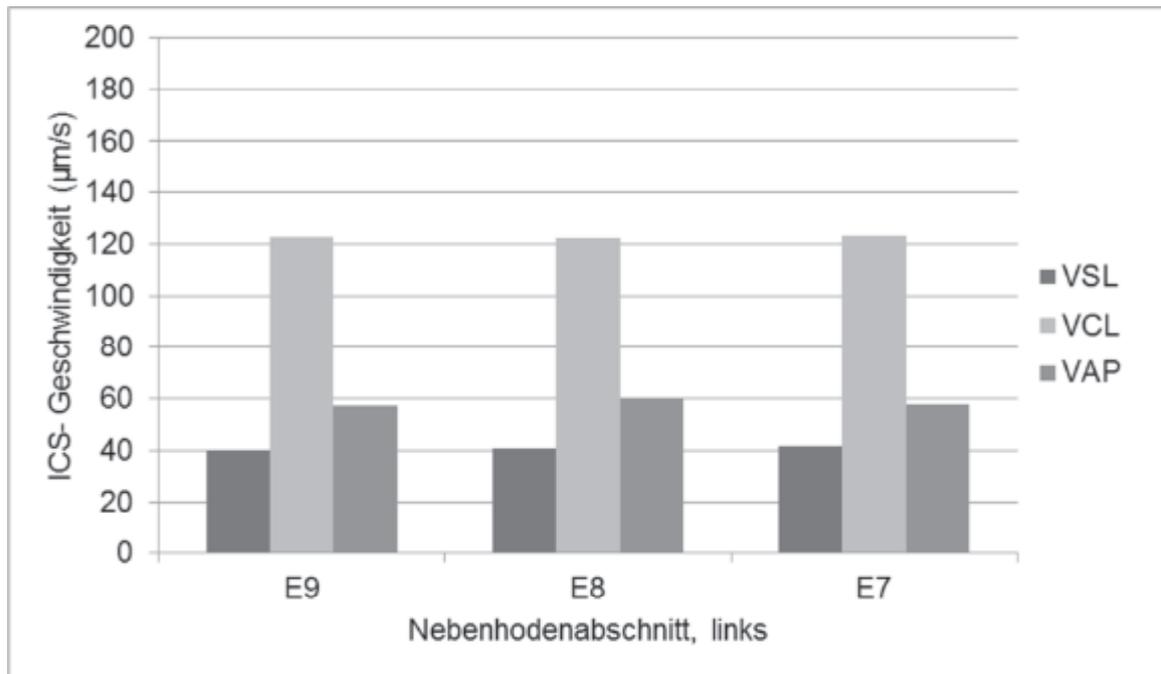
Der Vergleich der Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP sowie der LIN, STR, WOB und ALH der Spermien der verschiedenen Nebenhodenschwanzabschnitte lieferte die folgenden Ergebnisse (siehe Abb. 45 – 49).

Im Vergleich der VSL, VCL und VAP der Spermien der verschiedenen Nebenhodenschwanzabschnitte des linken und rechten Nebenhodens ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede.

Beim Vergleich der LIN, STR und WOB unterschieden sich lediglich die Spermien des rechten Nebenhodens zwischen den Abschnitten signifikant untereinander ( $p < 0,05$ ). In der LIN und STR ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Abschnitten E9 und E7 und E9 und E8. Die Spermien von E9 zeigten eine signifikant niedrigere LIN und STR, als die Spermien von E7 und E8. Außerdem zeigten die Spermien von E9 eine signifikant niedrigere WOB, als die von E8 (siehe Tab. 25, Abb. 45 – 48).

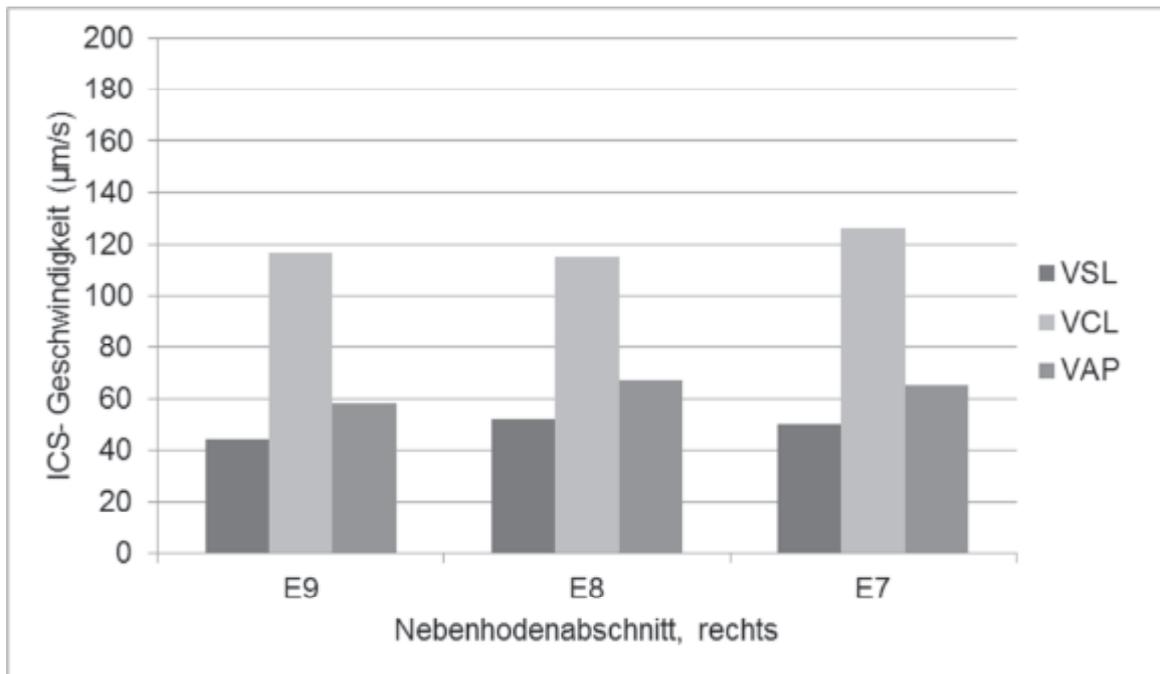
Wurden die Geschwindigkeitsparameter der Spermien, tiefgefroren mit ICS, mit denen der mittels SRS, SRL und ICL tiefgefrorenen Spermien verglichen, so ergab sich nur in der ALH zwischen ICS und ICL beider Nebenhodenschwänze ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ).

Die ALH der Spermien, tiefgefroren mit ICS, zeigten eine niedrigere ALH, als die der Spermien, tiefgefroren mit ICL (siehe Abb. 49 und 55).



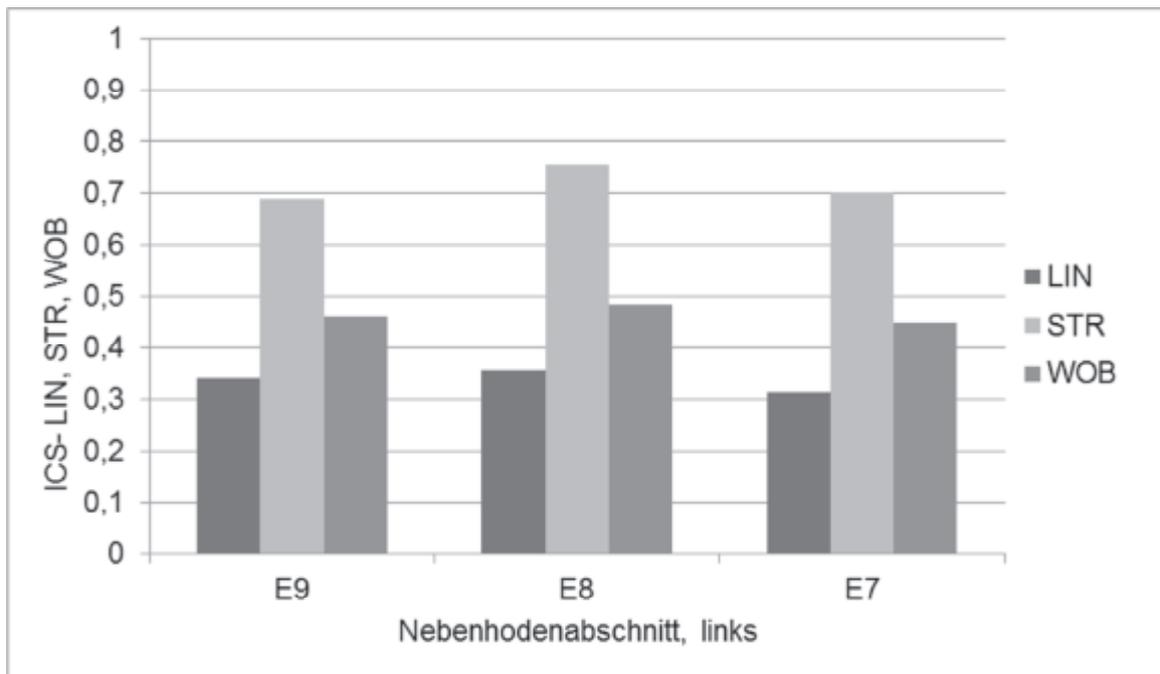
Es waren keine signifikanten Unterschiede in der VSL, VCL, VAP zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 45:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit ICS tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des linken Nebenhodens



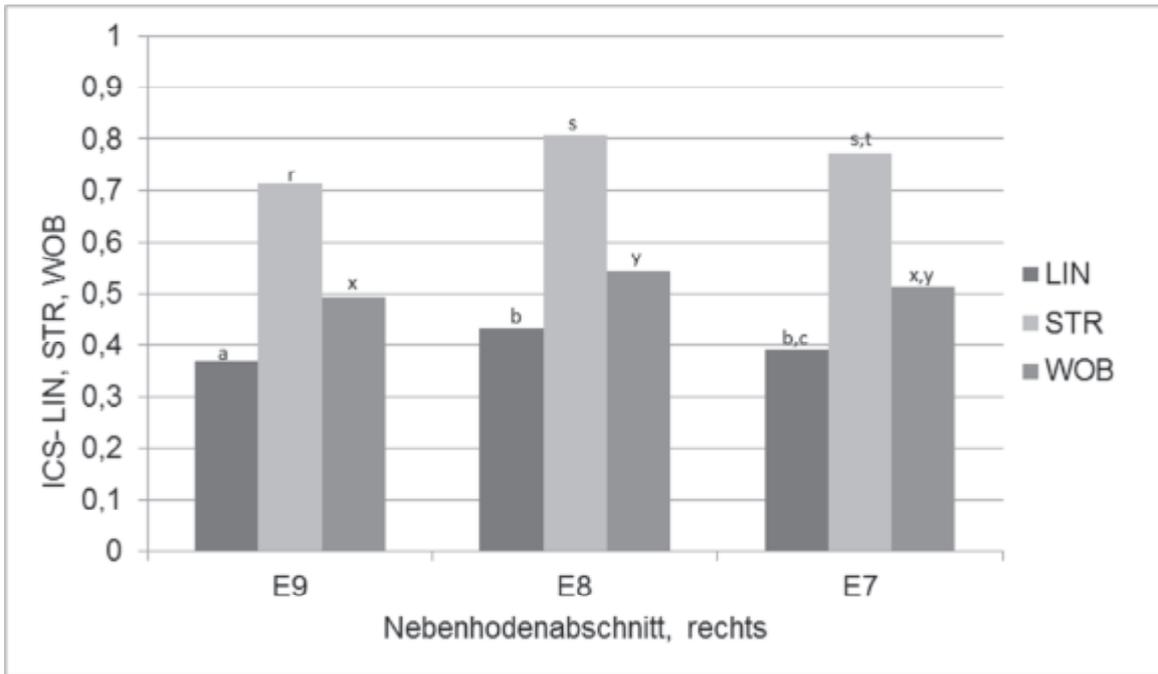
Es waren keine signifikanten Unterschiede in der VSL, VCL, VAP zwischen den Abschnitten E7 – E9 des rechten Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 46:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit ICS tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des rechten Nebenhodens



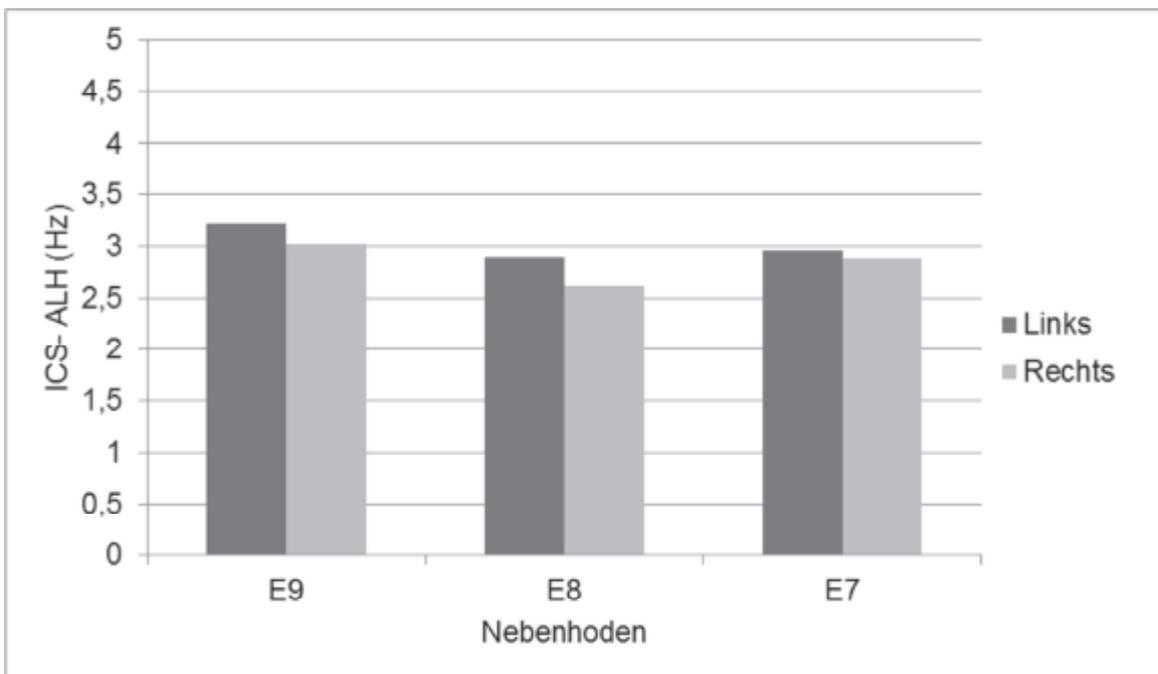
Es waren keine signifikanten Unterschiede in der LIN, STR, WOB zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 47:** LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICS, der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens



a,b,c,r,s,t,x,y: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

**Abb. 48:** LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICS, der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens



Es waren keine signifikanten Unterschiede in der ALH zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 49:** ALH der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICS, der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich

#### 4.6.4 Motilität und Geschwindigkeitsparameter der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach dem Tiefgefrieren mit dem Einfrierautomat mit vorausgegangener Kühlung (ICL)

Die Auftauprobe der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9, tiefgefroren mit dem Einfrierprogramm ICL, lieferten die nachfolgend angegebenen Median-, Minimal und Maximalwerte für die Motilität der Spermien als Ergebnisse (siehe Tab. 26 und Abb. 50). Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens festgestellt.

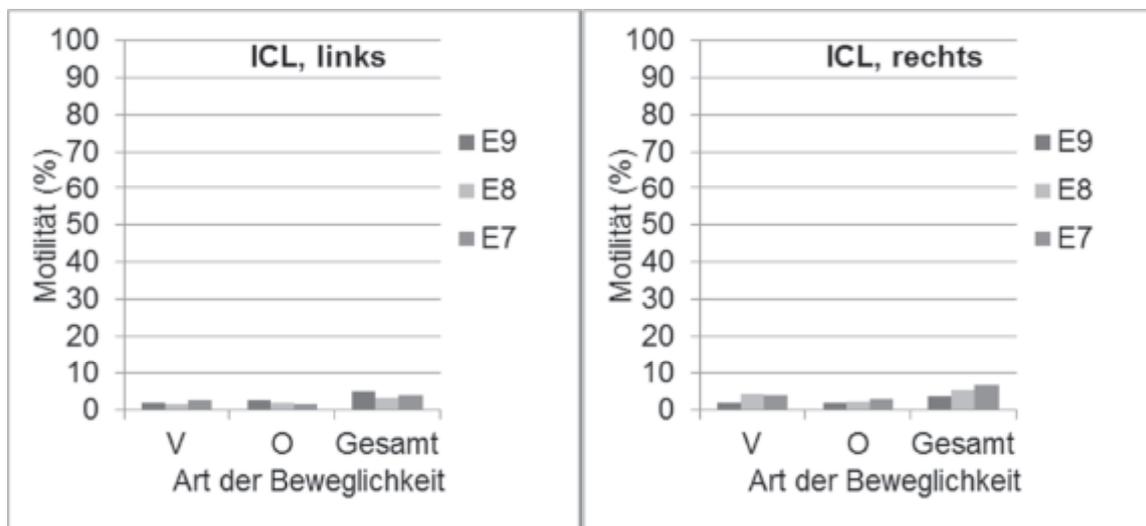
**Tab. 26:** Mittels CASA bestimmte Vorwärts-, Orts-, und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien, tiefgefroren mit ICL, nach dem Auftauen

Beweglichkeit (ICL)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
V (%)	Median	2,02	2,08	1,63	4,17	2,59	4,1
	Min.	0,03	0,43	0,55	0,65	0,12	0,41
	Max.	13,82	16,10	7,88	27,16	20,86	43,38
O (%)	Median	2,65	2	1,83	2,32	1,7	2,82
	Min.	0,4	0,17	0,66	0,62	0,31	0,14
	Max.	5,72	5,27	5,35	7,03	3,59	7,12
Gesamt (%)	Median	4,91	3,77	3,27	5,47	4,14	6,62
	Min.	0,43	0,88	1,88	1,57	0,43	1,23
	Max.	19,54	19,90	13,24	34,18	23,52	50,50

Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens feststellbar.

Im Vergleich der Auftauergebnisse der vier verschiedenen Einfrierprogramme miteinander, bezüglich der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Die Gesamtbeweglichkeit der Spermien von E8 des linken und rechten Nebenhodenschwanzes, tiefgefroren mit ICL, war signifikant höher als bei den Nebenhodenschwanzspermien desselben Abschnitts, welche mit SRS tiefgefroren wurden (siehe Tab. 20 und 26 sowie Abb. 32 und 50).



Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 50:** Motilität (%) der Spermien der linken und rechten Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9, tiefgefroren mit Einfrierprogramm ICL, nach dem Auftauen

Die Analyse der Geschwindigkeitsparameter und Bewegungsmuster der aufgetauten Nebenhodenschwanzspermien, nach Tiefgefrierung mit ICL, lieferte die nachfolgend beschriebenen Median-, Minimal- und Maximalwerte (siehe Tab. 27).

**Tab. 27:** CASA Parameter der Nebenhodenschwanzspermien nach dem Auftauen, tiefgefroren mit ICL

CASA-Parameter (ICL)		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
VSL (µm/s)	Median	41,5	39,98 <sup>a</sup>	45,80	50,07 <sup>b</sup>	48,56	58,00 <sup>b,c</sup>
	Min.	2,31	21,37	23,27	38,46	2,91	25,14
	Max.	49,94	57,29	61,13	64,52	63,81	71,67
VCL (µm/s)	Median	108,51 <sup>x</sup>	113,40 <sup>r,s</sup>	127,68 <sup>y</sup>	117,85 <sup>r</sup>	122,44 <sup>x,y</sup>	145,94 <sup>s</sup>
	Min.	5,70	51,69	71,28	91,68	3,32	75,86
	Max.	142,03	151,13	198,94	135,42	192,26	163,67
VAP (µm/s)	Median	54,64 <sup>a</sup>	59,14 <sup>d</sup>	66,13 <sup>a,b</sup>	61,78 <sup>d,e</sup>	60,72 <sup>b</sup>	76,90 <sup>e</sup>
	Min.	2,39	29,79	37,02	48,80	2,94	35,73
	Max.	71,13	74,06	90,53	76,10	82,23	82,55
LIN	Median	0,34	0,35 <sup>x</sup>	0,37	0,43 <sup>y</sup>	0,36	0,39 <sup>x,y</sup>
	Min.	0,07	0,30	0,19	0,37	0,15	0,22
	Max.	0,40	0,45	0,46	0,50	0,44	0,48
STR	Median	0,68	0,69 <sup>a</sup>	0,69	0,80 <sup>b,c</sup>	0,73	0,78 <sup>c</sup>
	Min.	0,16	0,55	0,38	0,72	0,16	0,48
	Max.	0,76	0,78	0,84	0,83	0,80	0,86
WOB	Median	0,48	0,50 <sup>d</sup>	0,52	0,53 <sup>e</sup>	0,47	0,51 <sup>d,e</sup>
	Min.	0,07	0,45	0,35	0,50	0,15	0,31
	Max.	0,53	0,59	0,56	0,59	0,55	0,59
ALH (Hz)	Median	2,87	3,25	3,06	2,95	3,21	3,20
	Min.	0,33	1,77	1,62	2,45	0,60	1,74
	Max.	3,50	3,71	4,71	3,57	4,30	3,96

a,b,c,d,e,r,s,x,y: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (p < 0,05).

Der Vergleich der Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP sowie der LIN, STR, WOB und ALH der Spermien der verschiedenen Nebenhodenschwanzabschnitte untereinander lieferte die folgenden Ergebnisse (siehe Abb. 51 – 55). Es konnten signifikante Unterschiede zwischen den Nebenhodenschwanzabschnitten festgestellt werden (p < 0,05).

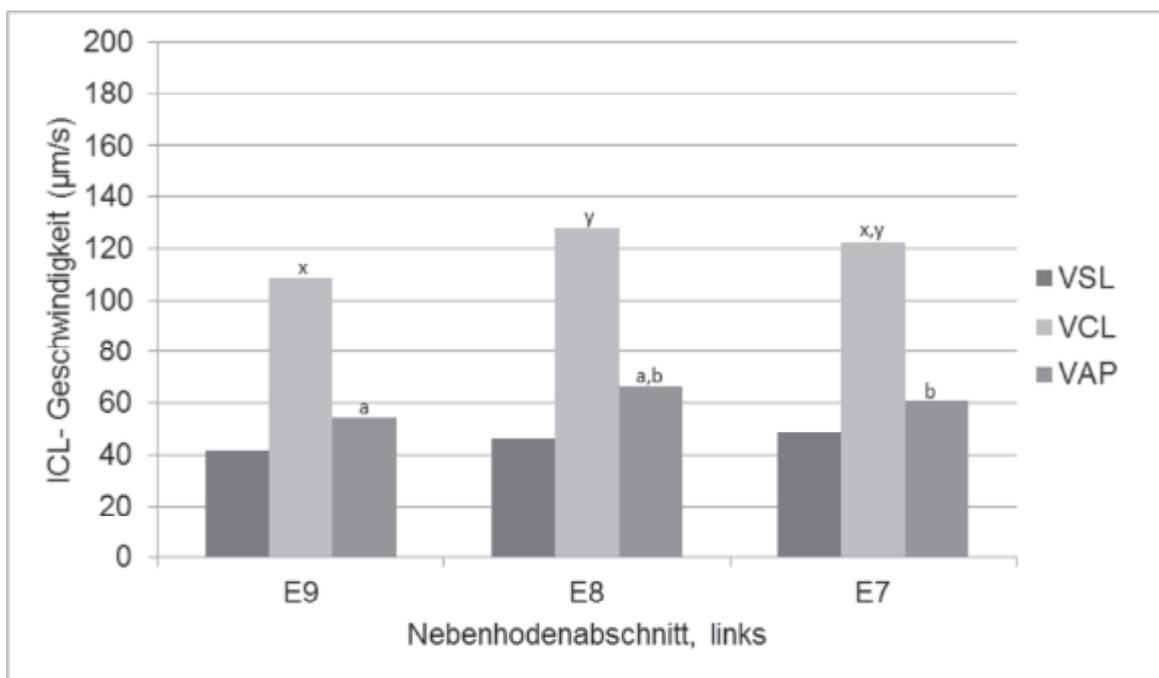
Die VCL und VAP der Spermien, aus dem linken Nebenhodenschwanz, des Abschnitts E8 waren signifikant höher, als die von E9. Die VSL der Spermien von E8 und E7 des rechten Nebenhodens war signifikant höher, als die VSL bei den Spermien von E9. Auch die VCL der Spermien der Abschnitte E8 und E7 unterschied sich signifikant voneinander, es wurde eine signifikant höhere Geschwindigkeit für die Spermien von E7 festgestellt. Außerdem wiesen die Spermien von E7 eine signifikant höhere VAP auf, als die Spermien von E9.

Die LIN, STR und WOB der Spermien von E7 – E9 des linken Nebenhodens unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Spermien der Abschnitte E9 und E8 des rechten

Nebenhodens wiesen signifikante Unterschiede in der LIN, STR und WOB auf. Alle drei Werte waren bei den Spermien von E8 höher, als bei denen von E9. Die STR der Spermien der Abschnitte von E9 war signifikant niedriger, als die von den Spermien von E7 (siehe Tab. 27, Abb. 51 – 54).

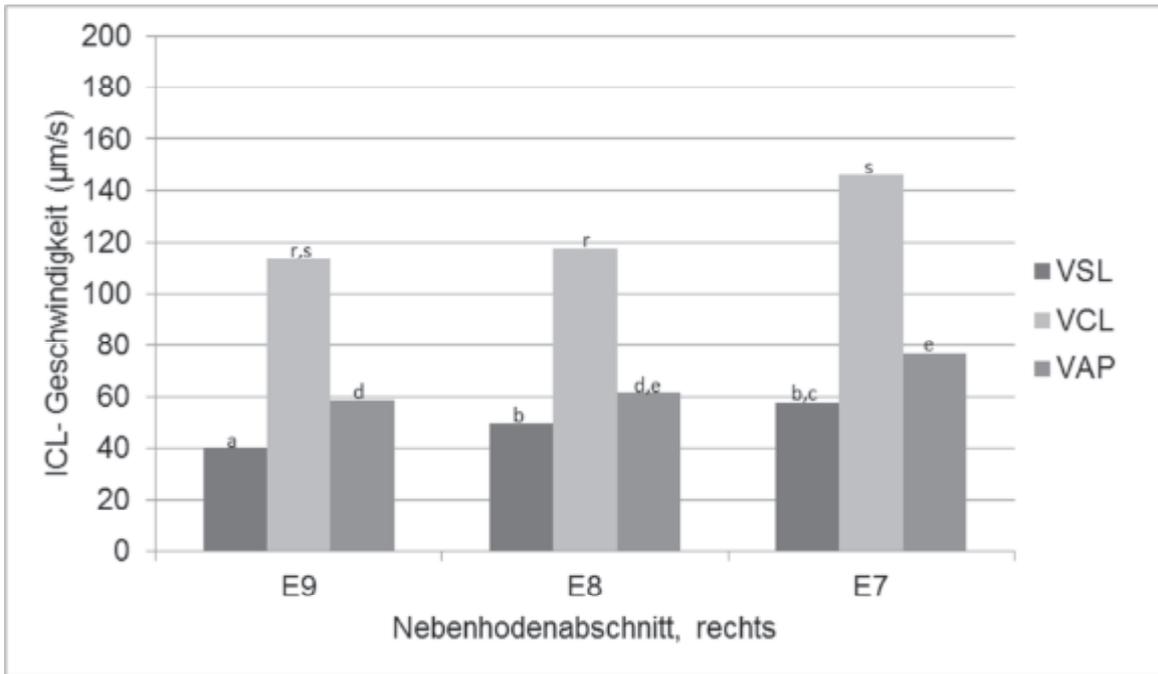
Wurden die Geschwindigkeitsparameter der Spermien, tiefgefroren mit den vier verschiedenen Einfrierprogrammen, verglichen, so ergaben sich signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ).

Die VSL, VCL, VAP und ALH der Spermien aus den Abschnitten E7 und E8 beider Nebenhodenschwänze, tiefgefroren mit ICL, waren signifikant höher als VSL, VCL, VAP und ALH aus denselben Abschnitten, tiefgefroren mit SRS (siehe Tab. 21 und 27 sowie Abb. 33, 34, 37, 51, 52 und 55). Wurden die Geschwindigkeitsparameter der Spermien, tiefgefroren mit ICL, mit denen der mittels SRS, SRL und ICS tiefgefrorenen Spermien verglichen, so ergab sich nur in der ALH zwischen ICS und ICL beider Nebenhodenschwänze ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ). Die ALH der Spermien, tiefgefroren mit ICL, zeigte eine höhere ALH, als die der Spermien, tiefgefroren mit ICS (siehe Abb. 49 und 55).



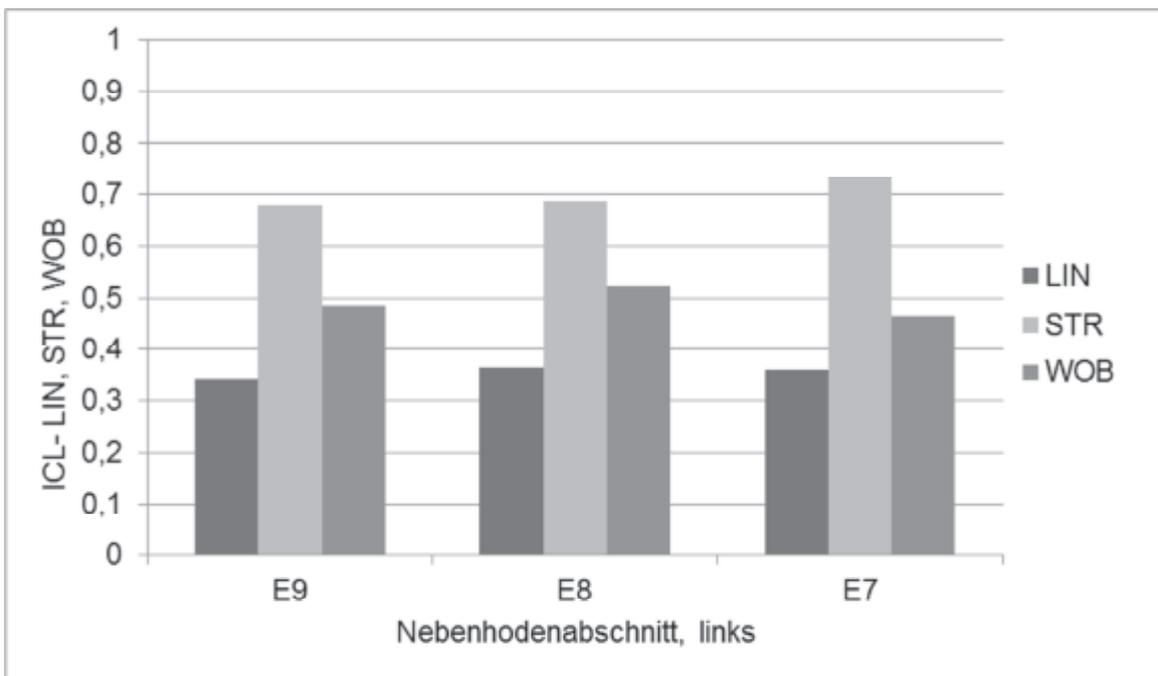
a,b,x,y: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

**Abb. 51:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit ICL tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des linken Nebenhodens



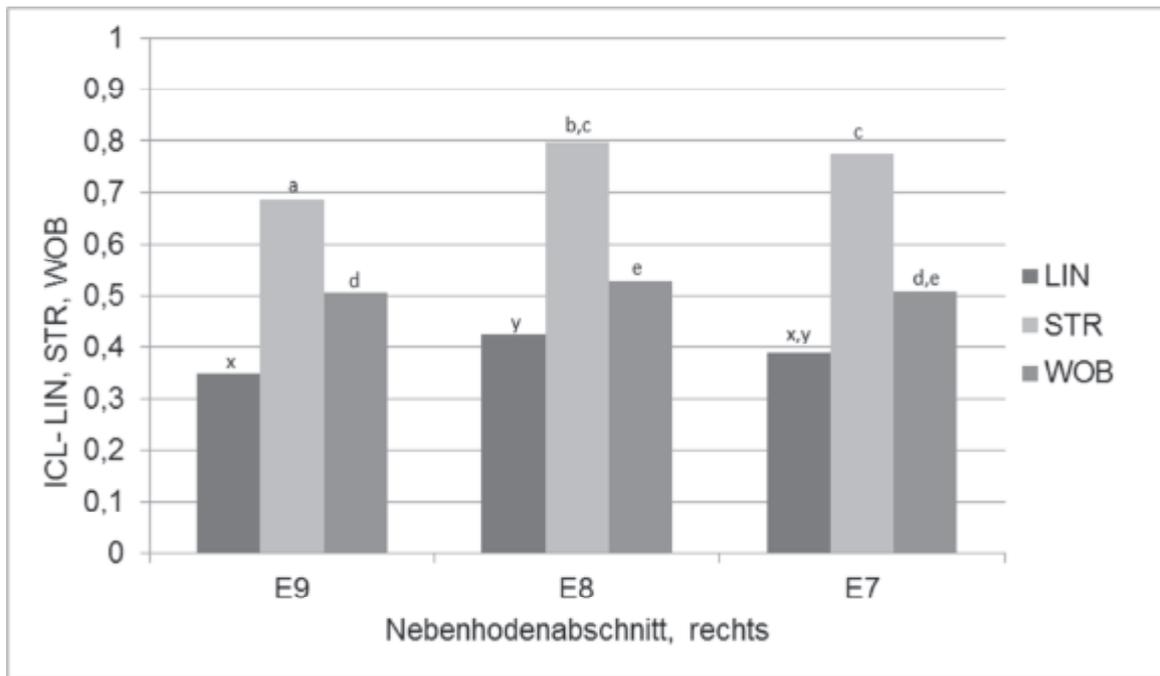
a,b,d,e,r,s: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

**Abb. 52:** Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit ICL tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des rechten Nebenhodens



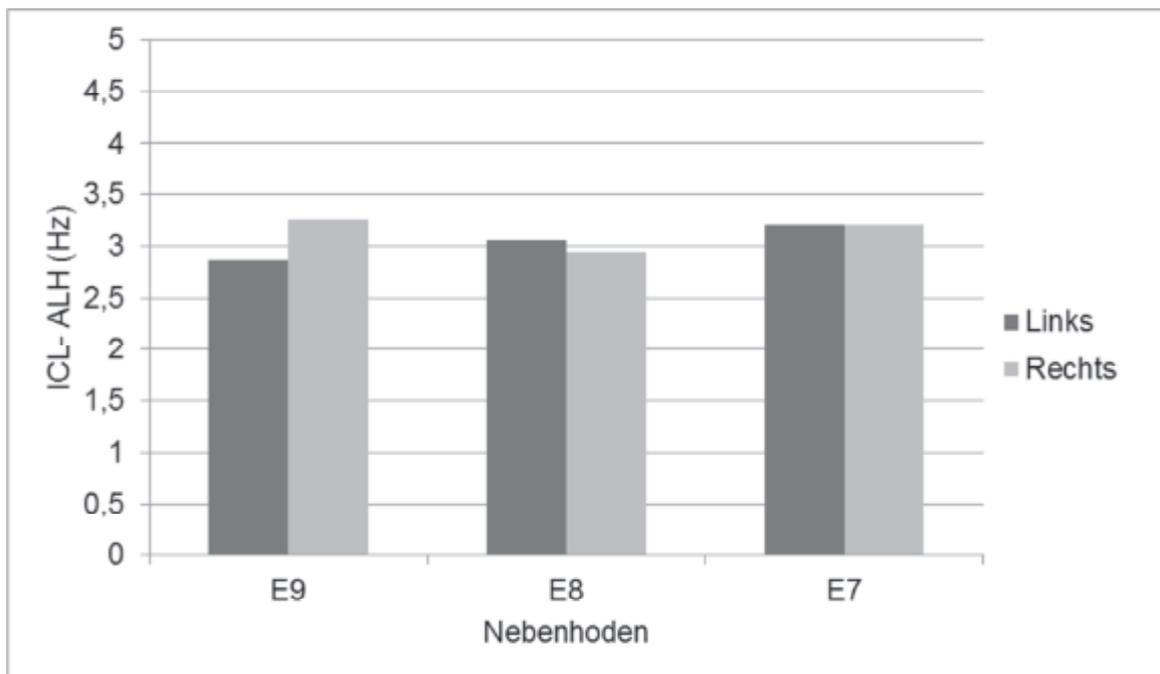
Es waren keine signifikanten Unterschiede in der LIN, STR, WOB zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 53:** LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICL, der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens



a,b,c,d,e,x,y: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

**Abb. 54:** LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICL, der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens



Es waren keine signifikanten Unterschiede in der ALH zwischen den Abschnitten E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens feststellbar.

**Abb. 55:** ALH der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICL, der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich

#### **4.6.5 Vergleich der Auswirkung der Einfriermethoden auf die Auftauergebnisse**

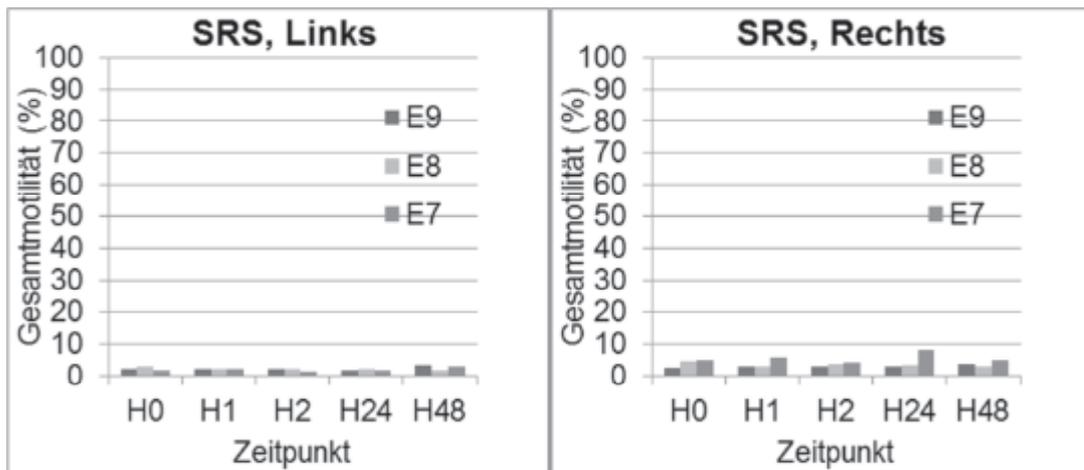
Wurden die Auftauprobe der Spermien von E9 aller Einfriermethoden bezüglich ihrer Gesamt-, Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit miteinander verglichen, so ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Einfriermethoden. Auch für die Geschwindigkeitsparameter VAP, VSL, VCL, STR, LIN, WOB und ALH ergab sich kein signifikanter Unterschied bezogen auf das Einfrierverfahren.

Beim Vergleich der Auswirkung der Tiefgefrieremethode auf die Motilität der Spermien von E8 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gesamtbeweglichkeit der aufgetauten Spermien, eingefroren mit den Methoden SRS und ICL ( $p = 0,0385$ ) sowie zwischen SRS und ICS ( $p = 0,0167$ ). Die Gesamtbeweglichkeit der Spermien, die mit SRS tiefgefroren wurden, war niedriger im Vergleich mit den mittels ICS und ICL tiefgefrorenen Spermien. Kein signifikanter Unterschied wurde beim Vergleich der Vorwärtsbeweglichkeit nach dem Auftauen festgestellt. Die Ortsbeweglichkeit der aufgetauten Spermien, eingefroren mit SRS war signifikant niedriger als die der Spermien, tiefgefroren mit ICS ( $p = 0,0133$ ). Außerdem wurden signifikant höhere Geschwindigkeitsparameter VAP, VCL und ALH bei den Spermien, tiefgefroren mit ICL, im Vergleich mit SRS tiefgefrorenen Spermien festgestellt ( $p = 0,0133, 0,009$  bzw.  $0,0023$ ). Die Unterschiede zwischen den Methoden für die Parameter VCL und ALH können als sehr signifikant beschrieben werden.

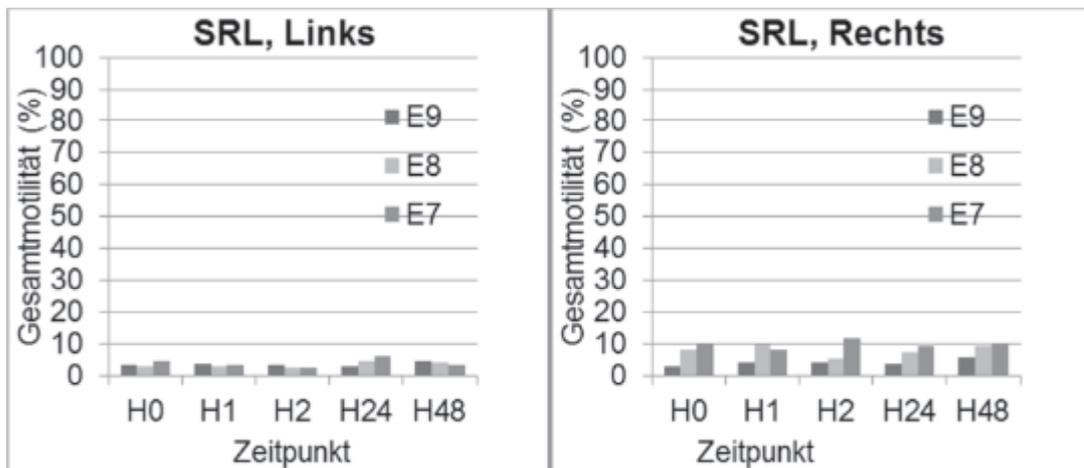
Die verschiedenen Tiefgefrieremethoden hatten keine Auswirkung auf die Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien von E7 nach dem Auftauen. Für die Ortsbeweglichkeit ergab sich lediglich ein signifikanter Unterschied für den Vergleich zwischen SRS und ICS. Die Spermien, tiefgefroren mit SRS, zeigten eine niedrigere Ortsbeweglichkeit ( $p = 0,0499$ ). Die Geschwindigkeitsparameter VAP, VCL und VSL unterschieden sich signifikant voneinander, wurden die Einfriermethoden SRS und ICL direkt miteinander verglichen. Die Geschwindigkeitsparameter der Spermien, tiefgefroren mit SRS, waren niedriger, als die der, mit ICL tiefgefrorenen, Spermien ( $p = 0,0144, 0,0167$  bzw.  $0,006$ ). Beim Vergleich der Auswirkung der Kryokonservierungsmethode auf die ALH ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den aufgetauten Spermien von SRS und ICL ( $p = 0,002$ ) sowie ICL und ICS ( $p = 0,0439$ ). Die ALH war bei den Spermien, tiefgefroren mit ICL, am höchsten, gefolgt von denen tiefgefroren mit ICS und SRS. Die restlichen Geschwindigkeitsparameter unterschieden sich, je nach Einfriermethode, nicht signifikant voneinander.

#### 4.6.6 Haltbarkeit der aufgetauten Nebenhodenschwanzspermien bei der Lagerung bei +4 °C

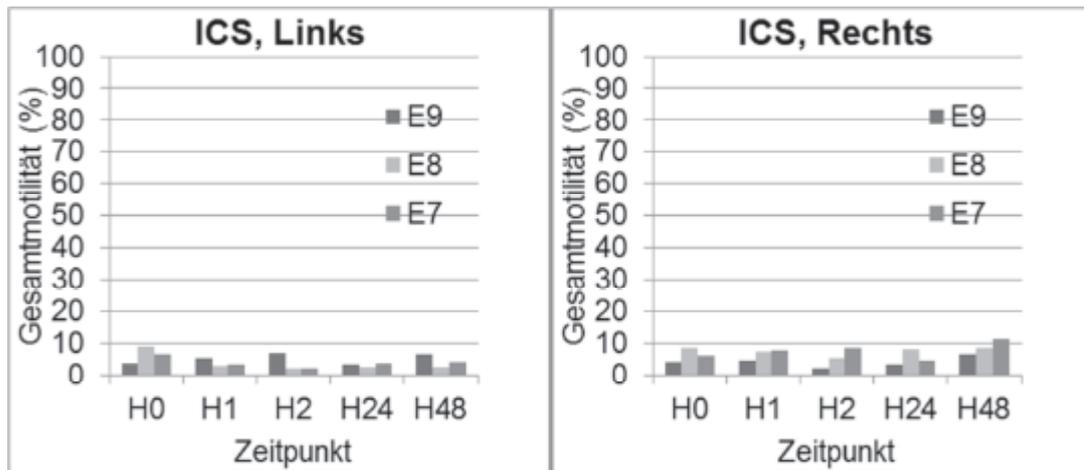
Die Median-, Minimal- und Maximalwerte der Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit sowie der Geschwindigkeitsparameter und Bewegungsmuster VAP, VCL, VSL, LIN, STR, WOB und ALH der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 24, und 48 Stunden werden in Tab. 28 ( siehe Anhang) angegeben. Ein Vergleich der Haltbarkeit nach dem Auftauen anhand der Gesamtmotilität der Nebenhodenspermien zwischen den verschiedenen Einfrieremethoden ist nachfolgend dargestellt (Abb. 56 – 59).



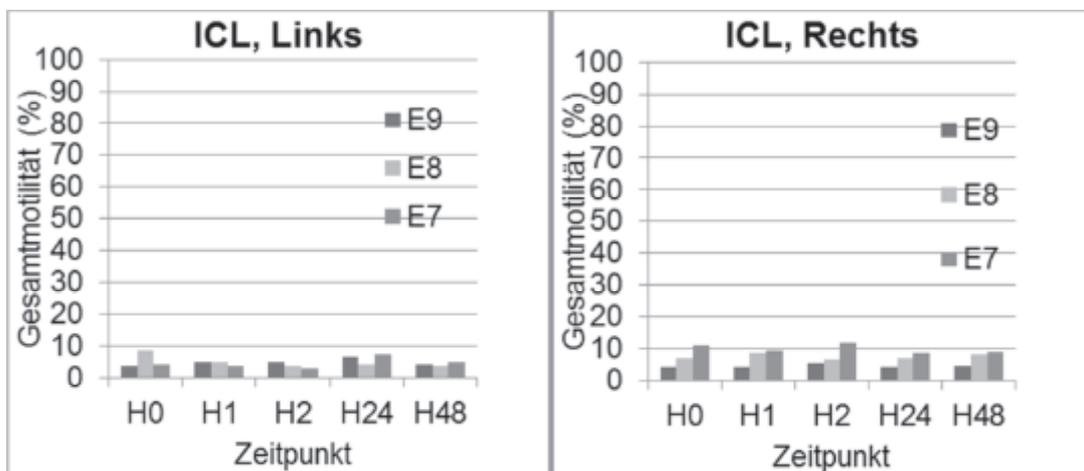
**Abb. 56:** Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9, nach Tieffrieren mit SRS, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, bei der Lagerung bei +4 °C verdünnt im Verhältnis 1+2 zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen



**Abb. 57:** Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9, nach Tieffrieren mit SRL, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, bei der Lagerung bei +4 °C verdünnt im Verhältnis 1+2 zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen



**Abb. 58:** Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9, nach Tieffrieren mit ICS, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, bei der Lagerung bei +4 °C verdünnt im Verhältnis 1+2 zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen



**Abb. 59:** Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9, nach Tieffrieren mit ICL, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, bei der Lagerung bei +4 °C verdünnt im Verhältnis 1+2 zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen

Die Motilität sowie Geschwindigkeitsparameter und Bewegungsmuster der Spermien, tiefgefroren mit den verschiedenen Methoden, wurden auf signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Abschnitten E7 – E9 hin untersucht.

Für die Spermien der verschiedenen Nebenhodenschwanzabschnitte, welche mit dem Einfrierprogramm SRS tiefgefroren wurden, ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt 0. Es konnte ein signifikanter Unterschied in der VSL zwischen den Spermien aller Abschnitte des linken Nebenhodens, welche mit SRL tiefgefroren wurden, festgestellt werden. Die Spermien von E8 zeigten eine höhere Geschwindigkeit, als die von E7 und E9. Wurde die VCL der Spermien von E9 und E8 des linken Nebenhodenschwanzes miteinander verglichen, so zeigten die Spermien von E8 ebenfalls eine höhere Geschwindigkeit auf der gebogenen Linie, als die von E9. Auch die Spermien von E8 des rechten Nebenhodens bewegten sich schneller auf der geraden Linie, als die Spermien von E9. Die Spermien von E8 des linken und rechten Nebenhodens zeigten außerdem eine signifikant höhere VAP, als

die Spermien von E9. In der STR ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Spermien der Abschnitte E9 und E8 des rechten Nebenhodens, die STR der Spermien von E8 war höher. In der ALH unterschieden sich lediglich die Spermien zwischen E9 und E8 des linken Nebenhodens signifikant voneinander, hier war die Kopfauslenkung der Spermien von E8 höher als die von E9. Für die Spermien, tiefgefroren mit ICS, wurde ein signifikanter Unterschied in der VCL, LIN und STR der Spermien des Abschnitts E9 und E8 des rechten Nebenhodens zum Zeitpunkt 0 festgestellt. Die VCL der Spermien von E9 war signifikant höher als die von E8, allerdings waren die LIN und STR bei den Spermien von E8 höher als bei denen von E9. Für die, mit ICL tiefgefrorenen, Spermien konnte lediglich ein signifikanter Unterschied in der VSL, LIN und STR zwischen den Spermien des Abschnitts E9 und E7 des rechten Nebenhodens erhoben werden. Die Spermien von E9 waren deutlich schneller, mit einer höheren VSL, als die Spermien von E7. Die LIN und STR war aber bei den Spermien von E7 höher.

Für die Spermien der verschiedenen Nebenhodenschwanzabschnitte, welche mit dem Einfrierprogramm SRS und ICS tiefgefroren wurden, ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede nach einer Stunde. Es wurde jedoch eine signifikant höhere Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien von E8, im Vergleich zu denen von E9, des rechten Nebenhodens, tiefgefroren mit SRL, festgestellt. Auch die VSL und VCL der Spermien von E8 des rechten Nebenhodens war signifikant höher, als die der Spermien von E9. Bei den Spermien des rechten Nebenhodens, die mit dem Einfrierprogramm ICL tiefgefroren wurden, ergaben sich ebenfalls eine signifikante höhere Gesamtbeweglichkeit sowie eine höhere LIN bei den Spermien von E8 im Vergleich zu denen von E9.

Nach zwei Stunden wurden signifikant höhere Werte für die VAP, LIN, STR und WOB der Spermien von E9 im Vergleich mit Spermien von E7 des linken Nebenhodens, tiefgefroren mit SRS, festgestellt. Auch die Spermien von E9 des linken Nebenhodens, welche mit SRL tiefgefroren wurden, zeigten höhere Werte für die LIN und WOB, als die Spermien von E7. Für die Spermien des linken Nebenhodens, die mit ICS eingefroren wurden, ergaben sich signifikante Unterschiede in der LIN, STR und WOB zwischen den Spermien der Abschnitte des linken Nebenhodens. Die Spermien von E9 zeigten eine höhere LIN und WOB als die Spermien von E8 und E7. Außerdem war die STR der Spermien des Abschnitts E9 größer, als im Abschnitt E8. Bei den Spermien, tiefgefroren mit ICL, wurde lediglich ein signifikant höherer Wert für die WOB der Spermien des Abschnitts E9, im Vergleich zu denen von E7 des linken Nebenhodens festgestellt.

Nach 24 Stunden ergaben sich zahlreiche signifikante Unterschiede für die Spermien des linken Nebenhodens, die mit SRS tiefgefroren wurden. Wurden die Spermien der Abschnitte

E7 und E9 miteinander vergleichen, so konnten signifikant höhere Werte für die Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, LIN, STR, WOB und ALH bei den Spermien von E9 erhoben werden. Die Spermien von E8 wiesen außerdem eine höhere LIN und STR auf, als die Spermien von E7. Die Spermien von E7 und E9 des linken Nebenhodens, die mit SRL tiefgefroren wurden, unterscheiden sich signifikant hinsichtlich ihrer Gesamtmotilität. Die Spermien von E7 waren deutlich beweglicher als die von E9. Die Spermien von E8 des rechten Nebenhodens zeigten eine höhere Vorwärtsbeweglichkeit, als die Spermien von E9. Die STR der Spermien von E9 des rechten Nebenhodens war größer als von E7. Für die Spermien, die mit ICS eingefroren wurden, ergaben sich signifikante Unterschiede in der STR und ALH zwischen den Spermien der einzelnen Abschnitte des linken Nebenhodens. Die Spermien von E9 zeigten eine höhere STR als die von E7. Die ALH der Spermien von E8 war höher als von E9. Außerdem war die WOB der Spermien von E8 des rechten Nebenhodens signifikant höher, als die der Spermien von E9. Es konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich des Haltetests nach 48 Stunden für die Spermien der einzelnen Abschnitte, die mit ICL tiefgefroren wurden, festgestellt werden.

Nach 48 Stunden ergaben sich für die Spermien der verschiedenen Nebenhodenschwanzabschnitte, welche mit dem Einfrierprogramm SRS tiefgefroren wurden, keinerlei signifikante Unterschiede. Jedoch waren die Werte für VSL, VCL, VAP sowie die ALH bei den Spermien von E8 des linken Nebenhodens, welche mit SRL tiefgefroren wurden, signifikant höher als bei den Spermien von E9. Außerdem waren die VAP und ALH der Spermien von E8 signifikant höher als von E7. Bei den Spermien des rechten Nebenhodens war die Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien von E8 höher als bei den Spermien von E9. Die Spermien des Abschnitts E8 des rechten Nebenhodens, die mit ICS eingefroren wurden, zeigten eine höhere Vorwärtsbeweglichkeit sowie VSL, VCL und VAP, als die Spermien von E9. Auch die Spermien des Abschnitts E7 des rechten Nebenhodens wiesen höhere Geschwindigkeitsparameter, VCL und VAP, auf als die Spermien von E9. Bei den Spermien des linken Nebenhodens wurde lediglich eine signifikant höhere STR bei den Spermien von E9 im Vergleich mit denen von E7 festgestellt. Die Spermien des Abschnitts E8 und E7 des rechten Nebenhodens, die mit ICL eingefroren wurden, waren signifikant vorwärtsbeweglicher, als die Spermien von E9. Außerdem zeigten die Spermien von E8 eine höhere VSL und VAP als die Spermien von E9.

#### 4.6.6.1 Vergleich der Auswirkung der Einfriermethode auf die Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien bei der Lagerung bei +4 °C

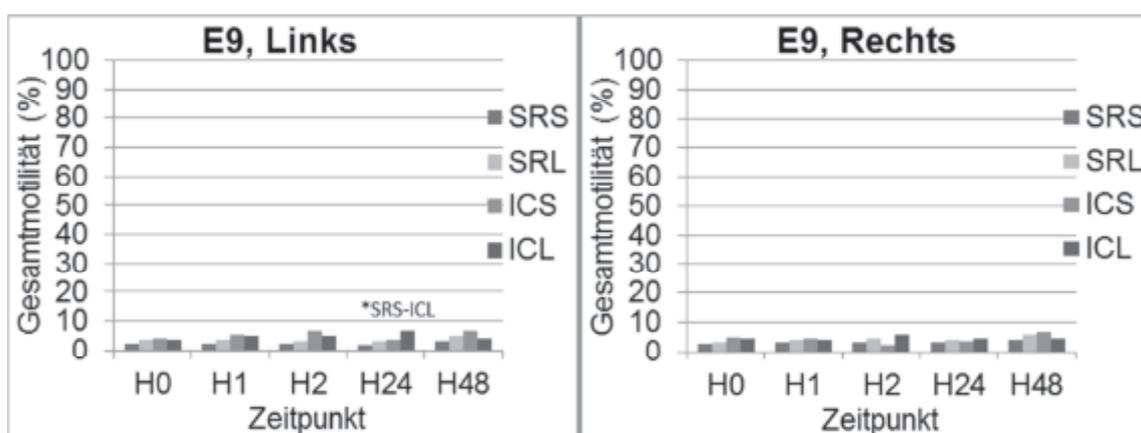
Im Vergleich der Haltetests nach dem Auftauen der Spermien von E9, aller Einfriermethoden untereinander, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Motilitäts- und Geschwindigkeitsparametern zum Zeitpunkt 0.

Wurden die Geschwindigkeitsparameter nach einer Stunde erneut gemessen, so ergab sich für den Haltetest des linken Nebenhodens ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) für die VAP und ALH zwischen den beiden schnellen Einfriermethoden (ohne Kühlung) SRS und ICS. Beide Werte waren bei den Spermien, die mit ICS tiefgefroren wurden, höher. Für die VCL konnte ein signifikanter Unterschied zwischen SRS und ICL erhoben werden, wobei die Spermien die mit ICL tiefgefroren wurden eine höhere VCL aufwiesen.

Nach zwei Stunden wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt.

Nach 24 Stunden fielen die Spermien von E9 des linken Nebenhodens, tiefgefroren mit ICL, mit einer signifikant höheren Gesamtbeweglichkeit als die Spermien, die mit SRS tiefgefroren wurden auf. Nahezu alle Geschwindigkeitsparameter der Spermien aus dem rechten Nebenhodenschwanz, gemessen nach 24 Stunden, der beiden Einfriermethoden, mit der Schwimmrampe (SRS und SRL), unterschieden sich signifikant voneinander. Die Geschwindigkeit der Spermien, gemessen anhand der VSL, VCL und VAP war bei den Spermien, tiefgefroren mit SRL, höher als bei den Spermien, die mittels SRS tiefgefroren wurden. Auch die Werte für STR und ALH waren signifikant höher bei den Spermien, die vor dem Tiefgefrieren gekühlt wurden.

Nach 48 Stunden konnten keine Unterschiede in den Motilitäts- und Geschwindigkeitswerten der Spermien von E9 beider Nebenhoden gemessen werden (siehe Abb. 60).



\*signifikanter Unterschied in der Gesamtbeweglichkeit der Spermien von E9 des linken Nebenhodens zwischen SRS und ICL nach 24 Stunden ( $p < 0,05$ ).

**Abb. 60:** Auswirkung des Einfrierprogramms auf die Haltbarkeit der Spermien von E9, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, nach 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen

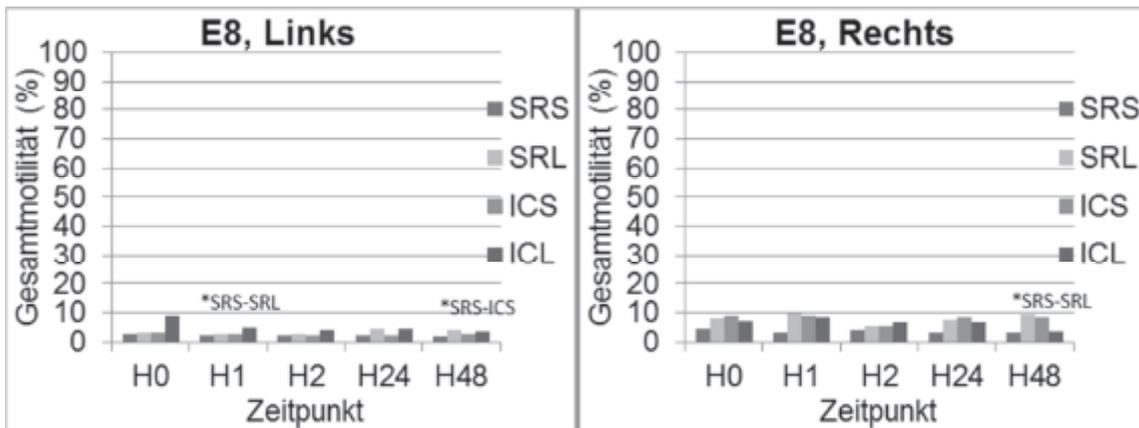
Wurden die Motilitäts- und Geschwindigkeitsparameter der Spermien von E8 des linken Nebenhodens zum Zeitpunkt 0 gemessen, so zeigten die Spermien, tiefgefroren mit ICL, eine signifikant höhere WOB, als die mit SRS tiefgefrorenen Spermien ( $p < 0,05$ ). Für die Haltetests der Spermien des rechten Nebenhodens zum Zeitpunkt 0 ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede.

Nach einer Stunde zeigten nur die Spermien des linken Nebenhodens, tiefgefroren mit SRL, eine signifikant stärkere Gesamtbeweglichkeit, als die Spermien, tiefgefroren mit SRS.

Nach zwei Stunden im Haltetest ergab sich für die Spermien von E8 des linken Nebenhodens ein signifikanter Unterschied in der VSL zwischen SRS und SRL und der ALH zwischen SRS und ICL. Beide Werte waren bei den Spermien, tiefgefroren mit SRS, signifikant niedriger.

Die Einfriermethode hatte keinen Einfluss auf die Haltbarkeit der Spermien von E8 nach 24 Stunden kühler Lagerung.

Jedoch wurden bei der Untersuchung der Spermien des linken Nebenhodens nach 48 Stunden signifikante Unterschiede festgestellt. Die größten Unterschiede gab es zwischen den Einfriervorgängen SRS und SRL. Alle Geschwindigkeitsparameter (VSL, VCL, VAP, LIN, STR, ALH und WOB) der Spermien von E8 unterschieden sich signifikant voneinander, wobei alle Werte bei den Spermien, die mit SRS tiefgefroren wurden niedriger waren. Im Vergleich des Einfrierprogramms SRS mit dem Einfrierprogramm ICL, zeigten die Spermien, die mit ICL eingefroren wurden, ebenfalls höhere Werte für VSL, STR, LIN, WOB und ALH. Beim direkten Vergleich der Spermien, tiefgefroren mit SRL, mit denen die mit ICS eingefroren wurden, zeigten die langsam tiefgefrorenen Spermien signifikant höhere Werte für VAP und WOB. Im Vergleich der beiden Einfriervorgängen mit dem Einfrierautomaten (ICS und ICL) unterschied sich lediglich die WOB, der langsame Einfriervorgang (ICL) lieferte hier die höheren Werte. Bei der Untersuchung der Spermien des rechten Nebenhodens unterschieden sich lediglich die Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit zwischen SRS und SRL signifikant voneinander. Die Spermien, welche mit SRL tiefgefroren wurden, zeigten eine höhere Beweglichkeit. Die Gesamtbeweglichkeit der Spermien, mit SRS tiefgefroren, war signifikant niedriger als von denen die mit ICS tiefgefroren wurden. Auch die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien, tiefgefroren mit SRS, war signifikant niedriger als bei den Spermien die mit ICL eingefroren wurden (siehe Abb. 61).



\*signifikante Unterschiede in der Gesamtbeweglichkeit der Spermien von E8 des linken und rechten Nebenhodens zwischen den Einfrierprogrammen SRS und SRL nach einer bzw. nach 48 Stunden (sowie zwischen SRS und ICS der Spermien von E8 des linken Nebenhodens nach 48 Stunden ( $p < 0,05$ )).

**Abb. 61:** Auswirkung des Einfrierprogramms auf die Haltbarkeit der Spermien von E8, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, nach 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen

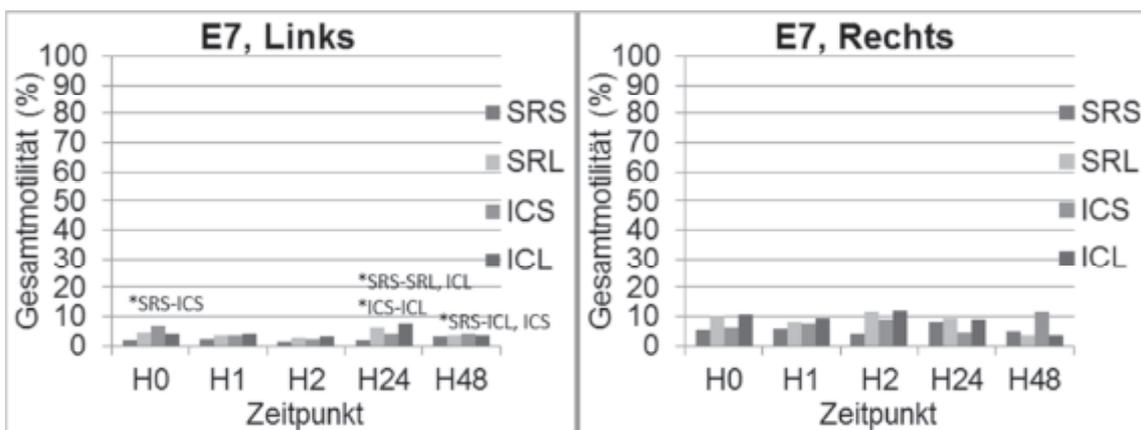
Für die Spermien des Abschnitts E7 des linken Nebenhodens ergaben sich zu Anfang des Haltetests (H0) signifikante Unterschiede in den Motilitäts- und Geschwindigkeitsparametern ( $p < 0,05$ ). Wurden die beiden schnellen Einfrierprogramme miteinander verglichen (SRS und ICS), so war die Gesamtbeweglichkeit, VAP und ALH bei den Spermien, die mit der Schwimmrampe eingefroren wurden signifikant niedriger, als bei den mit dem Einfrierautomaten tiefgefrorenen Spermien. Auch im Vergleich der Einfrierprogramme SRS und ICL lieferten die Spermien, tiefgefroren mit SRS, niedrigere Werte in der VAP, VCL und ALH. Beim Vergleich des Effekts der unterschiedlichen Einfriermethoden auf die Haltbarkeit der Spermien des rechten Nebenhodens ergab sich lediglich ein signifikanter Unterschied für die ALH von ICS und ICL, hier war die ALH bei den Spermien, tiefgefroren mit ICL, höher. Die Haltbarkeit nach einer Stunde, je nach Einfriermethode, unterschied sich nicht signifikant voneinander.

Im Vergleich der Haltbarkeit nach zwei Stunden ergab sich für die Spermien des linken Nebenhodens, lediglich eine signifikant niedrigere Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien, tiefgefroren mit SRS, im Vergleich mit denen tiefgefroren mit ICL. Auch die VAP und VCL der Spermien des rechten Nebenhodens, die mit SRS tiefgefroren wurden, waren niedriger als beim Einfrierprogramm ICL.

Nach 24 Stunden zeigte die Analyse der Spermien des linken Nebenhodens signifikante Unterschiede in zahlreichen Parametern. Im Vergleich der Spermien, tiefgefroren mit SRS, ergibt sich für fast jeden Parameter, die Haltbarkeit der Spermien beschreibend, ein signifikanter Unterschied im Vergleich mit den anderen Einfriermethoden. Die Gesamt-, Vorwärtsbeweglichkeit, VSL, VCL, VAP, STR, LIN, WOB und ALH ist bei den Spermien, tiefgefroren mit SRS, signifikant niedriger, als bei den mit SRL tiefgefrorenen Spermien. Im Vergleich mit dem Einfrierprogramm ICS ergaben sich signifikant niedrigere Werte für die

Parameter: Vorwärtsbeweglichkeit, VSL, VCL, VAP, LIN, STR, LIN und WOB. Auch im Vergleich mit dem Einfrierprogramm ICL gab es signifikante Unterschiede in der Gesamt-, Vorwärtsbeweglichkeit, VSL, VCL, STR, LIN und ALH, diese Werte waren ebenfalls bei den Spermien, tiefgefroren mit SRS, niedriger. Der größte Unterschied in der Haltbarkeit der Spermien von E7 des linken Nebenhodens, eingefroren mit den verschiedenen Methoden, ergibt sich zwischen den Spermien, die mit der Schwimmrampe ohne Kühlung (SRS) und denen die mit dem Einfrierautomaten mit Kühlung (ICL) tiefgefroren wurden. Keinerlei signifikanten Unterschiede in der Haltbarkeit der Spermien von E7 des rechten Nebenhodens wurden festgestellt.

Die Gesamtbeweglichkeit nach 48 Stunden unterschied sich bei den Spermien von E7 des linken Nebenhodens zwischen den Einfriervorgängen SRS und ICL signifikant. Die Spermien, die mit SRS tiefgefroren wurden waren weniger beweglich. Die VSL und STR wies zwischen ICS und ICL einen signifikanten Unterschied auf, beide Werte waren bei den Spermien, die ohne vorherige Kühlung tiefgefroren wurden. Bei der Untersuchung der Spermien des rechten Nebenhodens ergaben sich nach 48 Stunden keine signifikanten Unterschiede (siehe Abb. 62).



\*signifikante Unterschiede zwischen der Gesamtbeweglichkeit der Spermien von E7 des linken Nebenhodens zwischen den Einfrierprogrammen SRS und ICS zum Zeitpunkt 0. Außerdem zwischen SRS und ICS bzw. ICL und ICS sowie SRS und ICL bzw. ICS nach 48 Stunden ( $p < 0,05$ ).

**Abb. 62:** Auswirkung des Einfrierprogramms auf die Haltbarkeit der Spermien von E7, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, nach 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen

## **5. Diskussion**

Als größter extragonadaler Spermienreservoir stellt der Nebenhoden eine Spermienreserve dar, die im Falle des unerwarteten Todes eines Tieres zur Verfügung steht. In der Wildtiermedizin dient die Gewinnung von Nebenhodenspermien post mortem schon lange der Arterhaltung und Sicherung seltenen Genmaterials (KUSUNOKI et al. 2001, FICKEL et al. 2007). In der Pferdezucht bietet die Gewinnung von Nebenhodenspermien nach dem Tod oder einer notwendigen Kastration die Möglichkeit Genmaterial zu erhalten und den Hengst optimal ökonomisch auszunutzen. Bis zu 96 Stunden post mortem bleiben equine Nebenhodenspermien bei kühler Lagerung im Nebenhoden vital und beweglich (BRUEMMER et al. 2002), so dass Handlungsspielraum bestehen bleibt, sollte ein Hengst unerwartet versterben.

Das Ziel dieser Studie war es, neue Erkenntnisse über die Eigenschaften von Nebenhodenschwanzspermien, gewonnen aus unterschiedlichen Nebenhodenschwanzabschnitten, zu erlangen. Es wurden die Spermienkonzentration und -gesamtzahl in den drei Regionen bestimmt und verglichen. Die Auswirkung unterschiedlicher Verdüner (EquiPro® und Gent) auf die Nebenhodenschwanzspermien wurde getestet. Die Tiefgefrierbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien wurde anhand der Motilitäts- und Geschwindigkeitsparameter vor und nach der Kryokonservierung analysiert. Auch die Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien vor und nach dem Tiefgefrieren wurde untersucht.

### **5.1 Auswahl der Hengste**

Für die vorliegende Studie wurden alle Hengste älter als drei Jahre, die von Mai bis November 2011 an der Klinik für Pferde der FU Berlin kastriert wurden, genutzt. Der Altersdurchschnitt lag bei fünf Jahren (3 bis 14 Jahre). Keiner der kastrierten Hengste war zuvor in der Zucht eingesetzt worden. Bei den erfolgten Kastrationen handelte es sich um Routineeingriffe um hengstiges Verhalten zu unterbinden. Eine Absamung vor der Kastration war nicht möglich, da alle Hengste unerfahren in der Zucht waren.

Nach BADER (2001) reicht die Phase der Pubertät beim Hengst vom sechsten Lebensmonat bis zum zweiten Lebensjahr. Innerhalb dieser Zeit kommt es zur Reifung des Genitaltraktes. NADEN et al. (1990) gibt für die Pubertät einen Zeitraum zwischen dem ersten und zweiten Lebensjahr an. In seiner Studie wurden bei der Kastration von Hengsten mit zwei Jahren weniger Spermien aus dem Nebenhoden gewonnen, als bei Hengsten im Alter von fünf bis neun Jahren untersucht von AMANN et al. (1979). Auch die Größe des Nebenhodens war deutlich geringer bei den jüngeren als bei den älteren Hengsten. Nach DOWSETT und KNOTT (1996) werden zahlreiche Parameter bezüglich der Samenqualität vom Alter beeinflusst. Hierzu gehören Ejakulatvolumen, Spermienkonzentration und -gesamtzahl, Vitalität und das Auftreten von morphologischen Anomalien. Eine schlechtere Samenqualität wurde bei Hengsten unter drei und über vierzehn Jahren festgestellt.

## **5.2 Makroskopische Untersuchung des Nebenhodens**

### **5.2.1 Nebenhodengewicht**

Das, in dieser Studie ermittelte, Gewicht der Nebenhoden ist ca. doppelt so hoch wie das von NADEN et al. (1990) bestimmte Gewicht bei fünfzehn zweijährigen Quarter Horse Hengsten von durchschnittlich 21,5 Gramm. Auch von AMANN et al. (1979) wurde ein geringeres Gewicht für den gesamten Nebenhoden ermittelt. Es wurden Hengste leichter Rassen im Alter zwischen zwei und vier Jahren untersucht.

Das Durchschnittsalter der in der vorliegenden Studie untersuchten Hengste lag bei fünf Jahren. An Rassen waren Traber, Vollblüter, Warmblüter, ein Quarter Horse und ein Lusitano vertreten. Das durchschnittliche Körpergewicht dieser Hengste betrug 520 kg. Es ist anzunehmen, dass Alter und Körpergewicht einen Einfluss auf das Nebenhodengewicht bei Hengsten zwischen zwei und vier Jahren haben (WISHY 1974). Außerdem ist entscheidend wie viel von der bindegewebigen Hülle und des umliegenden Gewebes vor dem Wiegen entfernt wurde.

## **5.3 Gewinnung und Dichtebestimmung der Nebenhodenschwanzspermien**

### **5.3.1 Gewinnung von Nebenhodenschwanzspermien**

In der vorliegenden Studie wurden die Nebenhodenschwanzspermien aus dem Abschnitt E9 durch retrograde Spülung gewonnen. Bei den Abschnitten E7 und E8 wurde die Flotationsmethode angewendet. Die Methode der retrograden Spülung wird von zahlreichen Autoren beschrieben (BRUEMMER et al. 2002, MORRIS et al. 2002, CARY et al. 2004, MARTINEZ-PASTOR et al. 2006, NEILD et al. 2006, EICHELBERGER et al. 2007, PAPA et al. 2008, PASQUINI et al. 2008, DAS et al. 2010, HEISE et al. 2010). Auch die Flotationsmethode wird häufig genannt (CARY et al. 2004, MARTINEZ-PASTOR et al. 2006, EICHELBERGER et al. 2007) und findet vor allem bei Tieren mit kleineren Nebenhoden Anwendung (AN et al. 1999, HEWITT et al. 2001, FILLIERS et al. 2010).

Die retrograde Spülung ist nur bei Tieren mit ausreichend weitem Lumen des Nebenhodenganges praktikabel, da im Falle eines zu engen Lumens der Druck, mit dem die Flüssigkeit durch den Gang befördert werden muss, zu hoch ist. In dieser Studie konnte die retrograde Spülung nur beim letzten Nebenhodenabschnitt E9 angewendet werden. In den Abschnitten E7 und E8 war das Lumen des Nebenhodenganges zu eng und eine Spülung nicht möglich. Als Grenze zwischen Samenleiter und Nebenhodengang des Nebenhodenabschnitts E9 wurde die Lokalisation der letzten, sichtbaren Gangwindung definiert. Die genaue Grenze wurde vorher nicht beschrieben und wurde für den Versuch als solche bestimmt. Beim Vergleich beider Methoden miteinander durch CARY et al. (2004) und EICHELBERGER et al. (2007) wurden ähnliche Spermienkonzentrationen bestimmt.

Allerdings kommt es bei der Flotationsmethode zu einer stärkeren Kontamination mit Fremdzellen und Blut (EICHELBERGER et al 2007), diese Tatsache konnte in der von uns durchgeführten Studie ebenfalls bestätigt werden.

### **5.3.2 Dichtebestimmung und Spermiengesamtzahl im Nebenhoden und Nebenhodenschwanz**

Nach AMANN et al. (1979) enthält der Nebenhodenschwanz unabhängig vom Alter des Hengstes 62 % der Spermienreserve. Es wurde die durchschnittliche Anzahl an Spermien pro Nebenhodenschwanz bei zwei bis vier, fünf bis neun und zehn bis sechzehn jährigen Hengsten bestimmt. Bei den jüngsten Hengsten war die Anzahl mit 18,7 Milliarden deutlich geringer als bei den älteren Hengsten mit 25,8 Milliarden und 28 Milliarden Spermien pro Nebenhodenschwanz. JIMENEZ et al. (1987) ermittelten 3,96 Milliarden Spermien pro Nebenhodenschwanz. NADEN et al (1990) erhielten durchschnittlich 6,49 Milliarden Spermien pro Nebenhodenschwanz bei zweijährigen Quarter Horses. EICHELBERGER et al. (2007) errechnete eine Spermiengesamtzahl zwischen 5 und 18 Milliarden und CARY et al. (2004) 4,5 Milliarden pro Nebenhodenschwanz. Von JAMES et al. (2002) wurden 5,6 Milliarden Spermien pro gesamten Nebenhoden angegeben. FIORATTI et al. (2008) gibt eine Spermienkonzentration von 103,59 Millionen Spermien pro Milliliter im Nebenhodenschwanz an.

In der vorliegenden Studie wurde der Nebenhodenschwanz in drei Abschnitte unterteilt und von jedem Abschnitt die Spermienkonzentration in Millionen pro Milliliter sowie die Spermiengesamtzahl in Milliarden bestimmt. Es wurde eine Zunahme der Spermienkonzentration und -gesamtzahl von E7 zu E9 hin festgestellt. Sowohl bei der Spermienkonzentration als auch bei der Spermiengesamtzahl aller Abschnitte wurden große Schwankungsbreiten festgestellt. Die Spermiengesamtzahl, bestimmt mit dem NucleoCounter, des linken und rechten Abschnitts E9 lag mit 14,97 (7,28 – 20,02) Milliarden und 10,69 (1,99 – 19,40) Milliarden im Median über den von NADEN et al. (1990), CARY et al. (2004) und JAMES et al. (2002) angegebenen Werten.

In allen Studien werden große Schwankungsbreiten in der Spermienanzahl pro Nebenhoden bzw. Nebenhodenschwanz angegeben. Die Spermienkonzentration und -gesamtzahl im Nebenhodenschwanz wird maßgeblich vom Alter bestimmt (WISHY 1974, NADEN et al. 1990). Eine vorangegangene Ejakulation verändert die Anzahl an Spermien in Nebenhodenkopf und -körper nicht, reduziert aber den Spermiengehalt im Nebenhodenschwanz um 30 % (AMANN et al. 1979). FIORATTI et al. (2008) fanden eine positive Korrelation zwischen Hodengewicht und -volumen und der im Nebenhodenschwanz festgestellten Spermienkonzentration heraus. In der vorliegenden Studie wurde allerdings

nur eine schwach positive Korrelation zwischen dem Nebenhodengewicht und der Spermienkonzentration und -gesamtzahl aller Nebenhodenschwanzregionen festgestellt.

### **5.3.3 Vergleich der Dichtebestimmung mit der Zählkammer nach BÜRKER-TÜRK und dem NucleoCounter®**

Die Bestimmung der Spermienkonzentration mit der Zählkammer wird von der WHO (World Health Organisation) als Goldstandard angesehen und empfohlen (HANSEN et al. 2006, LOVE 2012). Nachteilig an der Zählkammermethode ist allerdings der hohe Arbeitsaufwand, der schlecht in den Routinebetrieb großer Zuchtstätten zu integrieren ist. Die Spermienkonzentration kann auch instrumentell mittels Spektrophotometrie, Durchflusszytometrie und fluoreszenz-basierter Spermienzählung (NucleoCounter® SP-100) ermittelt werden (SIEME 2009, BAUMBER-SKAIFE 2011, LOVE 2012).

In der vorliegenden Studie wurde eine starke Korrelation zwischen der Spermienkonzentration, bestimmt mit der Zählkammer nach BÜRKER-TÜRK und dem NucleoCounter® SP-100, festgestellt. Diese Ergebnisse decken sich mit denen aus Studien von RIGBY et al. 2001, HANSEN et al. 2006, ANZAR et al. 2009 und MORELL et al. 2010. Die Zählkammermethode zeigt nach JEQUIER und UKOMBE (1983) allerdings eine hohe Varianz von 44,3 % zwischen wiederholten Zählungen. Diese tritt trotz langjähriger Erfahrung der Untersucher auf und ist den Autoren nach inakzeptabel. Auch RIGBY et al. (2001) verglichen drei Zählkammermethoden mit vier photometrischen Methoden und konnten die höchste Varianz von 9,6 % zwischen den wiederholten Auszählungen bei den Zählkammermethoden feststellen. ANZAR et al. (2009) hebt hervor, dass die Durchflusszytometrie die genaueste Methode darstellt, allerdings mit sehr hohen Anschaffungskosten verbunden ist und geschultes Personal erfordert. In seiner Studie wurden die niedrigsten Spermienkonzentrationen von allen Methoden mit der Zählkammer bestimmt. Es wird zu bedenken gegeben, dass dadurch eine Unterschätzung der tatsächlichen Spermienkonzentration erfolgen könnte. Die spektrophotometrische Messung der Spermienkonzentration ist am wenigsten spermien-spezifisch. Besonders in verdünnten Proben, kann es durch Fremdmaterial zur Überschätzung der tatsächlichen Spermienkonzentration kommen (LOVE 2012). HANSEN et al. (2006) gibt an, dass die Spektrophotometrie die geringste Reproduzierbarkeit im Vergleich mit drei anderen Messmethoden (Zählkammer, NucleoCounter® SP-100, CASA-System) aufweist.

Die Bestimmung der Spermienkonzentration mit dem NucleoCounter® ist weniger zeitintensiv als die Zählkammermethode. Die Bedienung ist einfach. Das Gerät ist teurer in der Anschaffung und der Nutzung aufgrund der Verwendung von Einmalcassetten, als die Zählkammer, aber günstiger als die Durchflusszytometrie. Zusätzlich lässt sich mit dem

NucleoCounter® die Vitalität von Spermien bestimmen. Der NucleoCounter® ist praktikabel und gut in der Praxis einsetzbar.

## **5.4 Motilität und Geschwindigkeiten der Nebenhodenschwanzspermien der Segmente E7 – E9 vor der Kryokonservierung unter Verwendung verschiedener Verdüner**

### **5.4.1 Motilität der Nebenhodenschwanzspermien nach Verdünnung mit Frischsamen- und Tiefgefrierverdünner**

Für die Aufbereitung der Nebenhodenspermien werden unterschiedliche Verdüner genutzt. Häufig finden herkömmliche Magermilchverdüner Anwendung (JIMENEZ et al. 1987, BRAUN et al. 1994, CARY et al. 2004, MELO et al. 2008). PASQUINI et al. (2008) verglich vier verschiedene Verdüner, hinsichtlich ihrer Auswirkung auf die epididymale Spermienmotilität vor und nach Tiefgefrierung, miteinander. Ein kommerzieller Frischsamenverdünner BotuSemen™ (mit unbekannter Zusammensetzung), Seminalplasma sowie TALP-Verdünner mit zwei verschiedenen Zusätzen wurden untersucht. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit vor dem Tiefgefrieren festgestellt. Die Gesamtmotilität lag im Durchschnitt zwischen 75 und 85 %, die Vorwärtsbeweglichkeit zwischen 30 und 40 %. In anderen Studien wurde eine Vorwärtsbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien von ca. 30 % festgestellt (JIMENEZ et al 1987, TIPLADY et al 2002, CARY et al 2004). MONTEIRO et al. (2011) berichteten von einer Vorwärtsbeweglichkeit von durchschnittlich 10 % und einer Gesamtbeweglichkeit von 30 %, wohingegen GUIMARÃES et al. (2012) eine Vorwärtsbeweglichkeit von 15,5 % feststellen konnten.

In der vorliegenden Studie wurden die Nebenhodenschwanzspermien mit EquiPro™ verdünnt und als Tiefgefrierverdünner wurde der Gent-Verdünner verwendet. Als CPA wurde Glycerol in einer Konzentration von 2,5 % eingesetzt. GRAHAM (1996) empfiehlt den Einsatz von 2,5 bis 5 % Glycerol. ECOT et al. (2000) erzielten die besten Ergebnisse mit 3,5 % Glycerol. Die Spermien des linken Nebenhodens wurden direkt nach der Kastration aufbereitet. Die Spermien des rechten Nebenhodens wurden bei Raumtemperatur im Nebenhoden belassen und gelagert (zwischen 2 und 4 Stunden). Es ergaben sich Unterschiede in der Vorwärts- und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien von E9 des linken und rechten Nebenhodens.

Die Vorwärtsbeweglichkeit links war nach Verdünnung mit EquiPro™ mit 60 % doppelt so hoch, wie rechts mit 28 %. Außerdem war eine Zunahme der Vorwärts- und Gesamtbeweglichkeit von E7 zu E9 festzustellen. In den Abschnitten E8 und E7 ergaben sich keine starken Unterschiede in der Vorwärts- und Gesamtbeweglichkeit zwischen den beiden Nebenhoden. Die Beweglichkeit der linken Nebenhodenschwanzspermien von E9

liegt deutlich über der von JIMENEZ et al. (1987) TIPLADY et al. (2002), CARY et al. (2004) und GUIMARÃES et al. (2012) festgestellten Beweglichkeit, lag allerdings unter denen von PASQUINI et al. (2008) ermittelten Werten.

Die Beweglichkeit der rechten Nebenhodenschwanzspermien deckt sich mit denen der vorher genannten Autoren (JIMENEZ et al 1987, TIPLADY et al 2002, CARY et al 2004). Nach der Verdünnung mit Gent-Verdüner wurde in der vorliegenden Studie eine höhere Motilität der Nebenhodenschwanzspermien von E7 und E8 sowie der Spermien des rechten Abschnitts E9 im Vergleich mit der Motilität nach Verdünnung mit EquiPro™ festgestellt. Es ergab sich eine größere Steigerung der Motilität für die Spermien des rechten Nebenhodenschwanzes, als für die des Linken.

In einer Studie von PAPA et al. (2008) wurde die Beweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien vor dem Tiefgefrieren, verdünnt mit drei verschiedenen Tiefgefrierverdünnern, verglichen. Der Tiefgefrierverdünner BotuCrio® war den anderen, herkömmlichen Verdünnern (INRA-82, Laktose-EDTA) überlegen und lieferte eine Vorwärts- und Gesamtbeweglichkeit von 28 % und 74 %. Die Gesamtbeweglichkeit lag somit höher als bei den Nebenhodenschwanzspermien aller Regionen der vorliegenden Studie mit Ausnahme der des rechten Abschnitts E8, welche ebenfalls bei 74 % lag. Die Vorwärtsbeweglichkeit, der mit Gent-Verdüner verdünnten Proben, lag zwischen 17 und 66 %. Sie war mit Ausnahme im linken Abschnitt E7 immer höher als 28 %. In einer Studie von MONTEIRO et al. (2011) zeigte sich nach Verdünnung mit BotuCrio® eine Vorwärtsbeweglichkeit von 46 % und eine Gesamtbeweglichkeit von 84 %.

Die geringere Beweglichkeit der Spermien von E9 des rechten Nebenhodens nach der ersten Verdünnung könnte durch die längere Lagerung im Nebenhoden bei Raumtemperatur erklärt werden. BRUEMMER et al. (2002) berichtet, dass die 24-stündige, kühle Lagerung des Nebenhodens vor der Gewinnung der Spermien bei 67 % der Hengste keine Auswirkung auf die Beweglichkeit der Spermien nach dem Auftauen hat. NEILD et al. (2006) verglichen den Effekt der Lagerung im Nebenhoden für 24 Stunden, gekühlt und bei Raumtemperatur, auf die Beweglichkeit der Spermien nach dem Auftauen. Die Beweglichkeit nach Kryokonservierung lag, bei den gekühlt gelagerten Nebenhodenschwanzspermien, deutlich höher. In einer Untersuchung von MONTEIRO et al. (2011) zeigten sich nur geringe Abweichungen der Vorwärts- und Gesamtbeweglichkeit der sofort aufbereiteten und der gekühlt gelagerten Nebenhodenschwanzspermien.

Als Mindestanforderung an das Ejakulat des Hengstes werden eine Gesamtbeweglichkeit von 70 % und eine Vorwärtsbeweglichkeit von 50 % angesehen (WEITZE 2001). Die Motilitätswerte der Spermien aller Nebenhodenschwanzregionen beider Nebenhoden lagen unter den Mindestanforderungen. Zur Besamung mit Frischsamen müssen mindestens 300

Millionen vorwärtsbewegliche Spermien verwendet werden (SIEME 2009). Vergleicht man die Beweglichkeit ejakulierter Spermien mit denen von Nebenhodenschwanzspermien nach entsprechender Aufbereitung, so ist diese deutlich höher bei den ejakulierten Spermien (BRAUN et al. 1994, MONTEIRO et al. 2009, GUIMARÃES et al. 2012).

Der Nebenhodenschwanz dient der Speicherung von Milliarden Spermien. Während des Transports durch den Nebenhoden erlangen die Spermien die Fähigkeit sich zu bewegen (DACHEUX et al. 2003; COOPER 2007). Treten die Spermien vom Hoden in den Nebenhoden ein, so sind sie noch unbeweglich. Im Verlauf des Transports durch den Nebenhodengang vom Nebenhodenkopf zum Nebenhodenschwanz steigt die Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien an (ROBAIRE et al. 2006). Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass die Spermien des Abschnitts E9, des letzten Abschnitts vor Übergang in den Samenleiter, die höchsten Motilitätswerte aufweisen. Diese zuvor erworbene Fähigkeit zur Motilität wird, während der Speicherung der Spermien im Nebenhodenschwanz, wieder gehemmt, um Energie zu sparen und einen frühzeitigen Tod der Spermien zu verhindern. Zu den hemmenden Faktoren zählen die hohe Konzentration der Spermien, eine Verringerung der Natriumionenkonzentration und die Erhöhung der Viskosität der Nebenhodenflüssigkeit durch Sekretion von Mukoproteinen (COOPER 1998). Die Ionenzusammensetzung, der pH-Wert und membranbindende, hochmolekulare Glykoproteine wurden ebenfalls als, die Motilität beeinflussende Faktoren, nachgewiesen (USSELMANN und CONE 1983, CARR und ACOTT 1984; YEUNG und COOPER 2002). Um den motilitätshemmenden Effekt des Nebenhodensekrets zu minimieren, wurden die Nebenhodenschwanzspermien vor der Verdünnung zentrifugiert und das Nebenhodensekret entfernt. Die Spermienkonzentration wurde durch die Verdünnung mit EquiPro™ auf maximal 800 Millionen pro Milliliter eingestellt. Diese Spermienkonzentration ist immer noch sehr hoch und kann sich negativ auf die Motilitätsanalyse auswirken. Für die Anwendung von CASA zur Motilitätsanalyse wird eine Spermienkonzentration von 20 bis 50 Millionen (DAVIS und KATZ 1993), 40 Millionen (MORTIMER 2000) und 25 Millionen (BAUMBER-SKAIFE 2011) pro Milliliter empfohlen. Für eine adäquate Analyse mussten, insbesondere bei den Nebenhodenschwanzspermien des Abschnitts E9, weitere Verdünnungsschritte unternommen werden. Das Verdünnungsverhältnis von 1:4 wurde dabei nicht überschritten (BRINSKO et al. 2011) Jede weitere Verdünnung kann sich negativ auf die Spermienmotilität auswirken.

Außerdem ist zu bedenken, dass alle Hengste, die in der Studie verwendet wurden, vorher nicht regelmäßig abgesamt wurden. Der Nebenhodenschwanz kann daher eine große Anzahl veralteter Spermien enthalten (GEBAUER et al. 1974 a). Um die extragonadale Spermienreserve zu entleeren und zu stabilisieren, hätte man die Hengste vor der Kastration

mehrfach absamen lassen müssen. Das war in dieser Studie allerdings nicht möglich, da die Hengste zur Routinekastration gebracht wurden und unerfahren in der Zucht waren.

#### **5.4.2 Geschwindigkeit der Nebenhodenschwanzspermien nach Verdünnung mit Frischsamen- und Tiefgefriererdünnern**

Die Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP der Nebenhodenschwanzspermien des linken Nebenhodenabschnitts E9 waren geringgradig höher als die des Rechten. Ansonsten zeigten die Abschnitte E7 bis E9 ähnliche Geschwindigkeitswerte. Nach der Verdünnung mit Gent-Verdünnern wurde eine geringgradige Erhöhung in den Werten für VSL, VCL, VAP sowie ALH im Vergleich mit, den mit EquiPro™ verdünnten Proben, festgestellt. Der Unterschied war allerdings nicht signifikant.

MONTEIRO et al. (2011) verglichen die Geschwindigkeitsparameter ejakulierter und epididymaler Hengstspermien nach Frischsamen- und Tiefgefriererdünnung miteinander. Zeigten die ejakulierten Spermien nach Frischsamenverdünnung noch höhere Werte in der VCL und VSL, so waren die Werte für Nebenhodenschwanzspermien und ejakulierte Spermien nach Zugabe des Tiefgefriererdünners gleich. Sowohl für ejakulierte als auch epididymale Spermien wurden höhere Werte für VSL und VCL, als in der vorliegenden Studie bestimmt.

Im Vergleich mit anderen, in der Literatur für ejakulierte Hengstspermien angegebenen Werte für VSL, VCL und VAP, liegen die von uns bestimmten Geschwindigkeiten der Nebenhodenschwanzspermien deutlich höher (TISCHNER 1979, ORTEGA-FERRUSOLA et al. 2009). BLACH et al. (1989) erzielte mit einer VSL von 59  $\mu\text{m/s}$  einen ähnlichen Wert wie in der vorliegenden Studie allerdings lag die VCL mit 105  $\mu\text{m/s}$  unter den Werten der Nebenhodenschwanzspermien.

#### **5.4.3 Methodenvergleich der subjektiv und objektiv bestimmten Motilität**

In der vorliegenden Studie wurden die subjektive und objektive Bestimmung der Spermienbeweglichkeit, nach Verdünnung mit EquiPro™ und Gent-Verdünnern, vor der Tiefgefrierung verglichen. Nur für die Spermien des Abschnitts E9 konnte eine positive Korrelation der subjektiven und objektiven Motilitätsbestimmung ermittelt werden. Für die Abschnitte E8 und E7 ergab sich eine negative Korrelation. Diese Tatsache ist wahrscheinlich auf die höhere Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien im Abschnitt E9 zurückzuführen.

WALKER et al. (1982) verglich ebenfalls subjektive und objektive Motilitätsanalyse miteinander und beobachtete eine starke Korrelation beider Methoden. Allerdings zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der subjektiv und der objektiv bestimmten Vorwärtsbeweglichkeit. VYT et al. (2004) erhielt bei dem Vergleich der Schätzung zweier Untersucher mit zwei CASA-Systemen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Es ergab sich eine positive Korrelation zwischen der Schätzung des einen Untersuchers mit der, durch CASA

bestimmten, Motilität. Allerdings eine negative Korrelation zwischen den Ergebnissen des anderen Untersuchers mit denen von CASA. Beide Untersucher wurden als erfahren bezeichnet. Eine hohe Korrelation bestand zwischen den Ergebnissen beider CASA-Systeme untereinander. VESTED et al. (2011) stellte keinerlei Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen der subjektiven Schätzung der Beweglichkeit, durch zwei erfahrene Laborassistenten, und der des CASA-Systems fest. VERSTEGEN et al. (2002) gibt zu bedenken, dass auch wenn eine gute Korrelation zwischen subjektiver Schätzung und objektiver Messung der Spermienbeweglichkeit besteht, die subjektive Analyse sehr stark abhängig von der Erfahrung und Routine des Untersuchers ist. Aber auch bei der Bedienung von CASA können verschiedene Faktoren, die Probe, Einstellung, Bedienung betreffend zu einer Ungenauigkeit der Messung führen (DAVIS und KATZ 1993, VERSTEGEN et al. 2002). Eine regelmäßige Qualitätskontrolle sowie Standardisierung der Einstellung ist daher unerlässlich.

Nach WALKER et al. (1982) sind die Extreme, also eine geringe oder hohe Beweglichkeit, gut subjektiv zu beurteilen. Starke intra- und interindividuelle Abweichungen sind bei einer Beweglichkeit von 34 bis 57 % zu erwarten.

Von AUGER et al. (2000) wird eine geringere Reproduzierbarkeit von 21,8 % bei der subjektiven Motilitätsanalyse angegeben. DE GEYTER et al. (1998) fand eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der CASA-Parameter heraus.

Die subjektive Analyse ist kostengünstiger und mit weniger Aufwand verbunden. Die inter- und intraindividuellen Abweichungen müssen in der Beurteilung Beachtung finden. Es ist zu beachten, dass bei der Schätzung auf erfahrene, routinierte Untersucher zurückgegriffen wird. Das CASA-System weist eine größere Genauigkeit und Reproduzierbarkeit auf und ist bei großem Probenaufkommen empfehlenswert. Außerdem werden neben der Motilitätsanalyse noch die Geschwindigkeit und zahlreiche Bewegungsmuster analysiert (BOYERS et al. 1989, MORTIMER 2000). Als mögliche Fehlerquellen wird eine zu hohe oder zu geringe Spermienkonzentration angesehen. In beiden Fällen kann es zu Ungenauigkeiten in der Bestimmung kommen (DAVIS und KATZ 1993, VERSTEGEN et al. 2002). In unserer Untersuchung fiel bei einer sehr geringen Spermienkonzentration das passive Fließen des Verdünnens, durch die Kapillarkräfte zwischen Deckglas und Objektträger auf. Dieses Phänomen führte in seltenen Fällen zu Fehlinterpretationen. Eine Reduktion der Objektivität kann durch die subjektive Auswahl der zu analysierenden Felder zustande kommen und ist zu vermeiden. Eine sorgfältige Einstellung der Gerätschaften und das korrekte Handling der Proben sind für eine akkurate Spermienanalyse essentiell.

## **5.5 Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E9 nach der Lagerung bei +4 °C (Haltetest)**

In der vorliegenden Studie wurde die Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien, verdünnt mit EquiPro™ und kühl gelagert nach 24, 48, 72 und 96 Stunden überprüft. Es zeigte sich eine starke Reduktion der Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit innerhalb der ersten 24 Stunden. Dieses Phänomen war am deutlichsten bei den Nebenhodenschwanzspermien des Abschnitts E9 ersichtlich und wird auf die deutlich höhere Spermienkonzentration zurückgeführt. Durch die hohe Spermienkonzentration des Abschnitts E9 fallen vermehrt toxische Stoffwechselendprodukte an, die die Beweglichkeit und Vitalität der Spermien negativ beeinflussen. Die Spermien von E9 zeigten zwar die höchste Anfangsbeweglichkeit, durch deren starke initiale Abnahme war das Niveau der Beweglichkeit zwischen den Nebenhodenabschnitten nach 24 Stunden aber ähnlich. Zwischen 24 und 96 sanken die Werte konstant aber nicht mehr so deutlich ab. Nach 96 Stunden war in allen drei Regionen noch eine Gesamtbeweglichkeit von ca. 10 % erhalten. Auch in der Haltbarkeit zeigten die Nebenhodenschwanzspermien gemessen an der Beweglichkeit individuell große Schwankungen.

JAMES et al. (2002) untersuchte die Haltbarkeit von Nebenhodenschwanzspermien über 96 Stunden. Die Lagerung erfolgte im Nebenhoden bei +4°C. Die Nebenhodenschwanzspermien zeigten eine deutliche Reduktion der Vorwärtsbeweglichkeit und Vitalität über die Zeit. Die nach 24 Stunden bestimmte Vorwärtsbeweglichkeit betrug durchschnittlich 57 % und sank nach 96 Stunden auf 32 %. Die Vorwärtsbeweglichkeit lag in dieser Studie höher, als bei der von uns durchgeführten Studie. Diese Tatsache könnte auf die Lagerung der Spermien im Nebenhodenschwanz, welcher deren natürliches Mikromilieu darstellt, zurückzuführen sein. Da die Beweglichkeit zum Zeitpunkt 0 nicht angegeben wird, kann eine Aussage über eine Reduktion innerhalb der ersten 24 Stunden nicht getroffen werden. Für den Frischsamenversand geeignet sind Hengstspermien, die auch nach 24 Stunden noch eine Beweglichkeit von über 30 % aufweisen (CRABTREE 2010 b, BAUMBER-SKAIFE 2011). In der vorliegenden Studie liegen die Medianwerte der Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit unter diesem geforderten Kriterium, allerdings erfüllen die Nebenhodenschwanzspermien zweier Einzeltiere diese Anforderungen in allen drei Nebenhodenregionen. Drei weitere Tiere zeigen in mindestens einem Nebenhodenschwanzsegment die geforderte Mindestbeweglichkeit nach 24 Stunden.

Bei anderen Tierspezies wurde die Haltbarkeit von Nebenhodenschwanzspermien ebenfalls bestimmt. Der Nebenhoden wurde kühl bis zur Aufbereitung der Spermien gelagert. Bei Mäusen konnten nach 7 Tagen (AN et al. 1999), bei Hunden und Hirschen nach 8 Tagen

vitale, bewegliche Nebenhodenspermien gewonnen werden (HISHINUMA et al. 2003, FERNÁNDEZ-SANTOS et al. 2009).

## **5.6 Tiefgefrierbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien der Segmente E7 – E9 nach der Kryokonservierung mit verschiedenen Einfriermethoden (Auftauprobe)**

In zahlreichen Studien wurden bereits erfolgreich equine Nebenhodenspermien tiefgefroren (BRUEMMER et al. 2002; MORRIS et al. 2002, NEILD et al. 2006, MELO et al. 2008, PAPA et al. 2008, HEISE et al. 2010). Der Erfolg wurde mit dem Nachweis beweglicher, vitaler Spermien nach dem Auftauen und bzw. oder der erfolgreichen Besamung von Stuten begründet.

JOHNSON et al. (1980) sprachen den Nebenhodenspermien eine bessere Tiefgefriereignung als ejakulierten Spermien zu. Es gibt allerdings nur wenige Studien, die das bestätigen können. VOLKMANN et al. (2001) verglichen ebenfalls Nebenhodenschwanzspermien mit ejakulierten Spermien hinsichtlich ihrer Tiefgefrierbarkeit und beobachtete eine höhere Beweglichkeit der epididymalen Spermien nach dem Auftauen. In einer Studie von MONTEIRO et al. (2011) wiesen die Nebenhodenschwanzspermien eine ähnliche Vorwärts- und Gesamtbeweglichkeit nach dem Auftauen auf, wie ejakulierte Spermien. Zumeist ist bei ejakulierten Spermien aber eine bessere Tiefgefrierbarkeit als bei Nebenhodenschwanzspermien zu verzeichnen (HEISE et al. 2011).

In der vorliegenden Studie führte das Tiefgefrieren der Nebenhodenschwanzspermien aller drei Regionen, ungeachtet des Einfrierprotokolls, zu einer signifikanten Reduktion der Beweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien. Dieser Effekt des Tiefgefrierens auf die Motilität wurde bereits, in zuvor durchgeführten Studien, an epididymalen und ejakulierten Spermien beobachtet (LOOMIS et al. 1983, BLACH et al. 1989, CROCKETT et al. 2001, BRUEMMER et al. 2002, NEILD et al. 2006, PAPA et al. 2008, MONTEIRO et al. 2012). Die Gesamtbeweglichkeit nach dem Auftauen variierte bei den Nebenhodenschwanzspermien der vorliegenden Studie individuell stark und lag für E9 zwischen 0 und 30 %, für E8 zwischen 0 und 35 % und für E7 zwischen 0 und 50 %. Eine ähnliche Gesamtbeweglichkeit wurde von BRUEMMER et al. (2002) mit 0 bis 38 % erreicht. PAPA et al. (2008) berichteten von höheren Motilitätswerten nach Kryokonservierung mit BotuCrio®, es wurden eine Gesamtbeweglichkeit von 45 % und eine Vorwärtsbeweglichkeit von 19 % festgestellt.

Das Einfrierprogramm hatte in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die Auftauergebnisse. Es ergab sich kein Unterschied in den Auftauergebnissen beim Vergleich der Kryokonservierung mit der Schwimmrampe oder dem Einfrierautomaten sowie der Tiefgefrierung mit oder ohne vorangegangener Kühlung. CLULOW et al. (2008) konnten bessere Auftauergebnisse bei der Tiefgefrierung von Hengstspermien mit dem

Einfrierautomat erzielen. Diese Tatsache wurde auf eine konstantere, gleichförmigere Tiefkühlrate zurückgeführt. DIAS MAZIERO et al. (2013) hingegen fanden keinen Unterschied in den Auftauergebnissen von Spermien, tiefgefroren mit Einfrierautomat und Schwimmrampe. OLACIREGUI et al. (2014) verglichen die Auftauergebnisse von Nebenhodenschwanzspermien, tiefgefroren mit und ohne vorangegangener Kühlung miteinander und beobachtete einen positiven Effekt der Kühlung auf die Beweglichkeit nach dem Auftauen. Die Vorwärts- und Gesamtbeweglichkeit der vor Tiefgefrierung gekühlten Spermien war signifikant höher als bei den direkt eingefrorenen Spermien. Auch SALAZAR et al. (2011) konnten eine Verbesserung der Tiefgefrierbarkeit ejakulierter Spermien durch vorherige langsame Kühlung feststellen. In den Studien von COCHRAN et al. (1984), BRAUN et al. (1994) CROCKETT et al. (2001) hatte die vorangegangene Kühlung keinerlei Effekt auf die Auftauergebnisse von Hengstspermien.

### **5.6.1 Veränderung der Geschwindigkeiten und Bewegungsmuster durch den Tiefgefrier-Auftauprozess bei Nebenhodenschwanzspermien**

In der vorliegenden Studie führte die Kryokonservierung zu einer deutlichen Reduktion aller Geschwindigkeitsparameter. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen aus vorherigen Studien (TISCHNER et al. 1979, BLACH et al. 1989, ORTEGA-FERRUSOLA et al. 2009, MONTEIRO et al. 2011, RAMIRES NETO et al. 2013). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Auftauergebnissen der Spermien von E9 in Bezug auf die Einfriermethode ersichtlich. Bei den Spermien von E7 und E8 konnten wenige signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Einfrierprogrammen festgestellt werden. Die größten Unterschiede waren zwischen dem Einfrierprogramm SRS und den anderen Einfrierprogrammen feststellbar.

MONTEIRO et al. (2011) untersuchten ejakulierte und epididymale Hengstspermien nach der Kryokonservierung und konnten keine großen Unterschiede in der VSL und VCL beider Spermientypen nach dem Auftauen feststellen. Für die Nebenhodenschwanzspermien wurden, mit einer VCL von 184  $\mu\text{m/s}$  und VSL von 83  $\mu\text{m/s}$ , höhere Geschwindigkeiten nach dem Auftauen erreicht, als in der vorliegenden Studie. Auch die Reduktion der Geschwindigkeit im Zuge des Tiefgefrier-Auftauprozesses war in dieser Studie nicht so deutlich, wie in der von uns durchgeführten Studie. PAPA et al. (2008) berichteten von einer VSL von 71  $\mu\text{m/s}$  und VCL von 167  $\mu\text{m/s}$  nach dem Auftauen von Nebenhodenschwanzspermien, diese Werte liegen ebenfalls deutlich höher als in der vorliegenden Studie. Auch RAMIRES NETO et al. (2013) erzielten bei ejakulierten Hengstspermien höhere Geschwindigkeitsparameter nach dem Auftauen. Allerdings sind die erzielten Geschwindigkeiten nach dem Auftauen höher als bei zahlreichen anderen Studien an ejakulierten Spermien (TISCHNER et al. 1979, BLACH et al. 1989, WILHELM et al. 1996, ORTEGA-FERRUSOLA et al. 2009).

### **5.6.2 Verbesserung der Tiefgefrierbarkeit equiner Nebenhodenschwanzspermien**

Die Tiefgefrierbarkeit von Hengstspermien ist individuell sehr unterschiedlich (TISCHNER 1979, GRAHAM und MOCÉ 2005). Das Kriterium der „guten Tiefgefrierbarkeit“ der Spermien hätte bei der Auswahl der Hengste für die vorliegende Studie Beachtung finden können. Allerdings weisen nach TISCHNER (1979) nur 20 % der Hengste eine „gute Tiefgefrierbarkeit“ auf. Eine „moderate Tiefgefrierbarkeit“ wird bei 60 % der Hengste angenommen. Bei MAGISTRINI et al. (1988) wurden die Hengste zunächst mehrfach abgesamt und danach kastriert. Die Nebenhodenspermien der Hengste, die eine gute Tiefgefrierbarkeit der ejakulierten Spermien aufwiesen, zeigten ebenfalls bessere Auftauergebnisse. Die große individuelle Varianz in der Beweglichkeit vor der Kryokonservierung sowie der Toleranz gegenüber Tiefgefrierung konnte auch in der vorliegenden Studie beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass sich aus dieser Individualität die Notwendigkeit der Anwendung individueller Aufbereitungsverfahren und Tiefgefrierprozesse ergibt.

Verschiedene Spermioselektionstechniken vor der Kryokonservierung können die Spermienqualität nach dem Auftauen verbessern. Die verschiedenen Selektionsverfahren unterliegen den Prinzipien der Migration, Filtration und Zentrifugation. Folgenden Verfahren werden beschrieben: Swim-up-Verfahren, Glaswollefiltration, Glaswolle-Sephadex-G-15®-Filtration, Leucosorb®-Filtration, Dichtegradientenzentrifugation, Einzelschichtzentrifugation (SIEME et al. 2003, MORRELL und RODRIGUEZ-MARTINEZ 2011). Durch alle beschriebenen Methoden wird die Spermienkonzentration reduziert. Eine Verbesserung der Vorwärtsbeweglichkeit und Vitalität sowie eine Reduktion morphologischer Anomalien konnte vor der Kryokonservierung durch alle Methoden bewirkt werden (SIEME et al. 2003, MORRELL et al. 2009, MORRELL und RODRIGUEZ-MARTINEZ 2011, GUTIÉRREZ-CEPEDA 2011).

HOOGWIJS et al. (2011) berichteten von einer Verbesserung der Motilität und Morphologie von kryokonservierten Hengstspermien mit schlechter Tiefgefriereignung durch Einzelschichtzentrifugation. SIEME et al. (2003) stellten eine höhere Motilität nach dem Auftauen bei mit Glaswolle- und Leucosorb®-Filtration selektierten Spermien fest. Die Auswirkung der Selektion auf die Tiefgefrierbarkeit equiner Nebenhodenschwanzspermien wurde noch nicht untersucht. Die Spermioselektion stellt aber eine Möglichkeit dar die Auftauergebnisse zu verbessern.

Die Zugabe von Seminalplasma zu Hengstspermien vor oder nach der Kryokonservierung zur Verbesserung der Auftauergebnisse wird kontrovers diskutiert. GRAHAM (1996) und AMANN und PICKETT (1987) empfehlen die Entfernung von Seminalplasma durch

Zentrifugation vor der Tiefgefrierung, um die Auftauergebnisse zu verbessern. Von BRINSKO (2011) wird die partielle Entfernung von Seminalplasma auf ein Endgehalt von 5 % empfohlen. JASKO et al. (1992) beobachteten eine Verbesserung der Beweglichkeit kühl gelagerter Spermien nach Zugabe 5 bis 20 % Seminalplasma im Gegensatz zu den Spermien bei denen das Seminalplasma komplett entfernt wurde.

Auch zu der Auswirkung von Seminalplasma auf Nebenhodenschwanzspermien gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Konnte mit der Zugabe von Seminalplasma vor der Tiefgefrierung noch ein positiver Effekt auf die Beweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien erreicht werden, so ergab sich nach der Tiefgefrierung kein Unterschied mehr zwischen den Proben mit und ohne Seminalplasma (HEISE et al. 2011). STOUT et al. (1999) erzielten einen deutlichen Anstieg der Vorwärtsbeweglichkeit von 12 auf 48 % nach Zugabe von Seminalplasma zu Nebenhodenschwanzspermien vor der Tiefgefrierung. Der Effekt ist auch nach dem Tiefgefrier- und Auftauprozess, allerdings weniger deutlich, ersichtlich. BRAUN et al. (1994) berichteten von einem Motilitätsanstieg direkt nach der Zugabe von 25 % Seminalplasma zu Nebenhodenschwanzspermien. MORRIS et al. (2002) verglichen die Motilität von Nebenhodenspermien nach dem Auftauen, die entweder mit oder ohne 5 % Seminalplasma im Magermilchverdünner aus dem Nebenhodenschwanz gespült wurden. Es konnte kein positiver Effekt festgestellt werden. Bei einer Studie von TIPLADY et al. (2002) konnte eine marginale Verbesserung der initialen Motilität nach der Zugabe von Seminalplasma zu frischen und aufgetauten epididymalen Spermien festgestellt werden, die Unterschiede waren aber nicht signifikant.

AURICH et al. (1996) entdeckten, dass die Zugabe von Seminalplasma von Hengsten, deren Spermien sich gut tiefgefrieren lassen, die Beweglichkeit von Hengstspermien mit schlechter Tiefgefrierbarkeit nach dem Auftauen erhöht. Es ist daher anzuraten bei der Verwendung von Seminalplasma auf die Tiefgefriereignung des Spenders zu achten. Ein Vergleich der Studien in denen die Auswirkung von Seminalplasma auf Nebenhodenschwanzspermien untersucht wurde, ist schwer möglich. Es wurden stets unterschiedliche Konzentrationen an Seminalplasma, Verdünner und Einfrierprotokolle angewendet. In der vorliegenden Studie wurden die Nebenhodenschwanzspermien mit DPBS aus den Nebenhodenschwanzregionen gespült, aufgrund der fehlenden Ejakulation waren die Spermien zu keiner Zeit Seminalplasma ausgesetzt.

Der Erfolg der Tiefgefrierung von Hengstspermien ist von zahlreichen Faktoren abhängig: Hengst, Spermienaufbereitung inklusive oder exklusive Zentrifugation, Seminalplasmakonzentration, Verdünner, Verdünnungsverhältnis, Einfriertechnik (automatisch/ manuell, Kühlrate, Tiefgefriertrate), Konfektionierung, Auftaurate. Es existieren eine Vielzahl von Studien zur Tiefgefrierung equiner, ejakulierter Spermien und Nebenhodenspermien. Allerdings ist ein Vergleich der Studien nur begrenzt möglich, da die Spermien

unterschiedlich aufbereitet, tiefgefroren und aufgetaut wurden. Ein gutes Einfrierprotokoll für ejakulierte Hengstspemien eignet sich nicht zwangsläufig auch für Nebenhodenschwanzspemien. Weitere Forschung ist notwendig, um die Kryokonservierung epididymaler Hengstspemien zu optimieren und so eine bessere Nutzbarkeit dieses Spemienreservoirs zu erreichen.

### **5.7 Haltbarkeit der aufgetauten Nebenhodenschwanzspemien bei der Lagerung bei +4 °C**

Die Gesamtbeweglichkeit der Spemien war nach dem Auftauen und der Lagerung bei +4°C für 48 Stunden nur sehr gering und lag zumeist unter 10 %. Wird die Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspemien der einzelnen Regionen nach dem Auftauen miteinander verglichen, so sind die Spemien des Abschnitts E9 am beständigsten in ihrer Beweglichkeit, den Geschwindigkeitsparametern und Bewegungsmustern zu den Zeitpunkten H0, H1, H2, H24, H48. Die Spemien von E9 zeigen lediglich deutliche Unterschiede in Geschwindigkeit und Beweglichkeit nach 24 Stunden. Die größten Differenzen zwischen den Einfrierprogrammen in Bezug auf die Haltbarkeit der Spemien zeigen sich in den Abschnitten E7 und E8. Die Geschwindigkeitsparameter sind stärker von den Veränderungen betroffen als die Beweglichkeit. Die Haltbarkeit der Spemien von E7 und E8, welche mit dem Einfrierprogramm SRS eingefroren wurden, ist am geringsten. Die größten Unterschiede zeigen sich bei den Spemien von E8 nach 48 Stunden zwischen dem Einfrierprogramm SRS und den anderen Tiefgefriermethoden. Bei den Spemien von E7 nach 2 und 24 Stunden.

Im Rahmen der Spemienreifung kommt es zu umfangreichen Veränderungen der Plasmamembran der Spemien. Proteine und Lipide werden ausgetauscht, eliminiert oder der Membran hinzugefügt. Der Anteil an Cholesterol und Phospholipiden, die Anzahl der Disulfid-Bindungen steigt (DACHEUX et al. 1989; FOUCHÉCOURT et al. 2000; SULLIVAN et al. 2007; CORNWALL 2009). Cholesterol stabilisiert die Plasmamembran und schützt die Spemien vor Kälteschock (AMANN und PICKETT 1987). Die Spemien aus dem kaudalsten Abschnitt des Nebenhodenschwanzes haben die Reifung abgeschlossen und stehen zur Ejakulation bereit. Es ist daher nicht verwunderlich, dass diese Spemien sich als widerstandfähiger gegenüber Kühlung zeigen, als die aus den weiter kranial gelegenen Bereichen des Nebenhodenschwanzes, da ihre Plasmamembran einen höheren Lipidgehalt aufweist. Außerdem kommt es während der Reifung der Spemien im Nebenhoden zu einer höheren Toleranz der Spemienzellen gegenüber Volumenschwankungen und osmotischen Schäden (COOPER 2007). Im Zuge der Tiefgefrierung und Kühlung der Spemien kommt es zu Dehydratation der Zellen und Veränderung des osmotischen Drucks innerhalb und

außerhalb der Zellen. Es ist anzunehmen, dass reifere Spermien diese Begebenheiten besser tolerieren und daher eine größere Haltbarkeit aufweisen.

## **6. Zusammenfassung**

**Rheinfeld, Svenja (2015):**

### **Segmentale Analyse und Tiefgefrierkonservierung von Spermien aus den einzelnen Nebenhodenschwanzsegmenten beim Hengst**

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Spermien der drei Nebenhodenschwanzsegmente E7 bis E9, modifiziert nach Fouchécourt et al. (2000), hinsichtlich ihrer Motilität, Tiefgefrierbarkeit und Haltbarkeit zu untersuchen. Außerdem wurde die Spermienkonzentration und -gesamtzahl in den Nebenhodenschwanzregionen bestimmt.

Die Gewinnung der Nebenhodenschwanzspermien von zehn, drei bis vierzehnjährigen, Hengsten erfolgte durch retrogrades Spülen (E9) und Slicing (E7, E8). Der Unterschied in der Spermienkonzentration und -gesamtzahl zwischen den drei Regionen war hochsignifikant. Es wurde ein Anstieg der Spermienkonzentration und -gesamtzahl von E7 bis E9 festgestellt. Im Vergleich der zwei Methoden zur Dichtebestimmung, Zählkammer und NucleoCounter® SP-100, ergab sich eine starke Korrelation beider Verfahren.

Die Verdünnung der Nebenhodenschwanzspermien mit Gent-Verdünner, führte zu einer Steigerung der Beweglichkeit, im Vergleich zur Verdünnung mit EquiPro™. Die Motilität der Nebenhodenschwanzspermien variierte je nach Hengst stark. Eine Zunahme der Beweglichkeit von E7 bis E9 war festzustellen. Verglich man die subjektive und objektive Motilitätsanalyse, durch Schätzung und CASA, miteinander, so ergab sich nur für die Beweglichkeit der Spermien von E9 eine positive Korrelation.

Wurden die Nebenhodenschwanzspermien, nach Verdünnung, über 96 Stunden kühl gelagert, so ergab sich eine starke Reduktion der Beweglichkeit in den ersten 24 Stunden, aber auch nach 96 Stunden waren noch motile Spermien vorhanden.

Die Nebenhodenschwanzspermien wurde mit vier verschiedenen Einfrierprogrammen, mit und ohne vorherige Kühlung sowie mittels Einfrierautomat oder Schwimmrampe, tiefgefroren und die Ergebnisse verglichen. Nach Kryokonservierung wurde eine stark verminderte Beweglichkeit und Geschwindigkeit der Nebenhodenschwanzspermien aller drei Segmente ungeachtet der verwendeten Einfriertechnik festgestellt. Auch die Tiefgefrierbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien war individuell sehr verschieden. Die kühle Lagerung der aufgetauten Spermien über 48 Stunden, führte wiederum zu einer deutlichen Abnahme innerhalb der ersten 24 Stunden. Die Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit waren, unabhängig von Nebenhodenschwanzregion und angewandter Einfriertechnik, zu jedem Zeitpunkt nur sehr gering. Die Spermien von E7 und E8 zeigten geringere Motilitäts- und

Geschwindigkeitswerte, als die von E9. Die Spermien von E7 und E8, welche mit dem Einfrierprogramm SRS eingefroren wurden, wiesen die geringste Haltbarkeit auf.

Es ist möglich bewegliche Spermien aus dem Nebenhodenschwanz des Hengstes zu gewinnen, diese aufzubereiten, kühl zu lagern und tiefzufrieren. Die vier verschiedenen Einfriermethoden mit oder ohne Kühlung bzw. mit Einfrierautomat oder Styroporbox (Schwimmrampe) lieferten vergleichbare Ergebnisse.

## 7. Summary

Rheinfeld, Svenja (2015):

### **Segmental analysis and cryopreservation of equine epididymal sperm from different segments of the cauda epididymidis**

The purpose of the study was to investigate the differences between motility, freezability and longevity of epididymal sperm, harvested from different segments of the cauda epididymidis [modified from Fouchécourt et al. (2000)]. The sperm concentration and total amount of sperm in the different segments were determined as well.

Epididymal sperm was collected from 10 stallions (age 3 – 14 years) by retrograde flushing (E9) and slicing technique (E7, E8). Differences in sperm concentration and total amount of sperm between the 3 cauda segments were significant. The increase in sperm concentration and sperm amount from the distal to the proximal cauda region E7 to E9 was remarkable. Sperm concentration was measured by counting chamber and NucleoCounter® SP-100. Both techniques showed high correlation between the results obtained.

Diluting the epididymal spermatozoa with Gent-extender led to an increase in motility compared with the motility after dilution with EquiPro™, but the motility of equine epididymal sperm showed a high individual variation and increased from segment E7 to E9. Comparing the subjective estimation and objective sperm analysis by CASA only the motility of the sperm harvested from E9 showed a positive correlation.

The longevity of diluted epididymal sperm determined over 96 hours yielded a strong reduction of motility within the first 24 hours, but after 96 hours a small percentage of spermatozoa was still motile.

Cryopreservation was performed using four different techniques with or without previous cooling and with programmable freezer or floating rack. Freezing led to a remarkable reduction of motility and velocity of epididymal sperm from all segments, regardless of the freezing protocol. The freezability of sperm cells showed high individual variation as well. After cooled storage of the thawed sperm for 48 hours, the sperm motility was reduced. Regardless of the duration of storage and freezing protocol, sperm motility was always low. Spermatozoa, harvested from segment E7 and E8 were less motile and showed smaller velocity than those from segment E9. The longevity of thawed sperm from E7 and E8, frozen by freezing protocol SRS was reduced in comparison to the longevity of sperm frozen with the other freezing protocols.

Collecting, processing, storage and freezing motile sperm from 3 different segments of the cauda epididymidis after castration of stallions is possible. Comparing 4 different freezing protocols, with or without previous cooling by programmable freezer and floating freeze rack, showed comparable results.

## 8. Literaturverzeichnis

- ABAIGAR T., HOLT W.V., HARRISON R.A.P., DEL BARRIO G. (1999). Sperm subpopulations in boar (*su scrofa*) and gazelle (*gazelle dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessment. *Biol Reprod* 60, 32-41
- ABOU- HAÏLA A., FAIN- MAUREL M.-A. (1984). Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization. *Anat Rec* 209, 197-208
- ACCOT T.S., HOSKINS D.D. (1978). Bovine sperm forward motility protein. Partial purification and characterization. *J Biol Chem* 253, 6744-6750
- ACCOT T.S., CARR D.W. (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol Reprod* 30, 926-935
- ADAMALI H.I., HERMO L. (1996). Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J Androl* 17, 208-222
- ALVARENGA M.A., PAPA F.O., LANDIM- ALVARENGA F.C., MEDEIROS A.S.L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Anim Reprod Sci* 89, 105-113
- AMANN R.P., THOMPSON D.L., Squires E.L., Pickett B.W. (1979). Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. *J Reprod Fert Suppl* 27, 1-6
- AMANN R.P., PICKETT B.W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 7, 145-173
- AMANN R.P., GRAHAM J.K. (2011). Spermatozoal function. In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D. (Hrsg.). *Equine Reproduction*. Wiley Blackwell Band 1, S 1053-1084
- AN T.Z., WADA S., EDASHIGE K., SAKURAI T., KASAI M. (1999). Viable spermatozoa can be recovered from refrigerated mice up to 7 days after death. *Cryobiology* 38, 27-34
- ANZAR M., KROETSCH T., BUHR M.M. (2009). Comparison of different methods for assessment of sperm concentration and membrane integrity with bull semen. *J Androl* 30, 661-668
- ARRIGHI S., ROMANELLO M.G., DOMENEGHINI C. (1993). Ultrastructure of epididymal epithelium in *equus caballus*. *Ann Anat* 175, 1-9
- AUGER J., EUSTACHE F., DUCOT B., BLANDIN T., DAUDIN M., DIAZ I., EL MATRIBI S., GONY B., KESKES L., KOLBEZEN M., LAMARTE A., LORNAGE J., NOMAL N., PITAVAL

- G., SIMON O., VIRANT-KLUN I., SPIRA A., JOUANNET P. (2000). Intra- and interindividual variability in human sperm concentration, motility and vitality assesement during a workshop involving ten laboratories. *Human Reprod* 15, 11, 2360-2368
- AURICH J.E., KÜHNE J.A., HOPPE H., AURICH C. (1996). Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 46, 791-797
- AURICH C., SEEBER P., MÜLLER-SCHLÖSSER F. (2007). Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5°C. *Reprod Dom Anim* 42, 445-448
- AURICH C. (2008). Recent advances in cooled-semen technology. *Anim Reprod Sci* 107, 268-275
- BADER H. (2001). Physiologie und Pathologie der Kopulation. In.: *Veterinärmedizinische Andrologie Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*. Schattauer Verlag Stuttgart, S 347-364
- BALL B.A. (2008). Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: a review. *J Equine Vet Sci* 28, 11, 650-665
- BARBAS J.P., MASCARENHAS R.D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10, 49-62
- BARKER C.A.V., GANDIER J.C.C. (1957). Pregnancy in a mare resulting from epididymal spermatozoa. *Can J Comp Med* 21, 47-51
- BAUMBER- SKAIFE J. (2011). Evaluation of Semen. In.: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D. (Hrsg.) *Equine Reproduction Volume 1*. 2nd Edition. Wiley Blackwell, Ames Iowa USA, S 1278-1291
- BEDFORD- GUAUS S.J. (2007). Transported stallion semen and breeding mares with cooled or frozen-thawed semen. *Clin Tech Equine Pract* 6, 239-248
- BERGERON A., MANJUNATH P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 73, 1338-1344
- BIELAŃSKI W. (1975). The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. *J Reprod Fertil Suppl* 23, 19-24
- BIELAŃSKI W., KACZMARSKI F. (1979). Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. *J Reprod Fertil Suppl* 29, 39-45

- BLACH E.L., AMANN R.P., BOWEN R.A., FRANTZ D. (1989). Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. *Theriogenology* 31, 283-292
- BLANCHARD T.L., BRINSKO S.P., LOVE C.C., VARNER D.D. (2008). 54th Proc Ann Convention of the AAEP, San Diego, California, USA, S 374-379
- BLASH S., MELICAN D., GAVIN W. (2000). Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54, 899-905
- BLOTTNER S., WARNKE C., TUCHSCHERER A., HEINEN V., TORNER H. (2001). Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim Reprod Sci* 65, 75-88
- BOGLIOLO L., LEONI I.G., LEDDA S., NAITANA S., ZEDDA M., CARLUCCIO A., PAU S. (2001). Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 56, 955-967
- BOYERS S.P., DAVIS R.O., KATZ D. (1989). Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 12, 172-200
- BRAUN J., SAKAI M., HOCHI S., OGURI N. (1994). Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology* 4, 809-818
- BRINSKO S.P., VARNER D.D. (1992). Artificial insemination and preservation of semen. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1, 205-18
- BRINSKO S.P., BLANCHARD T.L., VARNER D.D., SCHUMACHER J., LOVE C.C., HINRICHS K., HARTMAN D. (2011). Semen Preservation. In.: Brinsko S.P., Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Hinrichs K., Hartman D. (Hrsg.) *Manual of equine reproduction*. 3. Auflage Mosby, Missouri, USA, S 207-226
- BRITO L.F.C. (2007). Evaluation of stallion sperm morphology. *Clin Tech Equine Pract* 6, 249-264
- BRUEMMER J.E., REGER H., ZIBINSKI G., SQUIRES E.L. (2002). Effect of storage at 5 °C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 58, 405-407
- CARD C. (2005). Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology* 64, 558-567
- CARR D.W., ACOTT T.S. (1984). Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Study of a sperm motility quiescence factor. *Biol Reprod* 30, 913-925

- CARY J.A., MADILL S., FARNSWORTH K., HAYNA J.T., DUOOS L., FAHNING M.L. (2004). A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. *Can Vet J* 45, 35-41
- CASSARETT G.W. (1953). A one-solution stain for spermatozoa. *Stain Technol* 28, 3, 125-127
- CHOONG C.H., WALES R.G. (1962). The effect of cold shock on spermatozoa. *Austr J Biol Sci* 15, 3, 543-551
- CHRISTENSEN P., PARLEVLIEET J.M., VAN BUITEN A., HYTTEL P., COLENBRANDER B. (1995). Ultrastructure of fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Biol Reprod* 1, 769-777
- CLULOW J.R., MANSFIELD L.J., MORRIS L.H.A., EVANS G., MAXWELL W.M.C. (2008). A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 108, 298-308
- COCHRAN J.D., AMANN R.P., FROMAN D.P., PICKETT B.W. (1984). Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 °C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* 22, 25-38
- COOPER T.C. (1998). Epididymis. In: Knobil E., Neill J.D. (Hrsg). *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego, USA, S 1-17
- COOPER T.G., YEUNG C.H. (2003). Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. *Microsc Res Tech* 61, 28-38
- COOPER T.G. (2007). Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem. *Asian J Androl* 9, 533-539
- COMIZZOLI P., MERMILLOD P., COGNIEÉ Y., CHAI N., LEGENDRE X., MAUGET R. (2001). Successful in vitro production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology* 55, 649-659
- CORNWALL G.A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 15, 213-227
- CRABO B.G. (2001). Physiological aspects of stallion semen cryopreservation. *Proc Am Assoc Equine Pract* 47, 291-295
- CRABTREE J. (2010 a). Prebreeding examination of the stallion 1. Physical examination. In *Practice* 32, 22-28

- CRABTREE J. (2010 b). Prebreeding examination of the stallion 2. Semen collection and evaluation. In Practice 32, 58-63
- CRISTANELLI M.J., SQUIRES E.L., AMANN R.P., PICKETT B.W. (1984). Fertility of stallion semen processed frozen and thawed by a new procedure. Theriogenology 22, 1, 39-45
- CROCKETT E.C., GRAHAM J.K., BRUEMMER J.E., SQUIRES E.L. (2001). Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. Theriogenology 55, 793-803
- CZARNETZKY E.J., HENLE W. (1938). A pressure device for the separation of mammalian spermatozoa from the isolated epididymis. Proc Soc Exp Biol Med 38, 63-64
- DACHEUX J.L. (1980). An in vitro luminal perfusion technique to study epididymal secretion. In: International Research Communications System Medical Science 8, 137
- DACHEUX J.L., VOGELMAYR J.K. (1983). Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. Biol Reprod 29, 1033-1046
- DACHEUX J.L., DACHEUX F., PAQUIGNON M. (1989). Changes in sperm surface membrane and luminal protein fluid content during epididymal transit in the boar. Biol Reprod 40, 635-651
- DACHEUX J.-L., DACHEUX F. (2002). Protein secretion in the epididymis. In.: Robaire B., Hinton B.T. (Hrsg.). The epididymis from molecules to clinical practice a comprehensive survey of the efferent ducts, the epididymis and the vas efferens. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, USA, S 151-168
- DACHEUX J.-L., GATTI J.L., DACHEUX F. (2003). Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. Microsc Res Tech 61, 7-17
- DACHEUX J.L., BELLEANNÉE C., JONES R., LABAS V., BELGHAZI M., GUYONNET B., DRUART X., GATTI J.L., DACHEUX F. (2009). Mammalian epididymal proteome. Mol Cell Endocrinol 306, 45-50
- DAS P.J., PARIA N., GUSTAFSON-SEABURY A. , VISHNOI M., SANKAR P., CHAKI S.P., LOVE C.C., VARNER D.D., CHOWDHARY B.P., RAUDSEPP T. (2010). Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. Theriogenology 74, 1099-1106
- DAVIS R.O., KATZ D.F. (1993). Operational standards for CASA instruments. J Androl 14, 5, 385-394
- DE GEYTER C., DE GEYTER M., KOPPERS B., NIESCHLAG E. (1998). Diagnostic and accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. Human Reprod 13, 9, 2512-2520

- DIAS MAZIERO R.R., NASCIMENTO GUASTI P., MONTEIRO G.A., AVANZI B.R., HARTWIG F.P., LISBOA F.P., MARTIN I., PAPA F.O. (2013). Evaluation of sperm kinetics and plasma membrane integrity of frozen equine semen in different storage volumes and freezing conditions. *J Equin Vet Sci* 33, 165-168
- DINGER J.E., NOILES E.E. (1986). Prediction of daily sperm output in stallions. *Theriogenology* 26, 1, 61-67
- DOUGLAS-HAMILTON D.H., OSOL R., OSOL G., NOBLE H. (1984). A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology* 22, 3, 291-304
- DOTT H.M. (1975). Morphology of stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 23, 41-46
- DOWSETT K.F., OSBORNE H.G., PATTIE W.A. (1984). Morphological characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 22, 463-472
- DOWSETT K.F., KNOTT L.M. (1996). The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46, 397-412
- ECOT P., VIDAMENT M., DE MORNAC A., PERIGAULT K., CLÉMENT F., PALMER E. (2000). Freezing stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *J Reprod Fert Suppl.* 56, 141-150
- EDDY E.M. (2006). The spermatozoon. In: Knobil E. Neill J.D. (Hrsg.). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. 3rd Edition Academic Press, Band 1, S 3-54
- EICHELBERGER A. C., TROEDSSON M. H., POZOR M.A., MACPHERSON M. L. (2007). How to collect, handle, and process post-mortem epididymal sperm for breeding or assisted reproductive techniques. *Proc. 53rd Ann. Convention AAEP, Orlando, Florida, USA*, 583-586
- FAHY G.M. (1986). The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology* 23, 1-13
- FAWCETT D.W. (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 44, 394-436
- FAYRER-HOSKEN R., ABREU-BARBOSA C., HEUSNER G., JONES L. (2008). Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and glycerol. *J Equine Vet Sci* 28, 11, 672-676
- FERNÁNDEZ-SANTOS M.R., DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO A.E., ESTESO M.C., GARDE J.J., MARTÍNEZ-PASTOR F. (2009). Refrigerated storage of red deer epididymal spermatozoa in the epididymis, diluted and with vitamin C supplementation. *Reprod Dom Anim* 44, 212-220

- FEUCHTER F.A., TABELT A.J., GREEN M.F. (1988). Maturation antigen of the mouse sperm flagellum. I. Analysis of its secretion association with sperm, and function. *Am J Anat* 181, 67-76
- FICKEL J., WAGENER A., LUDWIG A. (2007). Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J Wildl Res* 53, 81-89
- FILLIERS M., RIJSSELAERE T., BOSSAERT P., ZAMBELLI D., ANASTASI P., HOOGEWIJS M., VAN SOOM A. (2010). In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: A comparison of two collection techniques. *Theriogenology* 74, 31-39
- FIORATTI E.G., MELO C.M., VILLAVERDE A.I.S.B., MARTIN I., FELÍCIO, FERREIRA H.N., OLIVEIRA J.V., ALVARENGA M.A., PAPA F.O. (2008). Correlation of testicular volume and weight with sperm recovery from stallion epididymis. *Anim Reprod Sci* 1-59
- FLICKINGER C.J., HOWARDS S.S., ENGLISH H. F. (1978). Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. *Am. J Anat* 152, 557-586
- FLICKINGER C.J., BUSH L.A., HOWARDS S.S., HERR J.S. (1997). Distribution of leukocytes in the epithelium and interstitium of four regions of the lewis rat epididymis. *Anat Rec* 248, 380-390
- FOUCHÉCOURT S., MÉTAYER S., LOCATELLI A., DACHEUX, F., DACHEUX J.L. (2000). Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* 62, 1790-1803
- GARDE J., AGUADO M., PEREZ S., GARRIDO D., PEREZ- GUZMAN M., MONTORO V. (1994). Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from post-mortem rams. *Theriogenology* 41, 203
- GEBAUER M.R., PICKETT B.W., VOSS J.L., SWIERSTRA E.E. (1974 a). Reproductive Physiology of the stallion: II daily sperm output and testicular measurements. *JAVMA* 165, 8, 711-713
- GEBAUER M.R., PICKETT B.W., SWIERSTRA E.E. (1974 b). Reproductive Physiology of the stallion: II daily sperm output and testicular measurements. *J Anim Sci* 39, 737-742
- GEISLER A. (1990). Prüfung von Vitalfärbungen für Spermien von Haussäugetieren. *Vet. Med. Diss. Ludwig-Maximilian-Universität München*
- GLOVER T.D., NICANDER L. (1971). Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *J Reprod Fert Suppl* 13, 39-50
- GOYAL H.O. (1985). Morphology of the bovine epididymis. *Am J Anat* 172, 155-172

- GOYAL H.R., WILLIAMS C.S. (1991). Regional differences in the morphology of the goat epididymis: a light microscopic and ultrastructural study. *Am J Anat* 190, 349-369
- J.K. (1996). Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Reprod Technol* 12, 131-147.
- GRAHAM
- GRAHAM J.K., MOCÉ E. (2005). Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology* 64, 492-504
- GRAHAM J.K. (2011). Principles of cooled semen. In.: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D. (Hrsg.) *Equine Reproduction Volume 1*. 2nd Edition. Wiley Blackwell, Ames Iowa USA, S 1278-1291
- GUIMARÃES T., LOPES G., FERREIRA P., LEAL I., ROCHA A. (2012). Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. *Anim Reprod Sci* 136, 85-89
- GUTIÉRREZ-CEPEDA L., FERNÁNDEZA A., CRESPOB F., GOSÁLVEZC J., SERRESA C. (2011). Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Anim Reprod Sci* 124, 84-89
- HANCOCK J.L. (1954). The morphology of bull spermatozoa. *J Exp Biol* 29, 3, 445-453
- HANSEN C., VERMEIDEN T., VERMEIDEN J.P.W., SIMMET C., DAY B.C., 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, 2188-2194
- HEISE A., KÄHN W., VOLKMANN D.H., THOMPSON P.N., GERBER D. (2010). Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 118, 48-53
- HEISE A., THOMPSON P.N., GERBER D. (2011). Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 123 192-201
- HEITLAND A.V., JASKO D.J., SQUIRES E.L., GRAHAM J.K., PICKETT B.W., HAMILTON C. (1996). Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet J* 28, 47-53
- HEMEIDA N.A., SACK W.O., MCENTEE K. (1978). Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull, and stallion. *Am J Vet Res* 39, 12, 1892-1900
- HEROLD F.C., AURICH, J.E., GERBER D. (2004). Epididymal sperm from the african buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed® and with Triladyl™ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61, 715-724

- HERMO L., DWORKIN J., OKO R. (1988). Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am J Anat*, 107-124
- HESS R.A. (2002). The efferent ductules: structure and functions. In.: Robaire B., Hinton B.T. (Hrsg.). *The epididymis from molecules to clinical practice*. Kluwer Academic/ Plenum Publisher New York, S 49-80
- HEWITT D.A., LEAHY R., SHELDON I.M., ENGLAND G.C.W. (2001). Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim Reprod Sci* 67, 101-111
- HISHINUMA M., SUZUKI K., SEKINE J. (2003). Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 59, 813-820
- HODDER A.D.J., LIU I.K.M. (2011). Spermatozoal motility. In: McKinnon O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D. (Hrsg.). *Equine Reproduction*. Wiley Blackwell, S 1292-1299
- HOFFER A.P., GREENBERG J. (1978). The structure of the epididymis, efferent ductules and ductus deferens of the guinea pig: a light microscope study. *Anat Rec* 190, 659-678
- HOFFMANN N., MORANDINI C., SIEME H. (2010) Determination of the optimal concentration of cryoprotectant agent for freezing stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci Suppl* 121, 160-162
- HOLT W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62, 3-22
- HOLTZ W., SMIDT D. (1976). The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *J Reprod Fert* 46, 227-229
- HOOGEWIJS M., MORRELL J., VAN SOON A., GOVAERE J., JOHANNISSON A., PIEPERS S., DE SCHAUWER C., DE KRUIF A. (2011). Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. *Equine Vet J, Suppl* 40, 35-41
- HORI T., ICHIKAWA M., KAWAKAMI E., TSUTSUI T. (2004). Artificial insemination of frozen epididymal sperm in beagle dogs. *J Vet Med Sci* 66, 1, 37-41
- HURTGEN J.P. (1992). Evaluation of the stallion for breeding soundness. *Vet Clin North Am Equine Pract* 8, 1, 149-165
- JAMES A.N., GREEN H., HOFFMAN S., LANDRY A.M., PACCAMONTI D., GODKE R.A. (2002). Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72, 96 hours. *Theriogenology* 58, 401-404

- JASKO D.J., LEIN D.H., FOOTE R.H. (1990). Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 197, 389-394
- JASKO D.J. (1992). Evaluation of stallion semen. *Vet Clin North Am Equine Pract* 8, 129-148
- JASKO D.J., HATHAWAY J.A., SCHALTENBRAND V.L., SIMPER W.D., SQUIRES E.L. (1992). Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37, 1241-1252
- JEQUIER A.M., UKOMBE E.B. (1983). Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br J Urol* 55, 4, 434-436
- JIMENEZ C.F. (1987). Effects of Equex STM and equilibration time on the pre-freeze and postthaw motility of equine epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 28, 773-781
- JOHNSON L., AMANN R.P, PICKETT B.W. (1980). Maturation of equine epididymal spermatozoa. *Am J Vet Res* 41, 1190-1196
- JOHNSON L. (1991). Spermatogenesis. In.: Cupps P.T. (Hrsg.). *Reproduction in Domestic Animals*. 4 th edition Academic Press Inc. New York, S 173-219
- JONES R., HAMILTON D.W., FAWCETT D.W (1979). Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. *Am J Anat* 156, 373-400
- JONES R. (1998). Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fert Suppl* 53, 73-84
- JONES R. (1999). To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *Int J Androl* 22, 57-67
- JONES R. (2004). Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. *Biol Reprod* 71, 1405-1411
- KATHIRAVAN P., KALATHARAN J., KARTHIKEYA G., RENGARAJAN K., KADIRVEL G. (2011). Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system - a review. *Reprod Dom Anim* 46, 165-172
- KIRK E.S., GRAHAM J.K., SQUIRES E.L. (2001). Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. *Procc. 3<sup>rd</sup> Int Symp Stallion Reprod*, Fort Collins, USA, 317-318
- KISER A.M., SUDDERTH A.K. LOVE C.C., BRINSKO S.P., VARNER D.D., BLANCHARD T.L. (2012). Sperm quality following 4 days of cooled storage: impact on fertility. *Procc. 6<sup>th</sup> Int Symp Stallion Reprod*, Wien, Österreich, 491

- KLEWITZ J., HAGEN C., BEHRENDT D., MARTINSSON G., SIEME H. (2008). Effect of multiple freezing of stallion semen on sperm quality and fertility. *Anim Reprod Sci* 104, 27-28
- KUSUNOKI H., DAIMARU H., MINAMI S., NISHIMOTO S., YAMANE, K., FUKUMOTO Y. (2001). Birth of chimpanzee (pan troglodytes) after artificial insemination with cryopreserved epididymal spermatozoa collected postmortem. *Zoo Biol* 20, 135-143
- KÚTVÖLGYI G., STEFLERL J., KOVÁCS A. (2006). Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa. *Biotech Histochem* 81, 109-117
- LAGERLÖF N. (1934). Morphological studies on the change in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 19, 254-267.
- LASLEY J.F., BOGART R. (1944). A comparative study of epididymal and ejaculated spermatozoa of the boar. *J Anim Sci* 3, 360-370
- LOOMIS P.R., AMANN R.P., SQUIRES E.L., PICKETT B.W. (1983). Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA lactose-egg yolk and packaged in straws. *J Anim Sci* 56, 3, 687-693
- LÓPEZ M.L., GREZ P., GRIBBEL I., BUSTOS- OBREGÓN (1989). Cytochemical and ultrastructural characteristics of the stallion epididymis (*Equus caballus*). *J Submicrosc Cytol Pathol* 21, 103-120
- LOVE C.C., GARCIA M.C., RIERA F.R., KENNEY R.M. (1991). Evaluation of measure taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output. *J Reprod Fert Suppl* 44, 99-105
- LOVE C.C. (2012). Measurement of concentration and viability in stallion sperm. *Theriogenology* 32, 464-466
- MAGISTRINI M., TINE C., NOUE P., PALMER E. (1988). Correlations between characteristics of frozen spermatozoa from ejaculates or perfusates from epididymidis caudae and proximal deferent ducts in a group of stallions. *Proc 11th Intern Cong Anim Reprod AI* 273-275
- MALMGREN L. (1997). Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology* 48, 523-530
- MARENCO S.R. (2008). Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Anim Reprod Sci* 105, 52-63
- MARTIN I.C.A. (1966). Diluents for preservation of ram spermatozoa I. diluents used at 37 °C and 5 °C containing casein. *Aust J Biol Sci* 19, 645-653

- MARTIN J.C., KLUG E., GÜNZEL A.R. (1979). Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J Reprod Fert Suppl* 27, 47-51
- MARTIN J.C., KLUG E. (1979). Zur Samenübertragung beim Pferd - Spermakonservierung in Kunststoffröhrchen. *Prakt Tierarzt* 3, 196-204
- MARTINEZ- PASTOR F., GARCIAS- MACIAS V., ALVAREZ M., HERRAREZ P., ANEL L., DE PAZ P. (2005). Sperm subpopulations in iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biol Reprod* 72, 316-327
- MARTINS C.F., DRIESSEN K., MELO COSTA P., CARVALHO-NETO J.O., DE SOUSA R.V., RUMPF R., DODE M.N. (2009). Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Anim Reprod Sci* 116, 50-57
- MAZUR P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247, 125-142
- MEDEIROS C.M.O., FORELL F., OLIVEIRA A.T.D., RODRIGUES J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57, 327-344
- MELO C.M., PAPA F.O., FIORATTI E.G., VILLAVARDE A.I.S.B., AVANZI B.R., MONTEIRO G., DELL'AQUA JR. J.A., PASQUINI D.F., ALVARENGA M.A. (2008). Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 107, 331
- MELO C.M., MONTEIRO G.A., GUAISTI B.R., ALVARENGA M.A., DELL'AQUA JR J.A., ZAHN F.S., F.O. PAPA F.O. (2010). Advances in stallion's epididymal sperm technology. *Pferdeheilkunde* 26, 48-52
- MERKT H., KRAUSE D. (1966). Tiefgefrierversuche mit Equidensperma unter Anwendung des sog. Pellet-Verfahrens. *Dtsch tierärztl Wochenschr* 73, 267-268
- MERYMAN H.T. (1971). Cryoprotective agents. *Cryobiology* 8, 173-183
- MILLETTE C.F. (1998). Spermatozoa. In: Knobil E., Neill J.D. (Hrsg.). *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego, USA 586-596
- MONTEIRO G.A.; PAPA F.O., ZAHN F.S., DELLAQUA J.A., MELO C.M., MAZIERO R.R.D., AVANZI B.R., ALVARENGA M.A., GUAISTI P.N. (2011). Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 127, 197-201
- MOORE A.I., SQUIRES E.L., BRUEMMER J.E. , GRAHAM J.K. (2006). Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 26, 5, 215-218

- MORAN D.M., JASKO D.J., SQUIRES E.L., AMANN R.P. (1992). Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 38, 999-1012
- MORRELL J.M., JOHANNISSON A., DALIN A., HAMMAR L., SANDEBERT T., RODRIGUEZ- MARTINEZ H. (2008). Sperm morphology and chromatin integrity in swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand* 50, 1-7
- MORRELL J.M., JOHANNISSON A., DALIN A.-M., RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (2009). Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology* 72, 879-884
- MORRELL J.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ H. (2011). Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Vet Med Int* 1-9
- MORRIS L., TIPLADY C., ALLEN W.R. (2002). The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. *Theriogenology* 58, 643-646
- MORTIMER S.T. (2000). CASA-practical aspect. *J Androl* 515-524
- MUIÑO R., RIVERA M.M., RIGAU T., RODRIGUEZ- GIL J.E., PEÑA A.I. (2008). Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Anim Reprod Sci* 109, 50-64
- NADEN J., AMANN R.P., SQUIRES E.L. (1990). Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behavior in stallion. *J Reprod Fert* 88, 167-176
- NASCIMENTO J., RAPHAEL C.F., ANDRADE A.F.C., ALONSO M.A., CELEGHINI E.C.C., ARRUDA R.P. (2008). Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 28, 6, 351-358
- NEILD D.M., GADELLA B.M., CHAVES M.G., MIRAGAYA M.H., COLENBRANDER B., AGÜERO A. (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59, 1693-1705
- NEILD D., MIRAGAYA M., CHAVES G., PINTO M., ALONSO A., GAMBAROTTA M., LOSINNO L., AGÜERO A. (2006). Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 h after ground transportation. *Anim Reprod Sci* 94, 92-95.
- NICANDER L. (1957). On the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in rabbits. *Acta morphol Neerl-Scand* 99-118
- NICANDER L. (1958). Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in stallions, rams and bulls. *Acta morphol Neerl-Scand*, 337-362

- NICANDER L. (1979). Fine structure of principal cells in the initial segment of the epididymal duct in the ram. *Zbl Vet Med C Anat Histol Embryol* 8, 318-330
- NICKEL R., SCHUMMER A., SEIFERLE E. (1987). Männliche Geschlechtsorgane des Pferdes. In.: Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (Hrsg). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Eingeweide. 6. Auflage Paul Parey Verlag, Berlin, 368
- NISHIKAWA Y. (1975). Studies on the preservation of raw and frozen horse semen. *J Reprod Fertil Suppl* 23, 99-104
- NÚÑEZ- MARTÍNEZ I., MORÁN J.M., PEÑA F.J. (2006 a). Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. *J Androl* 27, 596-603
- NÚÑEZ- MARTÍNEZ I., MORÁN J.M., PEÑA F.J. (2006 b). A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reprod Dom Anim* 41, 408-415
- OETTLÉ E.E. (1986). Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Vet Med* 263-266
- OKO R., CLERMONT Y. (1999). Spermiogenesis. In.: Knobil E., Neill J.D. (Hrsg.) *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego, USA, S 602-609
- OLACIREGUI M., GIL L., MONTÓN A., LUÑO V., JEREZ R.A., MARTÍ J.I. (2014). Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology* 68, 91-95
- ORSI A.M. (1983). Regional histology of the epididymis of the dog. A light microscope study. *Anat Anz* 153, 441-445
- ORTEGA- FERRUSOLA C., GARCÍAS MACÍAS B., SUÁREZ RAMA V., GALLARDO-BOLAÑOS J.M., GONZÁLEZ- FERNÁNDEZ L., TAPIA J.A., RODRÍGUEZ- MARTINEZ H., PEÑAF.J. (2009). Identification of subpopulations in stallion ejaculates: changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reprod Dom Anim* 44, 419-423
- PAMUNGKAS F.A., SETIADI M.A., KARJA N.W.K. (2012). Characteristics and in vitro fertilization ability of ram spermatozoa: comparison of epididymal and ejaculated spermatozoa. *Media Peternakan*, 38-44
- PAPA F.O., MELO C.M., FIORATTI E.G., DELL'AQUA J.A., ZAHN F.S., ALVARENGA M.A. (2008). Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim Reprod Sci* 107, 293-301
- PARKS J.E., GRAHAM J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38, 209-222

- PASQUINI D.F., MELO C.M., PAPA F.O., FIORATTI E.G., LANDIM- ALVARENGA F.C., ALVARENGA, F.S. ZAHN M.A., DE VITA B., DELL'AQUA JR. J.A. (2008). Effects on seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallion. *Anim Reprod Sci* 107, 338-339
- PETRUNKINA A.M., TÖPFER- PETERSEN E., WABERSKI D. (2008). Moderne Verfahren in der spermatologischen Diagnostik. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 5, 262-271
- PHILLIPS P.H., LARDY H.A. (1940). A yolk buffer pabulum for the preservation of bull sperm. *J Dairy Sci* 23, 399-404
- PICKETT B.W., AMANN R.P. (1987). Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *J Equine Vet Sci* 7, 5, 289-302
- PILLET E., LABBE C., BATELLIER F., DUCHAMP G., BEAUMAL V., ANTON M., DESHERCES S., SCHMITT E., MAGISTRINI M. (2012). Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 77, 268-279
- QUINN P.J., CHOW P.Y.W., WHITE I.G. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fert* 60, 407
- QUINTERO- MORENO A., MIRÓ J., RIGAU A.T., RODRÍGUEZ-GIL J.E. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59, 1973-90
- RAMIRES NETO C., MONTEIRO G.A., SOARES R.F., PEDRAZZI C., DELL'AQUA J.A., PAPA F.O., CASTRO-CHAVES M.M., ALVARENGA M.A. (2013). New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology* 79; 1120–1123
- REID B.L., CLELAND K.W. (1957). The structure and function of the epididymis 1. Histology of the rat epididymis. *Aust J Zool* 5, 3, 223-246
- RIGBY S.L., VARNER D.D., THOMPSON J.A., LOVE C.C., BRINSKO S.P., BLANCHARD T.L. (2001). Measurement of sperm concentration in stallion ejaculates using photometric or direct sperm enumeration techniques. *Reprod* 47, AAEP Proceedings, San Diego California, USA, S 236-238
- ROBAIRE B., HINTON B.T., ORGEBIN- CHRIST M-C (2006). The Epididymis. In: Knobil E. Neill J.D. (Hrsg.). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. 3rd Edition Academic Press, S 1071-1148
- RODRIGUEZ- MARTINEZ H. (1992). Sperm production in the stallion. *Acta Vet Scand Suppl* 88, 9-28

- RÜSSE I, SINOWATZ F. (1998). Gametogenese. In: Rüsse I., Sinowatz F. (Hrsg.) Lehrbuch der Embryologie der Haustiere. 2. Auflage, Parey Buchverlag, Berlin, S 43-92
- SAACKE R.G., DALTON J.C., NADIR S., NEBEL R.L., BAME J.H. (2000). Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci* 60– 61, 663-677
- SANCHEZ B., FLORES J.M., PIZARRO M., GARCIA P. (1998). Histological and immunohistochemical study of the cat epididymis. *Anatom Histol Embryol* 27, 135-140
- SALAZAR J.L., TEAGUE S.R., LOVE C.C., BRINSKO S.P., BLANCHARD T.L., VARNER D.D. (2011). Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology* 76, 409-418
- SCHIMMING B.C., VICENTINI C.A. (2001). Ultrastructural features in the epididymis of the dog (*Canis familiaris*, L.). *Anat Histol Embryol* 30, 327-332
- SIEME H., KLUG E. (2003) Gefrierkonservierung von Pferdesamen. In.: Sieme H., Klug E. (Hrsg.). Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis. Verlag M. & H. Schaper, Alfeld, Hannover, Deutschland, S 101-114
- SIEME H., MARTINSSON G., RAUTERBERG H., WALTER K., AURICH C., PETZOLDT R., KLUG E. (2003). Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod Anim* 38, 134-140
- SIEME H. (2009). Semen evaluation. In.: Samper J.C. (Hrsg.) Equine breeding management and artificial insemination 2. Auflage. Saunders Elsevier, Missouri, USA, S 57-74
- SIEME H., HARRISON R.A.P., PETRUNKINA A.M. (2008). Cryobiological determinants of frozen semen quality with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci* 107, 276-292
- SINGER S.J., NICOLSON G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731
- SINOWATZ F. (2001). Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane. In: Busch W., Holzmann A. (Hrsg.). Veterinärmedizinische Andrologie Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Schattauer Verlag Stuttgart, S 15-17
- SRIVASTAV A. (2000). Maturation-dependent glycoproteins containing both N-and O-linked oligosaccharides in epididymal sperm plasma membrane of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Reprod Fert* 119, 241-252
- SONGSASEN N., TONG J., LEIBO S.P. (1998). Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *J Exp Zool* 280, 189-196

- SQUIRES E.L., KEITH S.L., GRAHAM J.K. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62, 1056-1065
- SQUIRES E.L., PICKETT B.W. (2011). Factors affecting sperm production and output. In.: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D., (Hrsg.). *Equine Reproduction*. Blackwell Publishing Ltd. West Sussex Großbritannien, S 689-704
- STOUT T.A.E., MORRIS L.H.A., LI X., ALLEN W.R. (1999). The effect of seminalplasma on the motility and cryopreservability of horse epididymal sperm. In: Havemeyer Foundation Monograph Series No. 1, 5–6
- SULLIVAN R., FRENETTE G., GIROUARD J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 9, 483-491
- THOMPSON D.L., PICKETT B.W., SQUIRES E.L., AMANN R.P. (1979). Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. *J Reprod Fert Suppl* 27, 13-17
- TIPLADY C.A., MORRIS L.H.-A., ALLEN W.R. (2002). Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology* 58, 225-228
- TISCHNER M. (1979). Evaluation of deep-frozen semen in stallion. *J Reprod Fert Suppl* 27, 53-59
- USSELMANN M.C., CONE R.A. (1983). Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by "immobilin", a high molecular weight glycoprotein. *Biol Reprod* 29, 1241-1253
- VARNER D.D., LOVE C.C. (2003). Semen evaluation. Proc Ann Meeting of Italian Association of Equine Veterinarians, Pisa, Italien
- VARNER D.D. (2003). Methods for evaluation of stallion for breeding soundness. Proc Ann Meeting of the Italian Assoc Equine Veterinarians, Pisa, Italien
- VARNER D.D. (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70, 448-462
- VERSTEGEN J., IGUER-OUADA M., ONELIN K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179
- VESTED A., RAMLAU-HANSEN C.H., BONDE J.P., THULSTRUP A.M., KRISTENSEN S.L., TOFT G. (2011). A comparison of conventional and computer-assisted semen analysis (CRISMAS software) using samples from 166 young Danish men. *Asian J Androl* 13, 453-458

- VIDAMENT M., ECOT P., NOUE P., BOURGEOIS C., MAGISTRINI M., PALMER E. (2000). Centrifugation and addition of glycerol at 22 °C instead of 4 °C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 54, 907-919
- VIDAMENT M. (2005). French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 89, 115-136
- VISHWANATH R., P. SHANNON P., CURSON B. (1992). Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilising ability of bull sperm. *Anim Reprod Sci* 29, 185-194
- VOLKMANN D.H., VAN ZYL D. (1987). Fertility of stallion semen frozen in 0.5 ml straws. *J Reprod Fert Suppl* 35, 143-148
- VOLKMANN D.H., GERBER D., ERB H.N. (2001). Comparison between freezability of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim Reprod Sci* 68, 340
- VOSS J.L., PICKETT B.W., SQUIRES E.L. (1981). Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationships to fertility. *J Am Vet Med Assoc* 178, 287–289
- VYT P., MAES D., RIJSSELAERE T., DEJONCKHEERE E., CASTRYCK F., VAN SOOM A. (2004). Motility assessment of porcine spermatozoa: a comparison of methods. *Reprod Dom Anim* 39, 447-453
- WABERSKI D., PETRUNKINA A.M. (2007). Spermatologie. In: Busch W., Waberski D. (Hrsg.) *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*. Schattauer Verlag Stuttgart, S 99-118
- WABERSKI D. (2007) Spermien und Seminalplasma. In: Busch W., Waberski D. (Hrsg.) *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*. Schattauer Verlag Stuttgart 78-83
- WALKER J.S., WINET H., FREUND M. (1982). A comparison of subjective and objective sperm motility evaluation. *J Androl* 3, 184-192
- WATSON P.F. (1975). The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescence probe. *J Reprod Fert* 42, 105-111
- WEITZE K.-F. (2001). Andrologischer Untersuchungsgang. In: Busch W., Holzmann A. (Hrsg.) *Veterinärmedizinische Andrologie Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*. Schattauer Verlag Stuttgart, S 337-346
- WILHELM K.M., GRAHAM J.K., SQUIRES E.L. (1996). Comparison of fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology* 46, 559-578

WISHY A.B.E. (1974). Testicular and epididymal sperm reserves in the ass (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*). *Z. Tierzüchtg Züchtungsbiol* 91, 334-344

WÖCKENER A., PAPA F.O., BADER H., LEPS H., SCHMITZ R. (1989). Investigations on the cryopreservation of stallion semen. *Pferdeheilkunde* 5, 333-336

WROBEL K.-H., DELLMANN H.-D. (1993). Male reproductive system. In.: Dellmann H.D. (Hrsg.). *Textbook of Veterinary Histology* (4<sup>th</sup> Edition). Williams & Wilkins, Iowa, USA, S 213-223

YEUNG C.-H., COOPER T.G. (2002). Acquisition and development of sperm motility upon maturation in the epididymidis. In.: Robaire B., Hinton B.T. (Hrsg.). *The epididymis from molecules to clinical practice*. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York, USA, S 417-434

YU I., LEIBO S.P. (2002). Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57, 1179-1190

## 8. Anhang

### 8.1 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Literaturübersicht verschiedener Einfrierprogramme mit dem Einfrierautomat .....	32
<b>Tab. 2:</b> Literaturübersicht über verschiedene Einfrierprogramme mit der Schwimmrampe ...	33
<b>Tab. 3:</b> Methoden zur Tiefgefrierkonservierung von Nebenhodenspermien.....	36
<b>Tab. 4:</b> Einfrierprogramme für die Tiefgefrierung der Nebenhodenschwanzspermien mit der Schwimmrampe und dem Einfrierautomaten mit bzw. ohne vorangegangene Kühlung .....	49
<b>Tab. 6:</b> Makroskopische Untersuchung der Nebenhodenspülflüssigkeit der Abschnitte E7 – E9 .....	55
<b>Tab. 7:</b> Median-, Minimal- und Maximalwerte der Spermienkonzentration, bestimmt mittels NucleoCounter® und Zählkammer in den linken und rechten Nebenhodenabschnitten E7 – E9 .....	57
<b>Tab. 8:</b> Median-, Minimal- und Maximalwerte der Spermiengesamtzahl, bestimmt mittels NucleoCounter® und Zählkammer in den linken und rechten Nebenhodenabschnitten E7 – E9 .....	59
<b>Tab. 10:</b> pH-Wert der Nebenhodenspülflüssigkeit der Abschnitte E7 – E9 .....	63
<b>Tab. 11:</b> Fremdzellgehalt der Nebenhodenspülflüssigkeit der Abschnitte E7 – E9 .....	63
<b>Tab. 12:</b> Subjektiv geschätzte Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 nach Verdünnung mit EquiPro™ .....	64
<b>Tab. 13:</b> Objektiv bestimmte Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 nach Verdünnung mit EquiPro™ .....	66
<b>Tab. 14:</b> Median- Minimal- und Maximalwerte der VSL, VCL, VAP, LIN, STR, WOB und ALH der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9 nach der Verdünnung mit EquiPro™ .....	67
<b>Tab. 15:</b> Median-, Minimal- und Maximalwerte der Gesamt-, Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 des linken und rechten Nebenhodens nach 0, 24 , 48, 72, und 96 Stunden bei +4 °C.....	74
<b>Tab. 16:</b> Subjektiv geschätzte Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 nach Verdünnung mit Gent-Verdünner.....	76
<b>Tab. 17:</b> Objektiv bestimmte Vorwärts-, Orts- und Gesamtbeweglichkeit der Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 nach Verdünnung mit Gent-Verdünner.....	77
<b>Tab. 18:</b> Median-, Minimal- und Maximalwerte der VSL, VCL, VAP, LIN, STR, WOB und ALH der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9 nach der Verdünnung mit Gent-Verdünner .....	81
<b>Tab. 20:</b> Mittels CASA bestimmte Vorwärts-, Orts-, und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien, tiefgefroren mit SRS, nach dem Auftauen .....	84

<b>Tab. 21:</b> CASA Parameter der Nebenhodenschwanzspermien nach dem Auftauen, tiefgefroren mit SRS .....	86
<b>Tab. 22:</b> Mittels CASA bestimmte Vorwärts-, Orts-, und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien, tiefgefroren mit SRL, nach dem Auftauen.....	90
<b>Tab. 23:</b> CASA Parameter der Nebenhodenschwanzspermien nach dem Auftauen, tiefgefroren mit SRL .....	91
<b>Tab. 24:</b> Mittels CASA bestimmte Vorwärts-, Orts-, und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien, tiefgefroren mit ICS, nach dem Auftauen .....	95
<b>Tab. 25:</b> CASA Parameter der Nebenhodenschwanzspermien nach dem Auftauen, tiefgefroren mit ICS .....	96
<b>Tab. 26:</b> Mittels CASA bestimmte Vorwärts-, Orts-, und Gesamtbeweglichkeit der Nebenhodenschwanzspermien, tiefgefroren mit ICL, nach dem Auftauen.....	100
<b>Tab. 27:</b> CASA Parameter der Nebenhodenschwanzspermien nach dem Auftauen, tiefgefroren mit ICL.....	101
<b>Tab.5:</b> Korrelationskoeffizienten des Volumens der Spülflüssigkeit der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 sowie des Nebenhodengewichts und -volumens sowie der Länge, Breite, Höhe, des Volumens und Umfanges des Nebenhodenschwanzes .....	155
<b>Tab.9:</b> Korrelationskoeffizienten für den Zusammenhang zwischen dem Nebenhodengewicht,- volumen und der Größe des Nebenhodenschwanzes sowie dessen Volumen und Umfang mit der Spermienkonzentration und Spermiengesamtzahl der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte.....	156
<b>Tab. 19:</b> Korrelation der verschiedenen Verdünner, EquiPro® und Gent-Verdünner, auf die subjektiv und objektiv bestimmte Motilität der Nebenhodenspermien von E7 – E9.....	158
<b>Tab. 28:</b> Gesamt-, Vorwärtsbeweglichkeit, VSL, VCL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9, tiefgefroren mit 4 verschiedenen Einfriermethoden, zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 Stunden nach dem Auftauen.....	158

## 8.2 Tabellen

**Tab.5:** Korrelationskoeffizienten des Volumens der Spülflüssigkeit der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 sowie des Nebenhodengewichts und -volumens sowie der Länge, Breite, Höhe, des Volumens und Umfanges des Nebenhodenschwanzes

<b>E7</b>	<b>Volumen der Spülflüssigkeit (ml)</b>	
	<b>Links</b>	<b>Rechts</b>
NeHogewicht	-0,1216	-0,0407
NeHovolumen	-0,0670	0,2647
NeHoschwanzlänge	0,2319	-0,3696
NeHoschwanzbreite	-0,1733	0,5718
NeHoschwanzhöhe	0,4230	0,3765
NeHoschwanzvolumen	0,4391	0,3623
NeHoschwanzumfang	0,0083	0,0956
<b>E8</b>	<b>Links</b>	<b>Rechts</b>
NeHogewicht	-0,0377	-0,0907
NeHovolumen	0,0502	0,3259
NeHoschwanzlänge	-0,1049	0,0341
NeHoschwanzbreite	0,4936	0,2987
NeHoschwanzhöhe	0,2095	0,1627
NeHoschwanzvolumen	0,3548	0,1897
NeHoschwanzumfang	0,1765	-0,2609
<b>E9</b>	<b>Links</b>	<b>Rechts</b>
NeHogewicht	0,5624	0,7232
NeHovolumen	0,7667	0,5301
NeHoschwanzlänge	-0,3798	0,2183
NeHoschwanzbreite	0,5321	-0,4714
NeHoschwanzhöhe	0,6996	-0,5212
NeHoschwanzvolumen	0,6053	-0,6383
NeHoschwanzumfang	0,4440	0,2221

**Tab.9:** Korrelationskoeffizienten für den Zusammenhang zwischen dem Nebenhodengewicht,- volumen und der Größe des Nebenhodenschwanzes sowie dessen Volumen und Umfang mit der Spermienkonzentration und Spermiengesamtzahl der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte

<b>E7, links</b>	<b>Spermienkonz. manuell</b>	<b>SPGZ manuell</b>	<b>Spermienkonz. NC</b>	<b>SPGZ NC</b>
NeHogewicht	-0,2267	-0,2248	-0,2521	-0,2530
NeHovolumen	-0,0511	-0,0489	-0,1245	-0,1238
NeHoschwanzlänge	-0,6807	-0,6605	-0,6073	-0,5887
NeHoschwanzbreite	0,7051	0,6903	0,6186	0,6048
NeHoschwanzhöhe	0,7788	0,7945	0,7695	0,7811
NeHoschwanzvolumen	0,2838	0,3068	0,2646	0,2839
NeHoschwanzumfang	0,7904	0,7836	0,7041	0,6982
<b>E7, rechts</b>	<b>Spermienkonz. manuell</b>	<b>SPGZ manuell</b>	<b>Spermienkonz. NC</b>	<b>SPGZ NC</b>
NeHogewicht	-0,0064	-0,0111	0,0179	0,0100
NeHovolumen	-0,0522	-0,0477	-0,0265	-0,0273
NeHoschwanzlänge	-0,3948	-0,4061	-0,3953	-0,4055
NeHoschwanzbreite	0,4799	0,4991	0,4736	0,4914
NeHoschwanzhöhe	0,2371	0,2541	0,2308	0,2468
NeHoschwanzvolumen	0,1674	0,1883	0,1685	0,1877
NeHoschwanzumfang	0,5456	0,5309	0,5751	0,5585
<b>E8, links</b>	<b>Spermienkonz. manuell</b>	<b>SPGZ manuell</b>	<b>Spermienkonz. NC</b>	<b>SPGZ NC</b>
NeHogewicht	-0,0623	-0,0506	-0,3505	-0,3213
NeHovolumen	0,1678	0,1773	-0,1127	0,0474
NeHoschwanzlänge	-0,4223	-0,4043	-0,4244	-0,4070
NeHoschwanzbreite	0,6182	0,6245	0,6042	0,6125
NeHoschwanzhöhe	0,2095	0,6916	0,7781	0,7924
NeHoschwanzvolumen	0,4993	0,5340	0,4050	0,4423
NeHoschwanzumfang	0,6961	0,6761	0,7713	0,7443
<b>E8, rechts</b>	<b>Spermienkonz. manuell</b>	<b>SPGZ manuell</b>	<b>Spermienkonz. NC</b>	<b>SPGZ NC</b>
NeHogewicht	-0,0511	-0,0499	0,0160	0,0156
NeHovolumen	-0,0955	-0,0849	0,0474	0,0564
NeHoschwanzlänge	-0,4055	-0,4040	-0,4532	-0,4498
NeHoschwanzbreite	0,5549	0,5609	0,5647	0,5706
NeHoschwanzhöhe	0,3077	0,3123	0,3417	0,3464
NeHoschwanzvolumen	0,2662	0,2716	0,2664	0,2726
NeHoschwanzumfang	0,5155	0,5019	0,5452	0,5289
<b>E9, links</b>	<b>Spermienkonz. manuell</b>	<b>SPGZ manuell</b>	<b>Spermienkonz. NC</b>	<b>SPGZ NC</b>
NeHogewicht	0,0303	0,1747	-0,1519	0,0204
NeHovolumen	0,2337	0,4116	0,0543	0,2634
NeHoschwanzlänge	0,0339	-0,0448	-0,0693	-0,1368
NeHoschwanzbreite	0,3382	0,4162	0,4396	0,5225
NeHoschwanzhöhe	0,4526	0,6173	0,2092	0,3985
NeHoschwanzvolumen	0,6316	0,7545	0,4335	0,5861
NeHoschwanzumfang	0,2856	0,3623	0,6141	0,6645

<b>E9, rechts</b>	<b>Spermienkonz. manuell</b>	<b>SPGZ manuell</b>	<b>Spermienkonz. NC</b>	<b>SPGZ NC</b>
NeHogewicht	0,4470	0,5729	0,2427	0,3529
NeHovolumen	0,2837	0,3893	0,2321	0,3182
NeHoschwanzlänge	0,1958	0,2287	0,1826	0,2072
NeHoschwanzbreite	-0,3127	-0,3569	-0,3305	-0,3434
NeHoschwanzhöhe	-0,4819	-0,5030	-0,4882	-0,4828
NeHoschwanzvolumen	-0,4521	-0,4908	-0,4848	-0,4839
NeHoschwanzumfang	0,5726	0,5730	0,4399	0,4697

**Tab. 19:** Korrelation der verschiedenen Verdüner, EquiPro® und Gent-Verdüner, auf die subjektiv und objektiv bestimmte Motilität der Nebenhodenspermien von E7 – E9

Korrelation Beweglichkeit- Verdünerart		E9		E8		E7	
		Links	Rechts	Links	Rechts	Links	Rechts
V (%)	CASA	0,91706	0,91706	0,55946	0,55946	0,88432	0,88432
	Subjektiv	0,82607	0,93405	0,58244	0,17823	0,86236	0,89781
O (%)	CASA	-0,2492	-0,2492	0,2591	0,2591	0,27445	0,27445
	Subjektiv	0,10293	0,15335	0,12799	0,34279	0,38181	0,99337
Gesamt (%)	CASA	0,8675	0,8675	0,56519	0,56519	0,88147	0,88147
	Subjektiv	0,8675	0,8675	0,56519	0,56519	0,88147	0,88147

**Tab. 28:** Gesamt-, Vorwärtsbeweglichkeit, VSL, VCL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH der Nebenhodenschwanzpermien von E7 – E9, tiefgefroren mit 4 verschiedenen Einfrieremethoden, zu den Zeitpunkten 0, 24, 48 Stunden nach dem Auftauen

Nebenhodenabschnitt E9		Zeitpunkt H0			
		SRS	SRL	ICS	ICL
Gesamt (%)	Links	2,40 (0,86-6,53)	3,47 (0,66-8,43)	4,32 (0,61-11,39)	3,72 (1,04-18,27)
	Rechts	2,76 (1,21-11,16)	3,08 (1,53-11,23)	4,8 (0,82-15,06)	4,18 (2,02-16,74)
V (%)	Links	1,20 (0,05-3,51)	1,48 (0-4,7)	2,55 (0,11-8,42)	1,83 (0-13,22)
	Rechts	1,29 (0,18-4,73)	0,89 (0,54-7,33)	2,71 (0-8,18)	2,27 (0,8-15,85)
VSL (µm/s)	Links	37,79 (2,84-45,21)	39,97 *E7, E8 (0-48,2)	44,26 (8,01-47,98)	46,75 (0-58,05)
	Rechts	38,46 (9,85-50,4)	40,81 *E8 (7,59-52,96)	43,44 (0-52,60)	46,66 *E7 (28,91-51,38)
VCL (µm/s)	Links	107,59 (7,12-132,46)	118,58 *E8 (0-132,33)	125,90 (26,81-154,91)	122,70 (0-146,71)
	Rechts	108,67 (19,49-145,88)	113,21 (14,63-166,40)	130,47 *E8 (0-147,20)	145,26 (78,22-160,61)
VAP (µm/s)	Links	53,55 (4,57-61,55)	53,97 *E8 (0-72,05)	60,13 (10,11-79,9)	60,86 (0-74,19)
	Rechts	52,82 (12,12-73,9)	60,97 *E8 (9,55-75,04)	62,28 (0-71,65)	67,47 (38,33-81,49)
LIN	Links	0,24 (0,07-0,41)	0,17 (0-0,41)	0,34 (0,11-0,39)	0,34 (0-0,45)
	Rechts	0,34 (0,18-0,38)	0,31 (0,18-0,47)	0,29 *E8 (0-0,39)	0,32 *E7 (0,3-0,37)
STR	Links	0,52 (0,1-0,78)	0,67 (0-0,77)	0,71 (0,27-0,76)	0,74 (0-0,84)
	Rechts	0,73 (0,27-0,89)	0,64 *E8 (0,27-0,76)	0,6 *E8 (0-0,77)	0,67 *E7 (0,58-0,76)
WOB	Links	0,39 (0,11-0,55)	0,45 (0-0,55)	0,46 (0,13-0,55)	0,49 (0,30-0,4)
	Rechts	0,48 (0,25-0,53)	0,47 (0,22-0,57)	0,43 (0-0,51)	0,47 (0,41-0,54)
ALH (Hz)	Links	2,57 (0,31-3,27)	2,68 *E8 (0-3,31)	3,09 (0,77-4,26)	3,09 (0 -3,89)
	Rechts	2,93 (0,65-3,51)	2,78 (0,7-3,92)	3,13 (0-3,5)	3,42 (2,12-3,88)

<b>Nebenhodenabschnitt E8</b>		<b>SRS</b>	<b>SRL</b>	<b>ICS</b>	<b>ICL</b>
Gesamt (%)	Links	2,94 (0,55-6,41)	3,10 (0,93-10,9)	3,39 (0,45-9,74)	8,87 (0,98-8,87)
	Rechts	4,56 (0,69-15,82)	8,17 (1,03-28,67)	8,85 (2,48-29,08)	7,27 (0,87-31,35)
V (%)	Links	1,48 (0,07-3,28)	2,28 (0,52-9,07)	1,84 (0,16-7,66)	1,70 (0,63-6,01)
	Rechts	2,84 (0,42-11,92)	5,39 (0,7-21,39)	6,15 (1,09-24,11)	4,48 (0,56-27,87)
VSL (µm/s)	Links	39,23 (4,02-58,23)	51,43 *E7, E9 (33,98-57,94)	48,62 (13,67-80,68)	50,15 (36,8-59,73)
	Rechts	48,9 (14,01-68,26)	60,18 *E9 (33,54-70,84)	51,87 (29,81-68,32)	49,46 (27,22-68,63)
VCL (µm/s)	Links	107,52 (8,88-168,31)	144,82 *E9 (78,6-175,39)	146,74 (40,95-199,99)	133,02 (101,67-183,59)
	Rechts	128,60 (40,63-157,5)	143,85 (77,97-160,72)	125,85 *E9 (69,06-148,43)	136,32 (72,62-192,58)
VAP (µm/s)	Links	52,69 (4,84-82,04)	71,18 *E9 (42,73-83,54)	67,07 (16,58-97,82)	68,39 (47,03-85,21)
	Rechts	52,69 (4,84-82,04)	73,32 *E9 (40,59-88,22)	64,93 (36,73-80,07)	67,63 (35,20-93,37)
LIN	Links	0,28 (0,08-0,41)	0,37 (0,2-0,47)	0,31 (0,11-0,54)	0,36 (0,24-0,43)
	Rechts	0,35 (0,15-0,56)	0,4 (0,28-0,47)	0,38 *E9 (0,29-0,49)	0,36 (0,24-0,41)
STR	Links	0,57 (0,14-0,79)	0,70 (0,4-0,83)	0,68 (0,22-0,88)	0,71 (0,52-0,83)
	Rechts	0,73 (0,27-0,89)	0,46 *E9 (0-0,53)	0,77 *E9 (0,54-0,85)	0,73 (0,52-0,81)
WOB	Links	0,39 (0,09-0,52)	0,48 (0,34-0,57)	0,46 (0,16-0,60)	0,49 (0,30-0,55)
	Rechts	0,49 (0,18-0,63)	0,50 (0,34-0,58)	0,48 (0,35-0,60)	0,47 (0,30-0,51)
ALH (Hz)	Links	2,23 (0,25-3,96)	3,27 *E9 (2,04-3,78)	3,20 (0,96-4,71)	2,97 (2,22 -4,56)
	Rechts	2,72 (0,84-4,03)	3,22 (1,95-3,41)	2,92 (1,5-3,33)	3,10 (1,96-4,2)

Nebenhodenabschnitt E7		SRS	SRL	ICS	ICL
Gesamt (%)	Links	1,93 (0,88-5,57)	4,58 (0-11,72)	6,68 (1,19-19,92)	4,14 (0,65-22,02)
	Rechts	5,25 (0,46-20,68)	10,45 (1,31-30,69)	6,30 (1,06-39,59)	10,90 (0,81-39,48)
V (%)	Links	0,95 (0-3,44)	2,21 (0-9,81)	3,11 (0,50-16,51)	2,94 (0,31-19,19)
	Rechts	3,14 (0,46-18,40)	5,62 (0-25,74)	4,53 (0,25-36,29)	6,23 (0,51-36,76)
VSL (µm/s)	Links	15,91 (0-52,72)	40,33 *E8, E9 (0-76,37)	46,11 (5,41-55,95)	39,13 (3,93-72,45)
	Rechts	51,06 (13,14-78,22)	56,49 (0-76,88)	43,76 (4,55-75,85)	60,51 *E9 (3,52-78,44)
VCL (µm/s)	Links	42,56 (0-146,30)	124,58 (0-172,05)	122,182 (21,9- 173,62)	117,87 (19,12-181,22)
	Rechts	127 (24,59-162,21)	151,30 (0-207,03)	122,36 (11,87-157,98)	156,85 (11,73-176,27)
VAP (µm/s)	Links	22,64 (0-66,74)	59,34 (0-89,36)	59,39 (10,58-91,61)	57,47 (7,2-88,40)
	Rechts	63,48 (14,27-97,33)	76,33 (0-107,88)	60,25 (6,18-90,80)	80,27 (9,59-92,75)
LIN	Links	0,14 (0-0,37)	0,27 (0-0,45)	0,31 (0,04-0,48)	0,32 (0,03-0,42)
	Rechts	0,14 (0-0,37)	0,36 (0-0,44)	0,33 (0,06-0,52)	0,41 *E9 (0,05-0,46)
STR	Links	0,25 (0-0,77)	0,52 (0-0,85)	0,60 (0,09-0,82)	0,61 (0,09-0,82)
	Rechts	0,76 (0-0,83)	0,72 (0-0,82)	0,72 (0,12-0,85)	0,79 *E9 (0,06-0,86)
WOB	Links	0,19 (0-0,45)	0,41 (0-0,52)	0,44 (0,08-0,59)	0,43 (0,06-0,54)
	Rechts	0,49 (0,1-0,62)	0,46 (0-0,53)	0,46 (0,09-0,62)	0,51 (0,14-0,55)
ALH (Hz)	Links	1,21 (0-3,17)	2,82 (0-3,93)	2,60 (0,56-3,52)	2,84 (0,50-3,60)
	Rechts	3,02 (0,44-3,48)	2,82 (0-3,93)	2,73 (0,31-3,26)	3,36 (0,25-3,79)

		Zeitpunkt H1			
Nebenhodenabschnitt E9		SRS	SRL	ICS	ICL
Gesamt (%)	Links	2,14 (0,69-8,54)	3,78 (0,09-8,48)	5,64 (0,57-13,94)	4,93 (0,76-12,6)
	Rechts	3,18 (0,45-8,03)	4,16 *E8 (0,74-9,36)	4,59 (0,33-12,94)	4,10 *E8 (0,59-8,79)
V (%)	Links	0,94 (0-5,95)	1,89 (0-6,59)	3,32 (0,31-10,07)	3,44 (0,07-9,95)
	Rechts	1,83 (0-7,5)	2,48 *E8 (0,39-5,25)	2,79 (0,12-10,28)	2,45 (0,12-6,38)
VSL (µm/s)	Links	34,83 (0-54,8)	38,73 (0-48,56)	48,84 (14,01-62,1)	47,19 (2,6-63,62)
	Rechts	35,57 (0-59,95)	43,57 *E8 (18,06-52,8)	39,75 (10,81-65,11)	40,39 (20,44-64,72)
VCL (µm/s)	Links	85,30 (0-130,2)	125,73 (0-135,84)	130,29 (36,63-180,24)	134,47 (25,09-159,11)
	Rechts	109,89 (0-148,43)	129,3 *E8 (52,09-147,27)	102,37 (26,31-163,11)	122 (48,61-171,35)
VAP (µm/s)	Links	44,77 (0-68,75)	58,99 (0-66,64)	67,31 (18,05-79,92)	62,74 (8,54-80,8)
	Rechts	54,3 (0-72)	61,65 (25,5-71,68)	63,63 (13,17-155,27)	61,77 (25,55-81,3)
LIN	Links	0,04 (0-0,41)	0,31 (0-0,37)	0,34 (0,18-0,43)	0,33 (0,02-0,43)
	Rechts	0,32 (0,15-0,44)	0,34 (0,18-0,38)	0,39 (0,06-0,44)	0,35 *E8 (0,2-0,38)
STR	Links	0,60 (0-0,81)	0,67 (0-0,79)	0,72 (0,34-0,77)	0,72 (0,05-0,8)
	Rechts	0,65 (0-0,83)	0,68 (0,36-0,78)	0,62 (0,14-0,8)	0,68 (0,38-0,79)
WOB	Links	0,41 (0-0,52)	0,46 (0-0,53)	0,47 (0,25-0,53)	0,47 (0,06-0,55)
	Rechts	0,5 (0,2-0,57)	0,49 (0,25-0,57)	0,17 (0,07-0,54)	0,48 (0,25-0,56)
ALH (Hz)	Links	2,07 (0-3,25)	2,92 (0-3,15)	3,16 (1,1-4,41)	3,10 (0,57-3,76)
	Rechts	2,87 (0-3,71)	3,17 (1,33-3,65)	0,90 (0,57-3,68)	3,28 (1,4-3,97)

<b>Nebenhodenabschnitt E8</b>		<b>SRS</b>	<b>SRL</b>	<b>ICS</b>	<b>ICL</b>
Gesamt (%)	Links	2,46 (0,35-5,81)	3 (1,15-10,88)	2,94 (0,56 -12,38)	5,2 (0 -10,05)
	Rechts	3,2 (1,02-11,94)	9,94 *E9 (1,55-20,71)	9,09 (1,23-23)	8,75 *E9 (1,69-33,34)
V (%)	Links	0,64 (0-4,91)	1,34 (0,66-8,66)	1,75 (0,07-11,45)	3,52 (0-5,76)
	Rechts	2,46 (0,2-10,09)	5,79 *E9 (0,55-17,38)	7,30 (0,32-19,62)	7 (0,92-28,81)
VSL (µm/s)	Links	17,95 (0-70,69)	39,50 (13,66-71,66)	54,14 (6,05-66,16)	58,77 (0-69,38)
	Rechts	52,58 (17,11-94,11)	63,31 *E9 (28,69-80,45)	59,65 (15,13-79,71)	53,30 (32,75-83,37)
VCL (µm/s)	Links	58,15 (0-162,18)	104,83 (44,44-166,4)	134,69 (14,53-157,62)	142,03 (0-194,64)
	Rechts	142,08 (42,75-198,33)	141,72 *E9 (77,81-202,49)	147,97 (46,82-190,78)	139,95 (94,8-194,83)
VAP (µm/s)	Links	29,47 (0-84,96)	52,29 (18,51-85,77)	66,85 (7,33-82,53)	71,22 (0-106,34)
	Rechts	71,22 (25,63-11,89)	76,39 (40,22-104,49)	73,33 (21,19-97,41)	72,34 (47,56-100,8)
LIN	Links	0,13 (0-0,44)	0,28 (0,09-0,44)	0,36 (0,07-0,42)	0,37 (0-0,46)
	Rechts	0,13 (0-0,44)	0,36 (0,3-0,45)	0,39 (0,11-0,49)	0,38 *E9 (0,29-0,48)
STR	Links	0,26 (0-0,83)	0,60 (0,19-0,83)	0,70 (0,14-0,84)	0,74 (0-0,87)
	Rechts	0,76 (0,25-0,86)	0,75 (0,58-0,82)	0,77 (0-0,88)	0,71 (0,58-0,83)
WOB	Links	0,21 (0-0,53)	0,39 (0,14-0,53)	0,46 (0,08-0,52)	0,49 (0-0,53)
	Rechts	0,50 (0,2-0,57)	0,52 (0,39-0,54)	0,50 (0,15-0,57)	0,50 (0,42-0,57)
ALH (Hz)	Links	1,26 (0-3,55)	2,93 (0,46-3,69)	3,20 (0,25-3,58)	3,26 (0-4,19)
	Rechts	3,23 (0,95-3,98)	3,27 (0-4,24)	3,17 (1,09-4,3)	3,09 (2,28-4,62)

<b>Nebenhodenabschnitt E7</b>		<b>SRS</b>	<b>SRL</b>	<b>ICS</b>	<b>ICL</b>
Gesamt (%)	Links	2,17 (0,91-8,64)	3,67 (0,4-8,71)	3,63 (0,86-18,16)	3,93 (1,23 -21,6)
	Rechts	5,72 (0,48-14,31)	8,18 (0-27,93)	7,83 (0-26,32)	9,35 (0-32,35)
V (%)	Links	2,17 (0,91-8,64)	2,92 (0,4-8,2)	2,84 (0,46-16,30)	2,94 (0,71-20,09)
	Rechts	2,59 (0-12,46)	5,85 (0-27,93)	3,97 (0-23,68)	5,72 (0-28,49)
VSL (µm/s)	Links	20,66 (0-64,02)	41,18 (5,82-84,74)	47,63 (3,74-71,31)	49,83 (3,69-79,41)
	Rechts	50,05 (0-90,12)	47,96 (0-71,12)	58,23 (0-86,64)	54,81 (0-69,72)
VCL (µm/s)	Links	50,30 (0-152,19)	121,73 (20,44-162,92)	127,86 (15,02-191,62)	124,74 (33,99-195,58)
	Rechts	129,74 (0-186,06)	140,12 (0-201,01)	146,93 (0-196,6)	137,14 (0-175,03)
VAP (µm/s)	Links	27,13 (0-73,89)	58,10 (11,41-98,15)	65,66 (4,42-93,77)	62,88 (13,95-98,63)
	Rechts	69,39 (0-106,92)	68,95 (0-108,65)	73,31 (0-109,14)	68,58 (0-86,99)
LIN	Links	0,14 (0-0,47)	0,28 (0,03-0,52)	0,28 (0,04-0,43)	0,31 (0,02-0,42)
	Rechts	0,29 (0-0,47)	0,33 (0-0,42)	0,37 (0-0,5)	0,35 (0-0,47)
STR	Links	0,25 (0-0,88)	0,64 (0,08-0,86)	0,56 (0,13-0,85)	0,60 (0,04-0,8)
	Rechts	0,6 (0-0,84)	0,68 (0-0,82)	0,76 (0-0,86)	0,73 (0-0,86)
WOB	Links	0,54 (0-0,58)	0,40 (0,07-0,6)	0,39 (0,05-0,52)	0,43 (0,07-0,52)
	Rechts	0,44 (0-0,57)	0,45 (0-0,55)	0,48 (0-0,58)	0,47 (0-0,55)
ALH (Hz)	Links	1,08 (0-3,33)	2,93 (0,46-3,69)	3,00 (0,46-4,26)	2,62 (0,71-3,87)
	Rechts	3,05 (0-3,92)	3,27 (0-4,24)	3,15 (0-4,23)	3,14 (0-3,99)

		Zeitpunkt H2			
Nebenhodenabschnitt E9		SRS	SRL	ICS	ICL
Gesamt (%)	Links	2,18 (0,37-14,93)	3,33 (1,23-9,24)	6,86 (0,77-13,3)	4,98 (0,41-17,78)
	Rechts	3,12 (0,84-10,17)	4,36 (0,55-9,09)	2,41 (0,52-11,5)	5,51 (0,27-8,66)
V (%)	Links	1,00 (0,09-12,13)	1,55 (0-6,81)	2,40 (0,17-9,45)	3,20 (0-11,59)
	Rechts	1,50 (0-9,41)	1,76 (1,53-5,25)	1,12 (0,09-6,24)	2,82 (0,16-7,98)
VSL (µm/s)	Links	28,29 (8,52-78,83)	48,30 (0-61,41)	45,27 (16,9-53,07)	43,87 (0-62,96)
	Rechts	39,28 (0-71,48)	43,98 (8,87-62,25)	39,95 (7,48-56,56)	45,2 (7,64-71,48)
VCL (µm/s)	Links	108,01 (17,45-171,09)	125,29 (0-156,45)	126,6 (30,2-141,06)	121,61 (0-163,67)
	Rechts	106,36 (0-163,49)	109,28 (17,93-198,41)	124,08 (18,88-152,9)	122,37 (18,44-172,14)
VAP (µm/s)	Links	52,15 *E7 (9,81-94,5)	64,45 (0-82,75)	60,4 (21,23-68,51)	62,48 (0-78,75)
	Rechts	51,61 (0-87,56)	69,43 (9,89-100,99)	61,27 (11,08-94,39)	68,77 (9,2-91,06)
LIN	Links	0,28 *E7 (0,08-0,46)	0,37 *E7 (0-0,43)	0,36 *E7, E8 (0,31-0,4)	0,33 (0-0,38)
	Rechts	0,34 (0-0,43)	0,34 (0,08-0,42)	0,33 (0,07-0,39)	0,33 (0,07-0,41)
STR	Links	0,57 *E7 (0,14-0,82)	0,74 (0-0,8)	0,74 *E8 (0,41-0,82)	0,72 (0-0,8)
	Rechts	0,72 (0-0,81)	0,7 (0,15-0,77)	0,62 (0,11-0,79)	0,68 (0,14-0,81)
WOB	Links	0,39 *E7 (0,09-0,55)	0,51 *E7 (0-0,54)	0,47 *E7, E8 (0,4-0,54)	0,48 *E7 (0-0,51)
	Rechts	0,47 (0-0,53)	0,5 (0,09-0,53)	0,48 (0,1-0,53)	0,48 (0,08-0,55)
ALH (Hz)	Links	2,68 (0,35-3,56)	3,09 (0-3,18)	3,08 (1,45-3,7)	3,13 (0-3,75)
	Rechts	2,66 (0-3,43)	3,26 (0,4-4,97)	3,12 (0,57 -3,74)	3,02 (0,36-4,25)

<b>Nebenhodenabschnitt E8</b>		<b>SRS</b>	<b>SRL</b>	<b>ICS</b>	<b>ICL</b>
Gesamt (%)	Links	2,27 (0,55-5,45)	2,70 (0,89-9,57)	2,41 (0-11,14)	3,99 (1,29 -8,41)
	Rechts	4,01 (0,37-17,35)	5,66 (0,83-23,71)	5,27 (1,59-30,42)	6,84 (0,78-31,41)
V (%)	Links	1,29 (0-3,45)	1,59 (0,29-8,16)	1,36 (0-10,21)	6,61 (0,27-6,91)
	Rechts	2,94 (0-16,65)	3,90 (0,82-20,04)	4,59 (0,45-29,36)	12,41 (0,67-28,81)
VSL (µm/s)	Links	24,3 (0-60,31)	59,61 (6,7-77,58)	43,99 (0-71,01)	45 (10,79-66,44)
	Rechts	41,77 (0-82,42)	63,52 (9,96-82,62)	51,78 (11,87-82,47)	54,42 (16,52-80,49)
VCL (µm/s)	Links	54,95 (0-162,78)	139,85 (20,73-168,35)	128,17 (0-180,59)	120,05 (33,81-169,71)
	Rechts	127,66 (0-170)	148,1 (17,23-192,59)	140,03 (32,78-167,5)	149 (32,65-204,93)
VAP (µm/s)	Links	29,63 (0-79,06)	73,38 (9,93-91,26)	63,56 (0-86,53)	60,85 (14,11-78,69)
	Rechts	64,74 (0-93,26)	80,17 (11,34-99,43)	70,56 (16,63-94,81)	70,52 (18,91-108,4)
LIN	Links	0,17 (0-0,4)	0,38 (0-0,46)	0,29 *E9 (0-0,41)	0,35 (0,05-0,39)
	Rechts	0,29 (0-0,48)	0,41 (0,1-0,46)	0,35 (0,12-0,51)	0,36 (0,15-0,46)
STR	Links	0,33 (0-0,77)	0,74 (0,11-0,84)	0,63 *E9 (0-0,75)	0,69 (0,13-0,79)
	Rechts	0,60 (0-0,87)	0,78 (0,15-0,88)	0,71 (0,24-0,87)	0,76 (0,28-0,83)
WOB	Links	0,22 (0-0,56)	0,46 (0,08-0,57)	0,42 *E9 (0-0,54)	0,42 (0,68-0,5)
	Rechts	0,44 (0-0,55)	0,50 (0,11-0,54)	0,48 (0,17-0,59)	0,5 (0,19-0,56)
ALH (Hz)	Links	1,16 (0-3,23)	3,16 (0,46-3,94)	2,89 (0-3,89)	2,92 (0,62-3,93)
	Rechts	2,85 (0-3,59)	3,23 (0,28-4,87)	32,99 (0,88-3,88)	3,37 (0,85-4,63)

<b>Nebenhodenabschnitt E7</b>		<b>SRS</b>	<b>SRL</b>	<b>ICS</b>	<b>ICL</b>
Gesamt (%)	Links	1,50 (0-6,25)	2,74 (0-9,67)	2,30 (0-18,07)	3,20 (0,83-11,6)
	Rechts	4,1 (0-15,08)	11,71 (0-28,63)	8,81 (0,63-28,48)	12,03 (2,15-35,5)
V (%)	Links	1,50 (0-6,25)	2,09 (0-8,54)	1,41 (0-15,28)	2,01 (0-8,88)
	Rechts	4,1 (0-15,08)	10,74 (0-26,66)	4,28 (0-28,04)	10,47 (1,51-33,31)
VSL (µm/s)	Links	4,75 (0-60,37)	29,85 (0-66,9)	34,48 (0-57,31)	57,22 (0-72,37)
	Rechts	41,85 (0-69,39)	60,78 (0-73,7)	55,17 (0-81,13)	60,64 (15,06-73,22)
VCL (µm/s)	Links	20,96 (0-149,39)	81,10 (0-188,28)	109,11 (0-171,6)	83,84 (0-169,23)
	Rechts	118,1 (0-150,58)	151,76 (0-198,52)	145,62 (0-212)	80,95 (17,9-100,55)
VAP (µm/s)	Links	8,24 *E9 (0-83,56)	71,13 (0-104,98)	52,48 (0-71,68)	45,01 (0-84,5)
	Rechts	59,17 (0-80,8)	80,61 (0-99,2)	71,13 (0-104,98)	80,95 (17,9-100,55)
LIN	Links	0,04 *E9 (0-0,4)	0,22 *E9 (0-0,4)	0,19 *E9 (0-0,44)	0,23 (0-0,41)
	Rechts	0,30 (0-0,46)	0,38 (0-0,47)	0,31 (0-0,51)	0,38 (0,11-0,48)
STR	Links	0,09 *E9 (0-0,76)	0,44 (0-0,84)	0,40 (0-0,82)	0,45 (0-0,83)
	Rechts	0,55 (0-0,85)	0,72 (0-0,85)	0,71 (0-1,62)	0,75 (0,25-0,84)
WOB	Links	0,07 *E9 (0-0,55)	0,28 *E9 (0-0,49)	0,28 *E9 (0-0,53)	0,39 *E9 (0-0,49)
	Rechts	0,36 (0-0,55)	0,51 (0-0,57)	0,44 (0-0,58)	0,5 (0,15-0,59)
ALH (Hz)	Links	0,50 (0-3,28)	1,69 (0-4,2)	2,44 (0-3,57)	2,05 (0-4,04)
	Rechts	2,52 (0-3,19)	3,20 (0-4,06)	3,22 (0-6,11)	3,23 (0,8-4,38)

		Zeitpunkt H24			
Nebenhodenabschnitt E9		SRS	SRL	ICS	ICL
Gesamt (%)	Links	2,04 (0,49-3,53)	3,24 *E7 (0,5-6,03)	3,58 (1,1-14,17)	6,79 (0,82 -12,18)
	Rechts	2,95 (0,67-5,17)	3,92 (0,81-12,11)	3,46 (0,78-14,15)	4,30 (0,89-13,52)
V (%)	Links	1,16 (0,07-2,21)	2,02 (0,11-3,22)	2,55 (0,29-11,25)	4,05 (0,22-10,08)
	Rechts	1,61 (0,22-3,79)	2,24 *E8 (0,55-10,64)	1,95 (0,14-7,13)	3,12 (0,12-9,46)
VSL (µm/s)	Links	34,27 *E7 (2,62-45,2)	37,77 (2,12-55,58)	36,98 (5,36-44,23)	34,56 (4,72-62,87)
	Rechts	26,52 (10,12-40,57)	38,11 (25,63-55,5)	30,97 (7,5-59,37)	37,34 (6,4-51,66)
VCL (µm/s)	Links	117,26 *E7 (10,89-139,66)	126,96 (9,28-169,43)	117,72 (19,16-146,76)	120,21 (20,13-155,93)
	Rechts	90,04 (54,72-121,76)	122,38 (82,88-160,69)	113,92 (17,76-155,47)	114,18 (25,39-165,84)
VAP (µm/s)	Links	57,35 *E7 (4,48-68,01)	59,36 (5,03-82,49)	52,39 (7,78-63,04)	51,99 (13,2-73,58)
	Rechts	42,84 (30,95-59,26)	56,32 (43,34-70,05)	51,09 (11,63-74,28)	59,06 (14,37-89,88)
LIN	Links	0,28 *E7 (0,04-0,46)	0,27 (0,04-0,39)	0,32 (0,05-0,45)	0,29 (0,13-0,45)
	Rechts	0,23 (0,05-0,35)	0,32 (0,29-0,35)	0,26 (0,14-0,38)	0,29 (0,04-0,39)
STR	Links	0,59 *E7 (0,1-0,81)	0,66 (0,07-0,81)	0,68 *E7 (0,11-0,76)	0,67 (0,17-0,86)
	Rechts	0,46 (0,14-0,73)	0,66 *E7 (0,6-0,79)	0,60 (0,21-0,79)	0,61 (0,07-0,77)
WOB	Links	0,47 *E7 (0,07-0,57)	0,42 (0,09-0,52)	0,44 (0,07-0,64)	0,44 (0,24-0,55)
	Rechts	0,39 (0,16-0,55)	0,47 (0,43-0,53)	0,41 *E8 (0,21-0,47)	0,48 (0,09-0,54)
ALH (Hz)	Links	2,87 *E7 (0,25-3,38)	3,03 (0,25-4,4)	2,75 (0,46-3,33)	2,97 (0,7-3,49)
	Rechts	2,07 (1,027-3,11)	3,10 (2,28-3,76)	2,85 (0,84 -3,59)	2,84 (0,5-3,93)

<b>Nebenhodenabschnitt E8</b>		<b>SRS</b>	<b>SRL</b>	<b>ICS</b>	<b>ICL</b>
Gesamt (%)	Links	2,15 (0,37-5,42)	4,53 (0,92-16,44)	2,49 (1,38-18,46)	4,47 (0,8-12,76)
	Rechts	3,28 (0,38-15,68)	7,44 (1,7-32,73)	8,44 (1,54-24,07)	6,98 (0-32,78)
V (%)	Links	1,09 (0-4,5)	2,18 (0,35-16,44)	1,76 (0,74-17,58)	3,52 (0-11)
	Rechts	2,15 (0,18-12,23)	5,79 *E9 (1,69-27,25)	5,55 (0,78-21,3)	5,17 (0-30,84)
VSL (µm/s)	Links	28,39 (0-59,25)	44,59 (11,98-63,13)	38,16 (14,41-66,14)	44,68 (0-53,28)
	Rechts	31,81 (4,23-48,04)	47,77 (22,81-78,9)	41,83 (13,67-61,86)	46,97 (0-62,22)
VCL (µm/s)	Links	87,63 (0-151,84)	132,11 (26,1-162,51)	122,31 (45,74-168,88)	141,66 (0-208,45)
	Rechts	99,81 (18,54-135,87)	133,69 (64,34-215,91)	128,61 (45,85-204,56)	142,97 (0-219,11)
VAP (µm/s)	Links	39,11 (0-74,07)	62,9 (13,58-81,9)	58,19 (19,96-92,71)	67,68 (0-98,05)
	Rechts	50,05 (11,24-73,83)	66,32 (30,9-113,29)	66,50 (23,67-101,55)	66,74 (0-110,15)
LIN	Links	0,24 *E7 (0-0,39)	0,32 (0,08-0,4)	0,22 (0,1-0,41)	0,3 (0-0,37)
	Rechts	0,26 (0,04-0,36)	0,34 (0,17-0,43)	0,31 (0,14-0,39)	0,32 (0-0,37)
STR	Links	0,43 *E7 (0-0,81)	0,64 (0,16-0,82)	0,59 (0,23-0,72)	0,0,6 (0-0,75)
	Rechts	0,48 (0,06-0,64)	0,66 (0,35-0,78)	0,61 (0,28-0,81)	0,67 (0-0,76)
WOB	Links	0,34 (0-0,53)	0,47 (0,09-0,55)	0,44 (0,14-0,56)	0,46 (0-0,5)
	Rechts	0,41 (0,08-0,6)	0,51 (0,24-0,55)	0,48 *E9 (0,27-0,53)	0,49 (0-0,6)
ALH (Hz)	Links	1,96 (0-3,45)	2,96 (0,56-3,66)	3,09 *E7 (1,05-3,94)	3,44 (0-4,59)
	Rechts	2,21 (0,47-3,19)	3,05 (1,35-4,67)	3,05 (1,21-4,3)	3,38 (0-4,8)

Nebenhodenabschnitt E7		SRS	SRL	ICS	ICL
Gesamt (%)	Links	1,70 (0-9,42)	6,23 *E9 (1,39-18,55)	4,01 (0,59-17,68)	7,60 (0-18,63)
	Rechts	8,28 (1,19-13,85)	9,54 (1,13-34,12)	4,73 (1,84-30,34)	8,88 (0,79-35,7)
V (%)	Links	0,22 (0-3,59)	5,24 *E9 (0,97-13,07)	1,66 (0,32-14,26)	6,34 (0-16,78)
	Rechts	4,02 (0,3-11,68)	7,13 (0,76-31,55)	3,71 (0,27-28,55)	6,99 (0,55-32,22)
VSL (µm/s)	Links	4,91 *E9 (0-34,29)	36,70 (7,71-59,84)	26,64 (8,35-49,05)	38,04 (0-64,81)
	Rechts	35,90 (3,2-54,91)	37,35 (10,27-57,24)	38,54 (6,67-54,58)	49,71 (14,94-63,35)
VCL (µm/s)	Links	14,26 *E9 (0-141,35)	125,60 (23,41-149,69)	80,86 (21,62-150,67)	119,87 (0-225,69)
	Rechts	113,96 (15,36-192,32)	125,83 (23,85-176,41)	121,27 (21,48-213,45)	142,50 (43,06-217,69)
VAP (µm/s)	Links	6,94 *E9 (0-70,21)	62,97 (17,31-77,54)	42,38 (12,63-69,62)	57,60 (0-112,72)
	Rechts	65,54 (7,38-96,07)	65,64 (12,31-87,34)	60,95 (9,09-112,89)	71,62 (22,17-108,59)
LIN	Links	0,06 *E8, E9 (0-0,24)	0,29 (0,05-0,41)	0,21 (0,06-0,37)	0,24 (0-0,44)
	Rechts	0,27 (0,03-0,42)	0,3 (0,07-0,39)	0,29 (0,05-0,35)	0,31 (0,12-0,42)
STR	Links	0,12 *E8, E9 (0-0,49)	0,60 (0,07-0,79)	0,41 *E9 (0,11-0,7)	0,53 (0-0,82)
	Rechts	0,49 (0,07-0,8)	0,58 *E9 (0,14-0,79)	0,55 (0,12-0,69)	0,62 (0,23-0,81)
WOB	Links	0,08 *E9 (0-0,51)	0,47 (0,12-0,56)	0,35 (0,1-0,57)	0,42 (0-0,53)
	Rechts	0,48 (0,07-0,66)	0,48 (0,09-0,54)	0,48 (0,07-0,61)	0,45 (0,17-0,53)
ALH (Hz)	Links	0,33 *E9 (0-3,35)	2,88 (0,4-3,39)	1,75 *E8 (0,41-3,28)	2,69 (0-5,17)
	Rechts	2,56 (0,4-4,47)	2,84 (0,5-3,98)	2,76 (0,56-4,48)	3,27 (1,11-4,84)

		Zeitpunkt H48			
Nebenhodenabschnitt E9		SRS	SRL	ICS	ICL
Gesamt (%)	Links	3,31 (0,31-6,29)	4,84 (0,51-6,68)	6,68 (0,39-21,18)	4,22 (0,19 -15,28)
	Rechts	3,95 (0,74-7,32)	5,82 *E8 (1,83-8,92)	6,49 (0,98-13,27)	4,79 (1,7-16,49)
V (%)	Links	1,47 (0-3,6)	2,682,68 (0,04-4,05)	2,48 (0,12-14,61)	1,97 (0-10,26)
	Rechts	2,04 (0,07-4,19)	2,8 *E8 (0,27-5,85)	3,49 *E8 (0-6,97)	3,49 *E7, E8 (0-6,97)
VSL (µm/s)	Links	27,95 (0-40,99)	27,43 *E8 (2,92-34,42)	31,32 (9,92-39,24)	30,67 (0-42,44)
	Rechts	32,06 (3,4-44,16)	31,36 (7,91-41,13)	38,31 *E8 (0-46,14)	29,25 *E8 (0-42,27)
VCL (µm/s)	Links	102,8 (0-130,34)	105,85 *E8 (6,18-130,43)	116,68 (17,17-140,61)	109,76 (0-141,2)
	Rechts	99,06 (11,2-132,09)	107,06 (16,88-138,66)	106,87 *E7, E8 (0-141,24)	111,35 (0-141,45)
VAP (µm/s)	Links	46,41 (0-59,9)	50,66 *E8 (5,37-60,26)	52,26 (13,29-69,5)	52,73 (0-59,44)
	Rechts	56,04 (7,35-68,17)	52,69 (10,87-78,32)	61,74 *E7, E8 (0-65,36)	52,37 *E8 (0-84,64)
LIN	Links	0,24 (0-0,35)	0,25 (0,04-0,32)	0,28 (0,18-0,3)	0,26 (0-0,33)
	Rechts	0,27 (0,05-0,33)	0,28 (0,16-0,32)	0,26 (0-0,33)	0,29 (0-0,34)
STR	Links	0,68 (0-0,71)	0,54 (0,06-0,63)	0,60 *E7 (0,24-0,69)	0,53 (0-0,71)
	Rechts	0,54 (0,07-0,65)	0,57 (0,24-0,7)	0,55 (0-0,69)	0,51 (0-0,76)
WOB	Links	0,42 (0-0,55)	0,44 (0,12-0,54)	0,41 (0,25-0,52)	0,45 (0-0,52)
	Rechts	0,47 (0,08-0,56)	0,46 (0,22-0,64)	0,44 (0-0,54)	0,46 (0-0,62)
ALH (Hz)	Links	2,58 (0-3,38)	2,67 *E8 (0,25-3,19)	2,84 (0,87-3,3)	2,78 (0-3,43)
	Rechts	2,37 (0,32-3,04)	2,81 (0,57-3,56)	2,71 (0 -3,46)	2,67 (0-3,45)

<b>Nebenhodenabschnitt E8</b>		<b>SRS</b>	<b>SRL</b>	<b>ICS</b>	<b>ICL</b>
Gesamt (%)	Links	2,05 (0,3-9,3)	4,12 (1,37-10,21)	2,70 (0-15,86)	3,80 (1,23-18,66)
	Rechts	3,27 (0,14-13,3)	9,59 *E9 (2,9-31,13)	8,63 (3,13-22,84)	8,11 (1,51-31,56)
V (%)	Links	1,41 (0,3-8,3)	2,51 (0,72-7,98)	1,70 (0-15,26)	2,62 (0,7-10,45)
	Rechts	2,62 (0-8,63)	6,95 *E9 (0,73-24,13)	7,07 *E9 (1,59-18,56)	6,63 *E9 (1,31-26,84)
VSL (µm/s)	Links	23,48 (8,05-35,78)	37,20 *E9 (23,95-60,81)	27,42 (0-48,1)	34,73 (17,87-43,82)
	Rechts	32,29 (0-49,38)	38,12 (11,28-57,62)	44,33 *E9 (23,31-51,65)	40,34 *E9 (20,59-64,19)
VCL (µm/s)	Links	84,34 (19,39-160,05)	132,99 *E9 (93,13-166)	93,08 (0-152,59)	106,62 (69,17-179,97)
	Rechts	108,46 (0-168,67)	126,19 (39,46-176,69)	132,04 *E9 (77,18-177,47)	127,42 (74,57-169,68)
VAP (µm/s)	Links	41,6 (9,35-92,01)	68,24 *E7, E9 (50,21-94,27)	46,24 (0-71,25)	57,87 (33,99-104,62)
	Rechts	56,05 (0-92,78)	63,39 (21,27-96,37)	64,99 *E9 (38,25-102,77)	67,79 *E9 (46,42-94,54)
LIN	Links	0,19 (0,07-0,25)	0,29 (0,22-0,37)	0,26 (0-0,34)	0,28 (0,12-0,4)
	Rechts	0,27 (0-0,35)	0,29 (0,09-0,4)	0,31 (0,2-0,36)	0,3 (0,15-0,38)
STR	Links	0,37 (0,14-0,58)	0,60 (0,33-0,7)	0,55 (0-0,71)	0,52 (0,26-0,79)
	Rechts	0,51 (0-0,71)	0,61 (0,18-0,77)	0,6 (0,37-0,76)	0,58 (0,23-0,77)
WOB	Links	0,34 (0-0,53)	0,50 (0,44-0,68)	0,45 (0-0,5)	0,52 (0,24-0,59)
	Rechts	0,46 (0-0,61)	0,51 (0,18-0,54)	0,47 (0,33-0,58)	0,49 (0,31-0,59)
ALH (Hz)	Links	1,89 (0,4-3,01)	3,06 *E7, E9 (2,26-3,51)	2,50 (0-2,5)	2,68 (1,75-3,98)
	Rechts	2,53 (0-3,85)	3,07 (0,88-4,08)	2,95 (1,89-4,05)	3,03 (1,86-4,37)

Nebenhodenabschnitt E7		SRS	SRL	ICS	ICL
Gesamt (%)	Links	3,08 (0,12-11,57)	3,56 (2,03-14,59)	4,27 (0-15,33)	5,18 (0-14,73)
	Rechts	5,01 (0,56-17,36)	3,56 (2,03-14,59)	11,55 (2,39-30,65)	9,2 (2,23-34,53)
V (%)	Links	1,61 (0-9,57)	3,40 (1,21-13,25)	2,30 (0-11,98)	5,78 (0-14,73)
	Rechts	3,46 (0-14,56)	8,31 (1,52-35,85)	9,94 (1,36-27,23)	6,81 *E9 (2,23-34,53)
VSL (µm/s)	Links	18,31 (0-43,28)	29,36 (17,09-52,59)	28,44 (0-37,93)	34,24 (0-47,73)
	Rechts	18,31 (0-43,28)	35,20 (6,63-44,82)	40,28 (14,42-57,42)	37 (14,41-52,05)
VCL (µm/s)	Links	14,26 (0-141,35)	95,28 (50,11-142,52)	94,62 (0-144,05)	121,67 (0-167,36)
	Rechts	113,96 (15,36-192,32)	119,56 (13-199,04)	138,67 *E9 (43,65-204,46)	121,31 (76,64-217,16)
VAP (µm/s)	Links	79,47 (0-151,79)	52,62 *E8 (26,58-70,08)	54,4 (0-71,35)	53,09 (0-79,26)
	Rechts	120,99 (0-146,16)	58,34 (7,67-105,42)	70,11 *E9 (18,16-108,55)	60,84 (33,66-112,24)
LIN	Links	0,17 (0-0,33)	0,24 (0,17-0,43)	0,22 (0-0,32)	0,27 (0-0,44)
	Rechts	0,26 (0-0,34)	0,24 (0,09-0,36)	0,29 (0,11-0,36)	0,25 (0,13-0,35)
STR	Links	0,3 (0-0,67)	0,45 (0,32-0,76)	0,45 *E9 (0-0,69)	0,63 (0-0,76)
	Rechts	0,55 (0-0,72)	0,47 (0,14-0,76)	0,61 (0,26-0,73)	0,5 (0,27-0,72)
WOB	Links	0,37 (0-0,53)	0,40 (0,29-0,56)	0,43 (0-0,6)	0,44 (0-0,58)
	Rechts	0,44 (0-0,57)	0,44 (0,1-0,6)	0,47 (0,24-0,57)	0,45 (0,17-0,53)
ALH (Hz)	Links	1,81 (0-3,3)	2,21 *E8 (1,27-3,52)	2,11 (0-3,26)	2,85 (0-4,25)
	Rechts	2,65 (0-3,85)	2,81 (0,25-4,56)	2,01 (0-3,26)	2,99 (1,74-4,45)

\*E7, E8 und/oder E9 signifikanter Unterschied zwischen den Spermien der genannten Abschnitte.

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Einteilung des Nebenhodens in Nebenhodenkopf, -körper und -schwanz nach NICKEL et al. (1987) und in die Segmente VE bis E9 nach Fouchécourt et al. (2000) .....	41
<b>Abb. 2:</b> Einteilung des Nebenhodenschwanzes in E9, E8, E7.....	42
<b>Abb. 3:</b> Volumen der Spülflüssigkeit aus den Nebenhodenschwanzabschnitten E7 – E9 im Seitenvergleich.....	53
<b>Abb. 4:</b> Spermienkonzentration der Nebenhodenschwanzabschnitte im Vergleich zwischen linkem und rechtem Nebenhoden, bestimmt mit dem NucleoCounter® .....	57
<b>Abb. 5:</b> Spermienkonzentration der Nebenhodenschwanzabschnitte im Vergleich zwischen linkem und rechtem Nebenhoden, bestimmt mit der Zählkammer .....	58
<b>Abb. 6:</b> Spermiengesamtzahl der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte im Vergleich zwischen linkem und rechtem Nebenhoden, bestimmt mit dem NucleoCounter® .....	59
<b>Abb. 7:</b> Spermiengesamtzahl der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte im Vergleich zwischen linkem und rechtem Nebenhoden, bestimmt mit der Zählkammer .....	60
<b>Abb. 8:</b> Vergleich der Spermienkonzentration der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte des linken Nebenhodens, bestimmt mit der Zählkammer und dem NucleoCounter®.....	61
<b>Abb. 9:</b> Vergleich der Spermienkonzentration der einzelnen Nebenhodenschwanzabschnitte des rechten Nebenhodens, bestimmt mit der Zählkammer nach und dem NucleoCounter® .....	61
<b>Abb. 10:</b> Subjektiv bestimmte Motilität der, mit EquiPro™ verdünnten, Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 .....	65
<b>Abb. 11:</b> Mittels CASA bestimmte Motilität der, mit EquiPro™ verdünnten, Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 .....	66
<b>Abb. 12:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP der Spermien von E7 – E9 des linken Nebenhodens nach der Verdünnung mit EquiPro™ .....	68
<b>Abb. 13:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP der Spermien von E7 – E9 des rechten Nebenhodens nach der Verdünnung mit EquiPro™ .....	68
<b>Abb. 14:</b> LIN, STR und WOB der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens nach Verdünnung EquiPro™ .....	69
<b>Abb. 15:</b> LIN, STR und WOB der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens nach Verdünnung mit EquiPro™ .....	69
<b>Abb. 16:</b> ALH der Spermien der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich nach Verdünnung mit EquiPro™ .....	70
<b>Abb. 17:</b> Gesamtbeweglichkeit (%) der Spermien des linken und rechten Abschnitts E9 direkt, nach 24, 48, 72 und 96 Stunden. ....	71
<b>Abb. 18:</b> Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit (%) der Spermien des Abschnitts E9 nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden .....	71

<b>Abb. 19:</b> Gesamtbeweglichkeit (%) der Spermien des linken und rechten Abschnitts E8 direkt nach Gewinnung, nach 24, 48, 72 und 96 Stunden.....	72
<b>Abb. 20:</b> Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit (%) der Spermien des Abschnitts E8 nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden .....	72
<b>Abb. 21:</b> Gesamtbeweglichkeit (%) der Spermien des linken und rechten Abschnitts E7 direkt, nach 24, 48, 72 und 96 Stunden .....	73
<b>Abb. 22:</b> Vorwärts- und Ortsbeweglichkeit (%) der Spermien des Abschnitts E7 nach 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden .....	73
<b>Abb. 23:</b> Mittels CASA bestimmte Motilität der, mit Gent-Verdünner verdünnten, Spermien der Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9 .....	77
<b>Abb. 24:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP der Spermien von E7 – E9 des linken Nebenhodens nach Verdünnung mit Gent-Verdünner .....	78
<b>Abb. 25:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL, VAP der Spermien von E7 – E9 des rechten Nebenhodens nach Verdünnung mit Gent-Verdünner .....	79
<b>Abb. 26:</b> LIN, STR und WOB der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens nach Verdünnung mit Gent-Verdünner.....	79
<b>Abb. 27:</b> LIN, STR und WOB der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens nach Verdünnung mit Gent-Verdünner.....	80
<b>Abb. 28:</b> ALH der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich nach Verdünnung mit Gent-Verdünner.....	80
<b>Abb. 29:</b> Vergleich der Motilität, subjektiv und objektiv bestimmt, der mit EquiPro™ verdünnten Spermien der Abschnitte E7 – E9 .....	82
<b>Abb. 30:</b> Vergleich der Vorwärtsbeweglichkeit, bestimmt mittels CASA, der Spermien der Abschnitte E7 – E9 je nach Verdünnertyp .....	83
<b>Abb. 31:</b> Vergleich der Vorwärtsbeweglichkeit, subjektiv geschätzt, der Spermien der Abschnitte E7 – E9 je nach Verdünnertyp.....	83
<b>Abb. 32:</b> Motilität (%) der Spermien der linken und rechten Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9, tiefgefroren mit Einfrierprogramm SRS, nach dem Auftauen.....	85
<b>Abb. 33:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit SRS tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des linken Nebenhodens.....	87
<b>Abb. 34:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit SRS tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des rechten Nebenhodens .....	88
<b>Abb. 35:</b> LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRS, der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens .....	88
<b>Abb. 36:</b> LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRS, der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens .....	89

<b>Abb. 37:</b> ALH der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRS, der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich .....	89
<b>Abb. 38:</b> Motilität (%) der Spermien der linken und rechten Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9, tiefgefroren mit Einfrierprogramm SRL, nach dem Auftauen .....	90
<b>Abb. 39:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit SRL tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des linken Nebenhodens.....	92
<b>Abb. 40:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit SRL tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des rechten Nebenhodens .....	92
<b>Abb. 41:</b> LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRL, der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens .....	93
<b>Abb. 42:</b> LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRL, der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens .....	93
<b>Abb. 43:</b> ALH der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit SRL, der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich .....	94
<b>Abb. 44:</b> Motilität (%) der Spermien der linken und rechten Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9, tiefgefroren mit Einfrierprogramm ICS, nach dem Auftauen .....	95
<b>Abb. 45:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit ICS tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des linken Nebenhodens.....	97
<b>Abb. 46:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit ICS tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des rechten Nebenhodens .....	98
<b>Abb. 47:</b> LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICS, der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens .....	98
<b>Abb. 48:</b> LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICS, der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens .....	99
<b>Abb. 49:</b> ALH der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICS, der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich .....	99
<b>Abb. 50:</b> Motilität (%) der Spermien der linken und rechten Nebenhodenschwanzabschnitte E7 – E9, tiefgefroren mit Einfrierprogramm ICL, nach dem Auftauen.....	101
<b>Abb. 51:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit ICL tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des linken Nebenhodens.....	102
<b>Abb. 52:</b> Geschwindigkeitsparameter VSL, VCL und VAP, der mit ICL tiefgefrorenen, Nebenhodenschwanzspermien der Abschnitte E7 – E8 des rechten Nebenhodens .....	103
<b>Abb. 53:</b> LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICL, der Abschnitte E7 – E9 des linken Nebenhodens .....	103
<b>Abb. 54:</b> LIN, STR und WOB der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICL, der Abschnitte E7 – E9 des rechten Nebenhodens .....	104

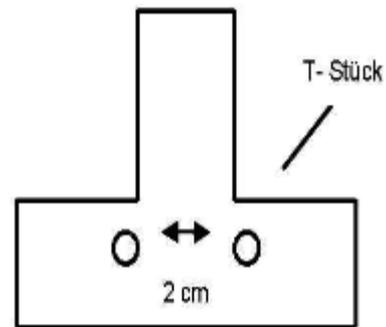
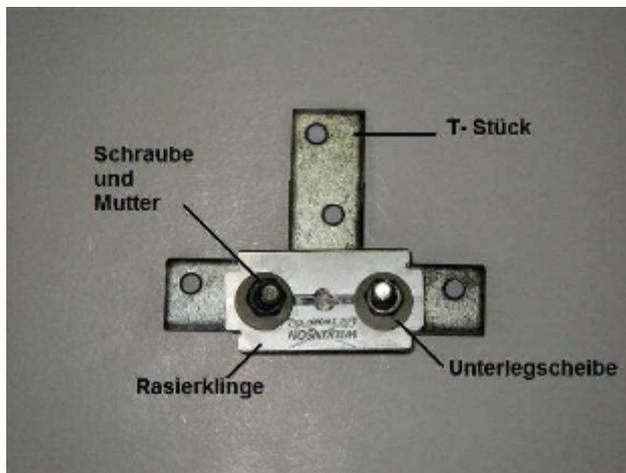
<b>Abb. 55:</b> ALH der aufgetauten Spermien, tiefgefroren mit ICL, der Nebenhodenabschnitte E7 – E9 im Seitenvergleich.....	104
<b>Abb. 56:</b> Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9, nach Tieffrieren mit SRS, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, bei der Lagerung bei +4 °C verdünnt im Verhältnis 1+2 zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen.....	106
<b>Abb. 57:</b> Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9, nach Tieffrieren mit SRL, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, bei der Lagerung bei +4 °C verdünnt im Verhältnis 1+2 zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen.....	106
<b>Abb. 58:</b> Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9, nach Tieffrieren mit ICS, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, bei der Lagerung bei +4 °C verdünnt im Verhältnis 1+2 zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen.....	107
<b>Abb. 59:</b> Haltbarkeit der Nebenhodenschwanzspermien von E7 – E9, nach Tieffrieren mit ICL, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, bei der Lagerung bei +4 °C verdünnt im Verhältnis 1+2 zum Zeitpunkt 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen.....	107
<b>Abb. 60:</b> Auswirkung des Einfrierprogramms auf die Haltbarkeit der Spermien von E9, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, nach 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen.....	110
<b>Abb. 61:</b> Auswirkung des Einfrierprogramms auf die Haltbarkeit der Spermien von E8, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, nach 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen.....	112
<b>Abb. 62:</b> Auswirkung des Einfrierprogramms auf die Haltbarkeit der Spermien von E7, gemessen anhand der Gesamtbeweglichkeit, nach 0, 1, 2, 24 und 48 Stunden nach dem Auftauen.....	113

## 8.4 Bauanleitung Slicing-Gerät

Für den Bau des Slicing-Geräts werden folgende Materialien verwendet:

- Rasierklingen (Classic, Wilkinson Sword GmbH, Solingen, Deutschland)
- Schrauben mit Schraubenmuttern M5 x 30
- Unterlegscheiben aus Polyamid 6,4 (Dresselhaus)
- T-Stück

In das T-Stück aus Stahl werden zwei zusätzliche Löcher im Abstand von 2 cm gebohrt. Durch die Löcher werden die Schrauben eingedreht. Danach werden im Wechsel Unterlegscheiben und fünf Rasierklingen auf die Schrauben gefügt. Zum Schluss wird auf beide Schrauben je eine Mutter gedreht und das Konstrukt befestigt. Nach dem Aufbau wird das Slicing-Gerät eingeschweißt und sterilisiert. Für jeden Abschnitt wird ein neues, steriles Slicing-Gerät verwendet.



**Abb. 1:** Slicing-Gerät

## Publikationen

Neuhauser S., Rheinfeld S., Handler J. (2014).

Comparison of the effects of four freezing methods on motility characteristics, morphology, and viability of postthaw stallion epididymal sperm.

Journal of Equine Veterinary Science 34, 882-888

Neuhauser S., Rheinfeld S., Handler J. (2013).

Motility of fresh and frozen- thawed stallion sperm from three segments of the epididymal cauda and the effect of post-thaw seminal plasma addition on motility.

Journal of Equine Veterinary Science 33, 942-949

Neuhauser S., Rheinfeld S., Handler J. (2012).

Stallion sperm parameters from different segments of the cauda epididymidis.

16th ESDAR Conference 2012.

Dublin, 29. August-01. September 2012

Reproduction in Domestic Animals 47, 100

Neuhauser S., Rheinfeld S., Handler J. (2012).

Evaluation of frozen-thawed stallion epididymal sperm with and without addition of seminal plasma.

6th International Symposium on Stallion Reproduction.

Wien, 05.-09. September 2012

Journal of Equine Veterinary Science 32, 508

## Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Johannes Handler für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas und für die Betreuung während der Promotion danken. Den Mitarbeitern des Reproteams, allen voran Stefanie, gilt ebenfalls mein Dank für die Mithilfe bei der Durchführung meiner Versuche.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mitdotorandin und Freundin Jana für ihre Unterstützung und den stetigen Beistand, während der Durchführung der Versuche und dem Warten auf Kastrationen. Wie schön, dass wir Freude und Leid immer miteinander teilen konnten! Außerdem danke ich Yvonne für Ihre Hilfe und für ihre unerschütterliche Fröhlichkeit!

Ich danke meinen liebsten Internkollegen Stefan, Caro, Natalia und Maïke, dass sie mir durch ihre Flexibilität und Hilfsbereitschaft ermöglicht haben während des Internships meine zeitraubenden Versuche durchzuführen. Stefan danke ich besonders für seinen Witz und die Gabe vermeintliche Wichtigkeiten als Nichtigkeiten zu entlarven. Ich werde meine Internzeit niemals vergessen und möchte sie nicht missen.

Ich danke dem gesamten Tierärzteteam der Klinik für Pferde für die tolle Zusammenarbeit und die lehrreichen Intern- und Assistentenjahre. Wie schön, dass ich, dank Euch, „fast“ jeden Tag gerne zur Arbeit gehe. Prof. Lischer, Christoph, Roberto, Matthias, Wiebke, Dana, Bettina, Judith, Antonia danke ich, weil ihr mir so viel Wissen, Können und Freude an der Arbeit vermittelt habt!!

Wiebke, Ina, Dana, Johanna und Matthias danke ich insbesondere dafür, dass ihr die tollsten Kollegen der Welt seid! Dana und Wiebke ihr habt die besten Doktorarbeitstipps und Engelsgeduld mit frustrierten Büronachbarn.

Meinen Freunden danke ich für ihren Glauben an mich, die Ablenkung, Motivation und den ein oder anderen Hinweis darauf, dass Nebenhodenschwänze zwar ein lustiges Partygespräch abgeben, aber niemals das einzige sind worüber es sich zu reden lohnt! Jule danke ich für zahlreiche Motivationssitzungen im Bettenhaus.

Maleenchen und Nils danke ich dafür, dass ihr immer für mich da seid, euch meine Tierarztgeschichten trotz Ekelfaktor beim Essen anhört und ihr den Pferdewahn eurer großen Schwester zumeist kommentarlos hinnehmt.

Mein größter Dank soll aber meinen Eltern gewidmet sein, die es mir ermöglicht haben zu studieren und dann auch noch zu promovieren. Ich weiß, dass auch ihr zwischendurch an dem Projekt „Dr. Svenja“ eure Zweifel hattet, aber gut dass ihr mir beigebracht habt niemals aufzugeben und Geduld zu haben. Euch verdanke ich, dass ich meinen Kindheitstraum verwirklichen konnte und heute den schönsten Beruf der Welt habe! Eure Unterstützung und Liebe bedeutet mir alles.

## **Erklärung**

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

Berlin, den 03. Dezember 2015

Svenja Rheinfeld