

Aus der Tierklinik für Fortpflanzung und Geburtshilfe  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Einfluß eines erhöhten Anteils Seminalplasma in konserviertem Ebersperma  
auf die Spermienmotilität in vitro sowie auf die Befruchtungsfähigkeit in  
vivo unter besonderer Berücksichtigung der Eberspezifität**

**Inaugural-Dissertation**

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

vorgelegt von  
Anke Ottensmeier  
Tierärztin aus Stralsund

Berlin 1998

Journal-Nr. 2206

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. K. Hartung

Erster Gutachter: Univ.- Prof. Dr. W. Busch

Zweiter Gutachter: Univ.- Prof. Dr. K. F. Weitze

Tag der Promotion: 06. 11. 1998

# Inhaltsverzeichnis

<b>0 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Das Sperma des Ebers</b>	<b>7</b>
2.1.1 Die Spermien	8
2.1.2 Das Seminalplasma	10
2.1.2.1 Chemische Zusammensetzung	11
2.1.2.2 Einfluß des Seminalplasmas auf den Spermientransport	15
2.1.2.3 Einfluß des Seminalplasmas auf den Ovulationsvorgang	20
2.1.2.4 Einfluß des Seminalplasmas auf die Spermien	24
2.1.2.5 Einfluß des Seminalplasmas auf Kapazitation, Akrosomenreaktion, Erkennung und Bindung der Eizelle	29
2.1.2.6 Bedeutung des Seminalplasmas bei der Konservierung	33
<b>3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Aufgabenstellung</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Material und Methode</b>	<b>38</b>
3.2.1 Allgemeine Methodik	38
3.2.2 Versuchsreihe I	40
3.2.2.1 Vorversuch	40
3.2.2.2 Besamungsversuch	42
3.2.2.3 Progesterongehalt im Kot	46
3.2.3 Versuchsreihe II	47
3.2.3.1 Vorversuch	47
3.2.3.2 Feldversuch	49
3.2.4 Statistische Methoden	52
<b>3.3 Ergebnisse</b>	<b>54</b>
3.3.1 Versuchsreihe I	54
3.3.1.1 Vorversuch	54
3.3.1.2 Besamungsversuch	57
3.3.1.3 Progesterongehalt im Kot	59
3.3.2 Versuchsreihe II	62
3.3.2.1 Vorversuch	62
3.3.2.2 Feldversuch	67
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>76</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>95</b>

<b>6 SUMMARY</b>	<b>97</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>99</b>
<b>8 ANHANG</b>	<b>117</b>
<b>8.1 Anhang A</b>	<b>117</b>
<b>8.2 Anhang B</b>	<b>121</b>

## 0 Abkürzungsverzeichnis

anom.	anomal
AR	Akrosomenreaktion
a.ovul.	ante ovulationem
BES	Besamungseberstation
BR	Befruchtungsrate
BSA	Bovines serum albumin
BTS	Beltsville thawing solution
CASA	Computerassistierte Motilitätsanalyse
C. l.	Corpora lutea
degen.	degeneriert
D-Phe <sup>6</sup> -LHRH	D-Phe <sup>6</sup> -Luteinisierendes Hormon-Releasing Hormon
entspr.	entspricht
Eiz.	Eizellen
Emb.	Embryonen
FI	Ferkelindex
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Erdanziehungskraft
h	Stunden
HCG	Humanes Choriongonadotropin
Hy	Hybrideber
IFN	Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönnow e.V.
IGF/W	Insgesamt geborene Ferkel je Wurf
i.m.	intramuskulär
KB	Künstliche Besamung
lg(PROG)	dekadisch logarithmierte Progesteronwerte
LH	Luteinisierendes Hormon
li.	links
min	Minuten
Mio	Millionen
Mrd.	Milliarden
M <sub>r</sub>	relative Molekülmasse

norm.	normal
NRR	Non-Return-Rate
Ovul.	Ovulationen
PGE2	Prostaglandin E 2
PGF2?	Prostaglandin F 2?
PGFM	Prostaglandin F- Metaboliten
Pi	Pietraineber
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
p.c.	post conceptionem
p.ins.	post inseminationem
p.ovul.	post ovulationem
p.p.	post partum
re.	rechts
s	Standardabweichung
s.	siehe
SP	Seminalplasma
Std.	Stunden
TMB	3,53',5'-Tetramethylbenzidin
TRT	Thermoresistenztest
Var.	Variante
VR I	Versuchsreihe I
VR II	Versuchsreihe II
WR	Wiederfindungsrate
y	arithmetischer Mittelwert
ZP	Zona pellucida-Protein

## 1 Einleitung

Bei der Anwendung der künstlichen Besamung beim Schwein ist eine relativ hohe Zahl motiler Spermien für ein Inseminat erforderlich, um hohe Befruchtungsraten und gute Konzeptionsergebnisse zu erzielen. Dies wirkt sich auf den Bedarf an Besamungsebern aus. Es hat nicht an Untersuchungen gefehlt, die Möglichkeiten der Verdünnung auszunutzen und dabei die Zahl der Spermien im Inseminat herabzusetzen. Durch diese Ausverdünnung kommt es zu einer erheblichen Reduzierung des Seminalplasmas im Inseminat. Folglich kann das Seminalplasma seine vielfältigen Wirkungen (Waberski, 1995d) kaum entfalten. Zahlreiche Untersuchungen haben mittlerweile gezeigt, daß diese Flüssigkeit mehr als nur ein Transportmedium für die Spermien ist. Sie hat direkten Einfluß auf die Samenzelle und beeinflußt die Funktion des weiblichen Genitale nach der Insemination. Der wohl eindrucksvollste Effekt einer intrazervikalen bzw. intrauterinen Seminalplasmaapplikation ist die Vorverlegung der Ovulation um bis zu 10 Stunden (Waberski et al., 1995a; 1995b; Waberski, 1995d). Weitere Arbeiten zeigten eine signifikante Steigerung der Befruchtungsrate und der Anzahl akzessorischer Spermien in der Zona pellucida bei mit Seminalplasma behandelten Sauen (Willmen, 1989; Rabeler, 1990). Welche Bestandteile des Seminalplasmas dabei eine Rolle spielen, ist noch nicht bis ins Einzelne geklärt. Eine wesentliche Bedeutung kommt aber seinem hohen Östrogengehalt zu (Claus et al., 1987; Houang-Vu, 1987; Claus, 1989; Zöttl, 1988). Diskutiert wird auch die Wirkung verschiedener Peptidfraktionen (Südhoff, 1994). Andere Seminalplasmabestandteile haben Bedeutung bei der Regulation der Kapazitation und der Akrosomenreaktion der Spermien sowie bei der Erkennung und Bindung der Samenzelle an die Zona pellucida der Eizelle (Töpfer-Petersen et al., 1995a). Bislang wenig erforscht ist die Wirkung des Seminalplasmas bei der Konservierung von Ebersperma, wobei jedoch Schutz- und Ernährungsfunktionen belegt sind. Unbestritten ist aber der motilitätsbeeinflussende Effekt von Seminalplasma. Dabei konnten Nehring et al. (1994) deutliche Unterschiede zwischen dem Einfluß des Seminalplasmas verschiedener Ejakulate und verschiedener Eber auf das Motilitätsverhalten von Spermien feststellen. Auch hier ist die Frage nach den wirksamen Substanzen noch nicht beantwortet. Die Identifizierung dieser aktiven Komponenten im Seminalplasma könnte zukünftig den Einsatz synthetischer Substitute zum konservierten Sperma ermöglichen mit dem Vorteil der unbegrenzten Verfügbarkeit bei gleichzeitiger Minimierung hygienischer Risiken (Waberski, 1996). Ziel dieser Arbeit ist es, durch In-vitro-Untersuchungen und Besamungsversuche weitere Hinweise zu Einflüssen des Seminalplasmas, namentlich als Zusatz zum Verdünnermedium, auf Spermien und weibliches Genitale zu geben, wobei die Eberspezifität besonders berücksichtigt

werden soll. Dazu erfolgt ein gezielter Austausch des Seminalplasmas zwischen verschiedenen Ebern. Bei den Laborversuchen ist insbesondere der Einfluß auf das Motilitätsverhalten der Spermien zu charakterisieren. Die Frage, in welchem Umfang sich ein Austausch des Seminalplasmas zwischen guten und schlechten Befruchtern im flüssigkonservierten Sperma auf die Befruchtungsleistung auswirkt, soll anhand eines Besamungsversuches mit einer begrenzten Zahl an Jungsauen geklärt werden. Desweiteren werden mit verschiedenen Seminalplasma-Verdüner-Gemischen konservierte Spermaportionen in vitro untersucht und kommen unter Praxisbedingungen zum Einsatz.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Das Sperma des Ebers

Das Ejakulat besteht aus einem zelligen und einem plasmatischen Anteil. Der zellige Part umfaßt die Spermien und eine geringfügige Menge abgestoßener Epithelien des gesamten Genitaltraktes (Scheunert u. Trautmann, 1987).

Stähr u. Nehring (1997) definieren Sperma als eine Suspension von Spermien in Seminalplasma. Beide Anteile kommen erst im Moment der Ejakulation in Kontakt, wenn die Spermien aus dem Nebenhodenschwanz abgesondert und mit den verschiedenen Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, dem Seminalplasma, vermischt werden.

Das Gesamtejakulat wird in mehreren Fraktionen ejiziert. Zuerst wird das keimhaltige, wäßrigschleimige Sekret abgegeben. Darauf folgt die spermienreiche Phase, die von milchig weißer bis hellgrauer Farbe ist. Mit der letzten Phase wird das sagokornartige Bulbourethraldrüsensekret abgesondert (Mudra u. Busch, 1991).

Bisher gibt es kein Verfahren, mit dem man die Befruchtungsfähigkeit der Eberspermien unmittelbar messen kann. Jedoch ist bekannt, welche Eigenschaften qualitativ hochwertiges Sperma besitzt. Zu deren Ermittlung wird jedes Ejakulat einer routinemäßigen Untersuchung unterworfen. Makroskopisch werden Farbe, Konsistenz, Geruch und Volumen festgestellt, und es wird auf unphysiologische Beimengungen geachtet. Die Bestimmung der Spermienkonzentration kann mit Hilfe verschiedener Methoden erfolgen (Blutkörperchenzählkammer, Photometer, Spermiodensimeter). Die mikroskopische Untersuchung dient der Feststellung von Motilitätsparametern und der Beurteilung der Spermienmorphologie (Weitze u. Müller, 1991; Stähr u. Nehring, 1997).

Das Volumen des Eber ejakulates bewegt sich nach Angaben verschiedener Autoren (Bollwahn, 1978; Kolb, 1984; 1989; Scheunert u. Trautmann, 1987; Weitze u. Müller, 1991; Stähr u. Nehring, 1997) zwischen 50 und 500 ml. Das Sperma ist grauweiß, milchweiß oder gelbweiß (Stähr u. Nehring, 1997). Schon anhand der wäßrigen bis milchigen (Mudra u. Busch, 1991), selten rahmähnlichen Konsistenz (Mudra u. Busch, 1991; Stähr u. Nehring, 1997) sind Aussagen zur Spermienkonzentration im Ejakulat zu machen. In der Literatur sind Angaben zwischen 0,1 bis 1,0 Mio Spermien/ $\mu$ l zu finden (Bollwahn, 1978; Foote, 1980; Kolb, 1984; 1989; Weitze u. Müller, 1991; Stähr u. Nehring, 1997).

Im frisch filtrieren Ebersperma sollten mindestens 50 % vorwärtsbewegliche (Foote, 1980; Weitze u. Müller, 1991) bzw. 70 % motile Spermien enthalten sein. Weitere Mindestanforde-

zung ist ein maximaler Anteil morphologisch anomaler Spermien von 20 % (Leidl, 1983). Ein hoher Anteil anomaler Spermien beeinflusst die Motilitätswerte negativ (Bach et al., 1982). Bekannt ist auch ein Zusammenhang zwischen dem Anteil pathologisch geformter Spermien und den Befruchtungsergebnissen. So konnten Stemmler et al. (1982) bei ihren Untersuchungen an 155 Ebern auch sinkende Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen bei zunehmendem Anteil anomaler Spermien in deren Ejakulat beobachten. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei den anhängenden Protoplasmatropfen zu. Positiv beeinflusst wird das Befruchtungsergebnis durch eine hohe Spermiedichte und Bewegungsaktivität. (Püschel-Dausend, 1974).

### **2.1.1 Die Spermien**

Am 18. März 1678 beschrieb Anton von Leeuwenhoek in einem Brief mikroskopisch kleine Tierchen mit einem Schwanz: Sie waren kleiner als die Blutkörperchen, vorne abgerundet und stumpf, hinten spitz mit einem Schwanz, der fünf- oder sechsmal länger war als der Körper. Nach dieser grundlegenden Entdeckung der „animalculi e semini“ oder „vermiculi minutissimi“, wie Leeuwenhoek die Spermien nannte, waren sie fortan Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen (Bettendorf, 1993).

In der Literatur findet man heute weit ausgiebigere Beschreibungen dieser hochdifferenzierten Zelle (Smollich u. Dorst, 1985; Schülke, 1991; Stähr u. Nehring, 1997). Danach sind Spermien deutlich in Kopf- und Schwanzteil gegliedert und besitzen ein gut erkennbares Mittelstück. Ihre Gesamtlänge beträgt 50 bis 70  $\mu\text{m}$ , das Volumen etwa 28  $\mu\text{m}^3$ . Die Zelle ist vollständig von einer semipermeablen Plasmamembran umgeben, die in ihrem Aufbau dem Modell der Lipid-Doppelmembran mit Proteineinlagerungen folgt.

Der Kopf ist 7 bis 10  $\mu\text{m}$  lang und 4 bis 5  $\mu\text{m}$  breit und fast vollständig vom Zellkern ausgefüllt. Der vordere Teil ist mit einer Kopfkappe bedeckt, darunter befindet sich das Akrosom. Es wird von einer äußeren und einer inneren Akrosomenmembran umgeben und enthält hydrolytisch wirksame Enzyme, die eine Rolle beim Befruchtungsvorgang spielen. Die wichtigsten davon sind Acrosin und Hyaluronidase.

An den Kopf schließt sich die Halsregion mit dem Zentriol an. Das Mittelstück ist ca. 11  $\mu\text{m}$  lang und wird von einer Mitochondrienschale umgeben, die in Form einer Helix um die zentrale Achse angeordnet ist. Der charakteristische Axialfilamentkomplex durchzieht den 40 bis 60  $\mu\text{m}$  langen Schwanzteil und bildet den eigentlichen Bewegungsapparat des Spermiums.

Die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Motilität ist die ATP-Bereitstellung. Sie erfolgt in den Mitochondrien des Mittelstücks. Eberspermien sind zur Absicherung ihrer ATP-

Synthese auf die Atmung angewiesen. Die Fähigkeit, sich aktiv fortzubewegen, unterscheidet die Spermien von anderen Körperzellen. Man kann davon ausgehen, daß immotile Zellen nicht befruchtungsfähig sind. Zwar erfolgt der Spermientransport zum großen Teil passiv durch Kontraktionen der Uterusmuskulatur, aber innerhalb des Eileiters und beim Durchdringen der Eihüllen ist die aktive Bewegung unbedingt erforderlich (Stähr u. Nehring, 1997). Die Motilität ist essentielle Voraussetzung für die Wanderung der männlichen Keimzelle zum Ort der Befruchtung und zur Durchdringung der Zona pellucida (Nieschlag u. Behre, 1996). Die mittlere Geschwindigkeit der Eberspermien liegt mit ca. 55  $\mu\text{m/s}$  unter der anderer Spezies. Auffallend ist auch, daß der Anteil an Spermien, die sich geradlinig vorwärtsbewegen, niedrig ist (Stähr u. Nehring, 1997). Eberspermien bewegen sich häufig in Kreisen mit Durchmessern von 10 bis 100  $\mu\text{m}$  voran. Eine Ursache dieser charakteristischen Bewegung ist die abaxiale Implantation des Halsteiles, die im normal fruchtbaren Eberejakulat in Frequenzen zwischen 20 bis 80 % vorkommt (Müller u. Brandl, 1975).

Weitere essentielle Voraussetzung für die erfolgreiche Befruchtung ist die Kapazitation (Sinowatz, 1991), ein mannigfaltiger Prozeß, der Veränderungen des Stoffwechsels, der Membranen sowie die Beseitigung von Enzyminhibitoren an den Spermien einschließt (Schülke, 1991; Stähr u. Nehring, 1997). Als Ort der Kapazitation wird vorwiegend der Eileiter angegeben (Sinowatz, 1991). Die Vorgänge sind noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt (Stähr u. Nehring, 1997). Es gilt aber als gesichert, daß es unter Einfluß von Effektoren aus dem weiblichen Genitaltrakt zur Destabilisierung der Zellmembran und zu Veränderungen in Stoffwechselaktivität und Motilitätsverhalten (Hyperflagellation) kommt (Schülke, 1991; Stähr u. Nehring, 1997). Ein wesentlicher Schritt während des Kapazitationsvorganges ist die Entfernung von Dekapazitationsfaktoren von der Spermienmembran, die aus dem Seminalplasma stammen (Sinowatz, 1991).

Kapazitierte Samenzellen heften sich an die Zona pellucida, wo die Akrosomenreaktion ausgelöst wird. Vitt (1996) hält den Kontakt zur Zona pellucida für einen außerordentlich wesentlichen Punkt im Komplex der Vorgänge, die zu einer erfolgreichen Befruchtung führen. Die Autorin wies in ihren Untersuchungen an Ejakulaten von Bullen nach, daß der Prozentsatz der Spermien, die im Anschluß an eine Inkubation mit Heparin durch den Zusatz von Kalziumionophor eine AR aufwiesen, signifikant mit der NRR korrelierten. Zusätzlich zeigte sich, daß die NRR bei den Bullen größer ist, bei denen nur sehr wenige akrosomemintakte lebende Spermien am Ende des Versuches verblieben. Der Zusatz von Kalziumionophor stellte in dieser Arbeit einen dem Zona pellucida-Kontakt adäquaten Stimulus dar. Ein großer Teil der Spermien sollte demnach nicht nur prinzipiell zur AR fähig sein, sondern erst bei Kontakt zur Zona

pellucida eine AR aufweisen. Bei der Akrosomenreaktion kommt es zum Kalziumioneneinstrom in die Zelle (Stähr u. Nehring, 1997) und zur Fusion der Plasmamembran und der darunter liegenden äußeren akrosomalen Membran sowie zur Freisetzung akrosomaler Enzyme (Schülke, 1991; Sinowatz, 1991; Stähr u. Nehring, 1997). Nach vollständigem Ablauf der AR bildet die innere Membran die Oberflächenbegrenzung der Samenzelle. Ihre Protease Acrosin spaltet Glycoproteine und ermöglicht dem Spermium die Penetration der Zona pellucida und die Befruchtung der Eizelle (Sinowatz, 1991).

### 2.1.2 Das Seminalplasma

Das Seminalplasma ist der spermienfreie Teil des Spermas (Schülke, 1991). Es entsteht bei der Ejakulation durch Zusammenfließen der Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, der Testes und Epididymes (Scheunert u. Trautmann, 1987). Die akzessorischen Geschlechtsdrüsen des Ebers sind die Samenblasendrüse (Glandula vesicularis), die Prostata (Corpus prostatae mit Pars disseminata) und die Harnröhrenzwiebeldrüse (Glandula bulbourethralis) (Koch u. Berg, 1990).

Seminalplasma wirkt als Transportvehikel der männlichen Gameten im weiblichen Genitaltrakt (Mann u. Lutwak-Mann, 1981; Schülke, 1991) und stellt einen natürlichen Verdüner dar (Mann u. Lutwak-Mann, 1981). Das Medium dient der zeitweiligen Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen der Spermien (Stähr u. Nehring, 1997) und bildet aufgrund seiner enthaltenen Nährsubstrate eine direkte Energiequelle (White, 1980; Schülke, 1991). Seminalplasma hat wichtige regulative Aufgaben beim zeitlichen Ablauf des Befruchtungsvorganges. Ovulationsinduzierende und spermientransportbeschleunigende Komponenten fördern das Zusammentreffen von Ei- und Samenzelle im Stadium ihrer vollen Befruchtungsfähigkeit (Waberski, 1994). Waberski (1995d) gibt eine Übersicht über mögliche Funktionen des Seminalplasmas (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Wirkungen von Seminalplasma

direkte Wirkungen auf die Spermien	indirekte Wirkungen auf den weiblichen Genitaltrakt
Ernährung	Vorverlegung der Ovulation
Schutz	Anregung der Uterusmotorik
Regulation der Motilität	Erschlaffung des Eileiteristhmus
Kapazitation (Reifung)	Beeinflussung der Immunvorgänge
Erkennung und Bindung an Eizelle	

### 2.1.2.1 Chemische Zusammensetzung

Seminalplasma ist charakterisiert durch eine für Körperflüssigkeiten außergewöhnliche Zusammensetzung. Es enthält organische Komponenten in solch hohen Konzentrationen, wie sie nirgendwo anders im Körper zu finden sind (White, 1980). Die organischen Substanzen an sich im Seminalplasma (Fructose, Zitronensäure, Sorbitol, Inositol, Ergothionin, Choline) erinnern eher an die Zusammensetzung von Pflanzen und Mikroorganismen (Mann u. Lutwak-Mann, 1981).

Fructose, Lactat und Pyruvat stellen Substrate für den Stoffwechsel dar (Stähr u. Nehring, 1997). Zitronensäure und Ergothionin werden beim Eber in den Samenblasendrüsen gebildet. Inositol kommt in größeren Mengen einzig bei der Spezies Schwein vor.

Das breite Spektrum an Mineralien und Spurenelementen stammt zum Großteil aus den Nebenhoden (Scheunert u. Trautmann, 1987). Natrium-, Kalium- und Magnesium-Ionen haben neben den Anionen und Kohlenhydraten Einfluß auf die Erhaltung des osmotischen Druckes (Stähr u. Nehring, 1997).

Die Wirkung der einzelnen Bestandteile ist zum Teil noch unklar, bzw. aufgrund der geringen Konzentrationen fraglich. So wurden Oxytocinkonzentrationen von weniger als 1,5 pg/ml (Sander-Richter, 1986) und Relaxinkonzentrationen von 1 ng/ml (Waberski, 1996) festgestellt. Hunter (1973) und Hunter et al. (1983) gaben Prostaglandinkonzentrationen von weniger als 0,34 ng/ml Seminalplasma an. Waberski et al. (1995a) fanden im Seminalplasma nach Gefrierung weder PGE<sub>2</sub> noch PGF<sub>2</sub>?. Unumstritten ist jedoch eine Wirkung der Östrogene im Ejakulat auf das weibliche Genitale, was bereits verschiedene Autoren nachwiesen (Hoang-Vu, 1987; Claus et al., 1987; Zöttl, 1988; Claus, 1989). Hoang-Vu (1987) ermittelte im Gesamt-ejakulat (500 ml) Östrogenmengen bis zu 11,5 µg (5 µg 17 $\beta$ -Östradiol, 2 µg Östron und 4,5 µg Östronsulfat). Claus et al. (1987) erwähnten sogar Gesamtmengen von maximal 15,3 µg im Ejakulat. 17 $\beta$ -Östradiol und Östrone kommen in unkonjugierter und konjugierter Form vor (Claus et al., 1985a). Die Autoren geben dabei folgende Werte an:

Tabelle 2: Östrogengehalt im Ejakulat des Ebers (nach Claus et al., 1985a)

	17 $\beta$ -Östradiol	Östron
unkonjugiert	0,43 ? 0,58	0,86 ? 1,09
konjugiert	0,88 ? 1,09	2,20 ? 2,00

Waberski et al. (1995a) stellten in nativem Seminalplasma 9200 pg/ml Östrogen fest, davon 135 pg/ml 17  $\beta$ -Östradiol. Ähnliche Werte für 17  $\alpha$ -Östradiol konnten auch Willmen (1989), Everwand (1990); Niemann, (1991) und Wilkes (1991) mit 385,7 pg/ml; 286,4 pg/ml; 887,0 pg/ml bzw. 286,4 pg/ml ermitteln.

Der Hauptanteil der Östrogene wird von den Tubuli gebildet. Die akzessorischen Geschlechtsdrüsen produzieren lediglich 22 % der unkonjugierten und 12 % der konjugierten Östrogene (Claus et al., 1987). Daneben werden im Eberhoden weitere Steroidhormone, wie Androgene und Pheromone gebildet (Claus et al., 1983). Im Seminalplasma konnten Claus et al. (1985a) 0,26 (+0,14) ng unkonjugiertes Testosteron und 0,78 ( $\pm$ 1,20) ng konjugiertes Testosteron nachweisen. Diese Werte lagen nur geringfügig unter denen des Gesamtejakulates. Die Autoren schlußfolgerten daraus, daß Testosteron im Gegensatz zu Östrogen weniger an Spermien gebunden wird.

Besonders auffallend ist der Gehalt an nukleolytischen Enzymen (Nukleasen, Nucleotide, Nucleosidasen) und Phosphatasen (Saure Phosphatase, Alkalische Phosphatase, ATP-spaltende Enzyme). Desweiteren ist eine große Gruppe von Glycosidasen ( $\alpha$ -Glycosidase,  $\beta$ -Mannosidase,  $\beta$ -Galactase, N-acetyl-glucosidase) von Interesse. Die Enzyme sind verschiedenen Ursprungs im männlichen Genitaltrakt und ihre Aktivität im Seminalplasma kann somit als Parameter für die Sekretionsleistung des jeweiligen Gebietes verwendet werden (Mann u. Lutwak-Mann, 1981).

Neu ist die Entdeckung von Ubiquitin im Seminalplasma (Einspanier, 1995). Schieferstein gab 1993 bereits Konzentrationen von 1,83 bis 19,11  $\mu$ m/ml für das Seminalplasma des Mannes an. Möglich schien den Autoren eine Rolle vor allem beim Befruchtungsvorgang. Sicher ist dagegen die Schutzfunktion vor Peroxidationsprozessen im Sperma, welche mit Infertilität assoziiert sind (Pierucci et al., 1996).

Die Proteinkonzentration im Seminalplasma der Tiere variiert deutlich (Mann u. Lutwak-Mann, 1981). Durch Gel-Disc-Elektrophorese wurden beim Eber 11 verschiedene Proteine gefunden, damit deutlich weniger als beim Bullen, Schafbock und Rammler (Lavon, 1972). Der Hauptteil wird von den Samenblasendrüsen gebildet, der quantitative Beitrag des Nebenhodens zum Proteinmuster ist klein (Lavon et al., 1973). White (1980) gibt Konzentrationen von 3,7 g Protein/ml Seminalplasma an. Ein Teil der Proteine (Spermadhesine) wird sehr schnell und mit unterschiedlicher Intensität an die Spermienoberfläche adsorbiert. Die daraus resultierende negative Oberflächenladung der Spermien stabilisiert die Zellmembran. Diese Proteine haben regulative Funktionen für bestimmte Stoffwechselforgänge der Spermien im weiblichen Genitaltrakt sowie bei Erkennung und Bindung der Eizelle (Stähr u. Nehring, 1997).

Eine Übersicht zu den Inhaltsstoffen des Eberseminalplasmas gibt Schülke (1991):

<u>Lipide</u> (mg/100 ml)		<u>Anorganische Bestandteile</u> (mg/100 ml)	
Phospholipid	1,9-2,6	Hydrogencarbonat	50
Phosphatidylserin	0,24-0,33	Kalzium	5 (2-6)
Phosphatidylethanolamin	0,55-0,77	Chlorid	330 (260-430)
Phosphatidylcholin (Lecithin)	0,19-0,28	Magnesium	11 (5-14)
Prostaglandine		Phosphor	
A+B	0,00002	gesamt	357
E	0,00005	anorganisch	17
F	0,00002	in Säure gelöst	171
Sphingomyelin	0,6-0,89	Fette	6
Testosteron (frei)	0,102	Kalium	240 (80-380)
Gesamt-Lipid	4,7-6,1	Natrium	650 (290-850)
		Schwefel	16 (12-27)
		Zink	2,2
 <u>Stickstoffreiche niedermolekulare Bestandteile</u> (mg/100 ml)		 <u>Niedermolekulare organische Bestandteile</u> (mg/ 100 ml)	
Ammoniak	1,5 (0,5-2,0)	Ascorbinsäure	3,5 (2-5)
Kreatinin	0,3	Zitronensäure	130 (30-330)
Ergothonein	15 (16-30)	Glycerolphosphorylcholin	110-240
Harnstoff	3	Fructose	13 (3-50)
Serotonin (ng/ml)	50	Galactose	(4-20)
		Glycerol	(10-20)
		Glycerolphosphorylinositol	
		(nmol/ml)	260
		Inositol	530 (380-630)
		Lactat	27
		Sorbitol	12 (6-18)

Freie Aminosäuren (µmol/100 ml)

Neutral		Sauer		Basisch	
Alanin	23,8	Asparaginsäure	18,0	Arginin	1,2
Cystin	147,7	Glutaminsäure	204,7	Histidin	3,2
Glycin	4,7			Lysin	Spuren
Isoleucin	10,7				
Leucin	2,4				
Methionin	6,4				
Phenylalanin	3,8				
Prolin	8,9				
Threonin	5,9				
Thyrosin	14,3				
Serin	17,1				

Die Zusammensetzung des Seminalplasmas variiert in Abhängigkeit von Individuum, Ejakulationsfrequenz und Jahreszeit (Claus et al., 1983; Claus et al., 1985b; Claus et al., 1987). Die Östrogenkonzentration ist im Herbst bis zu zehnmal höher als im Sommer. Von Mitte Dezember bis Mitte März kommt es wieder zur Abnahme der Östrogenwerte (Claus et al., 1985b). Abdel-Ghaffar et al. (1996) untersuchten die Variationen in der Seminalplasmazusammensetzung bei zwei Kaninchenrassen (New Zealand white und Californian). Hierbei waren die ermittelten Werte der 64 New Zealand white für Gesamtprotein, Albumin, Kalzium und Magnesium signifikant höher, für Gesamtphosphor, anorganisches Phosphor und Kupfer signifikant niedriger als die der 64 California-Kaninchen. Somit ist die Seminalplasmazusammensetzung; zumindest beim Kaninchen; auch rasseabhängig. In Erstejakulaten fand der Autor signifikant höhere Werte für Gesamtlipid, Gesamtprotein, Albumin, Globulin, Kalzium, Magnesium, Gesamt- und anorganisches Phosphor, Zink, Kupfer und Eisen als im Zweitejakulat. Auch Mann u. Lutwak-Mann (1981) sprachen schon von sinkenden Lipidkonzentrationen bei höheren Ejakulationsfrequenzen. Kenntnisse über die Zusammensetzung des Seminalplasmas sind einerseits essentiell für die Klärung der Fragen zu seiner Funktion und Wirkung auf Spermien direkt und im weiblichen Genitaltrakt, haben andererseits aber auch diagnostische Bedeutung. Dies findet bereits Nutzung in der Humanmedizin, wo Messungen des Gehaltes bestimmter Marker für jeweilige Abschnitte des männlichen Geschlechtstraktes Aufschluß über Funktionstüchtigkeit und Entzündungsgeschehen geben (Nieschlag u. Behre, 1996). So sind z.B. Zink, Zitronensäure, Gamma-Glutamyl-Transpeptidase und Saure Phosphatase Indikatoren für die Funktion der



Prostata, Glycerophosphorylcholin und Carnitin für den Nebenhoden (Acosta et al., 1995; Nieschlag u. Behre, 1996).

### **2.1.2.2 Einfluß des Seminalplasmas auf den Spermientransport**

Spermien werden im weiblichen Genitale vorwiegend passiv transportiert, jedoch ist innerhalb des Eileiters und bei der Durchdringung der Eihüllen eine aktive Bewegung unbedingt erforderlich (Stähr u. Nehring, 1997).

Mann et al. (1956) untersuchten das Schicksal von Spermien und Seminalplasma nach der Paarung. 40 Minuten nach dem Koitus waren die Uterushörner gefüllt mit Sperma. Bereits nach kurzer Zeit erreichten Spermien und Seminalplasma zusammen die uterotubale Verbindung, was ein Beweis für den passiven Transport des Samens im weiblichen Genitale ist. Für etwa 36 Stunden werden die Spermien dann im distalen Bereich des Isthmus arretiert, bis es darauffolgend zu einer aktiven Neuverteilung in Richtung Ovar kommt (Hunter, 1984). Im Eileiter erfolgt der Weitertransport durch Muskelkontraktionen und Zilienschlag. Das Sperma wird durch eine Folge von Kontraktionen über die Wegstrecke Isthmus–Ampulle wie Boli getrieben, wobei gelegentlich Samen auch durch die Ampulle hindurch gelangt. Konstriktionen der Verbindung zwischen o.g. Eileiterabschnitten halten normalerweise die Flüssigkeit in der Ampulle (Blandau u. Gaddum-Rosse, 1974)

Mit den passiven Transportmechanismen beschäftigten sich auch Einarsson u. Viring (1973a) und Viring u. Einarsson (1980a; 1980b). Besonderes Augenmerk legten sie darauf, ob und in welcher Form Seminalplasma die Motilität von Uterus und Eileiter beeinflusst. Bei In-vitro-Untersuchungen wurden Streifen der Längsmuskulatur von Uterus und Isthmuseil des Eileiters mit Seminalplasma versetzt. Dabei zeigten sich eine Erniedrigung der Frequenz und eine Senkung der Amplitude der Uteruskontraktionen, wogegen Tonus und Amplitude der Kontraktionen des Isthmus erhöht wurden (Einarsson u. Viring, 1973a). Spätere Untersuchungen an anästhesierten Jungsaugen erbrachten andere Ergebnisse. Weder nach Infusion von Seminalplasma noch von Puffer kam es zu einer Motilitätsbeeinflussung des Uterus. Im Isthmus jedoch änderte sich sofort bzw. in den nächsten fünf bis zehn Minuten das Motilitätsverhalten. Hauptsächlich wurde dies durch eine Reduktion der Amplitude der Kontraktionen charakterisiert. Für eine Dauer von bis zu 30 Minuten senkte sich der intraluminale Druck um 35 bis 80 % bei Vorhandensein von Seminalplasma. Nach Applikation von Pufferlösung kam es zu keinem Effekt (Viring u. Einarsson, 1980b). Die Relaxation der Muskelaktivität des Isthmus erwies sich als günstig für den Spermientransport im Ovidukt (Viring u. Einarsson, 1980a). Diese Ergebnisse standen im Gegensatz zu denen der In-vitro-Untersuchungen. Die Autoren suchten die

Ursachen u.a. in der unterschiedlichen Sensitivität von Längs- und Kreismuskelschicht gegenüber Seminalplasma.

Zu weniger eindeutigen Effekten des Seminalplasmas auf den Eileitertonus kamen Pettersson et al. (1993). Sie implantierten zwei ultraminiature Drucksensoren in den Isthmus und applizierte Seminalplasma, Östrogenlösung (11,5 µg Östrogen) bzw. Saline in den Uterus. Keine der intrauterinen Infusionen veränderte den intraluminalen Druck im Isthmus; es kam jedoch bei einigen Jungsauen zur Absenkung der Frequenz der phasischen Druckschwankungen, was aber keiner intrauterinen Deposition zuzuordnen war.

Auch Alanko (1974) erachtete Seminalplasma als förderlich für den Spermientransport und beschrieb dessen unterstützende Wirkung bei der Bildung des Spermienreservoirs in der uterotubalen Verbindung. Dadurch wird die Zahl der Spermien, die zu einer bestimmten Zeit am Ort der Befruchtung vorhanden sind, erhöht. Dies sah der Autor als eine Voraussetzung für hohe Befruchtungsraten an. Danach ist eine Samenzellpopulation von mindestens 500 Spermien im Eileiter von Nöten, um über 90 % befruchtete Eizellen zu erhalten. Seine Arbeit lieferte zudem ein bemerkenswertes Ergebnis bezüglich der frühen Entwicklung von Schweineembryonen. Ausgesprochen lange und im Überfluß fand Alanko (1974) in Tuben und Uteri 4-Zellstadien. Mc Laren (1980) gibt für letztere eine Verweildauer von 24 bis 48 Stunden an. Alle folgenden Zellteilungen geschehen im Abstand von 12 Stunden. Bei Cheng (1981) waren am vierten Tag nach der Besamung 55 % aller wiedergefundenen Embryonen im 4-Zellstadium.

Welche Komponenten im Seminalplasma aktiv auf den weiblichen Genitaltrakt einwirken, bleibt bislang teilweise noch fraglich. Zumindest partiell ist dafür der hohe Östrogenanteil verantwortlich zu machen. Der Mechanismus der Seminalplasmawirkung wird bisher mit einer endometrialen Prostaglandinfreisetzung nach Kontakt mit Seminalöstrogenen erklärt. Die daraus resultierende Aktivierung der Uterusmotorik bewirkt eine Stimulierung des Spermientransportes (Waberski, 1994). Zu dieser Erkenntnis trug auch die Arbeit von Hoang-Vu (1987) bei. Nach Insemination von 100 ml Ejakulat kam es zu einer wesentlich deutlicheren Erhöhung der Kontraktionsfrequenz des Myometriums als nach Infusion von EDTA bzw. Natriumchloridlösung. Die spezifische Östrogenwirkung konnte mittels Applikation von physiologischer Kochsalzlösung mit bzw. ohne Östrogenzusatz dokumentiert werden. NaCl für sich bewirkte lediglich einen flachen Anstieg der Kontraktionsfrequenz, und auch die Phase des erhöhten Tonus war kürzer. Noch deutlicher wurden die Differenzen als in einer zweiten Versuchsreihe zur Ausschaltung des Einflusses der Zervixreizung bei der Insemination den Sauen Katheter im-

plantiert wurden. Reine Natriumchloridlösung zeigte keinerlei Wirkung, wogegen der Zusatz von Östrogenen eine Erhöhung der Frequenz der Uteruskontraktionen hervorrief. Der Autor vermutet als Ursache eine Prostaglandinfreisetzung des Endometriums, die als spezifische Antwort auf die Östrogenapplikation diskutiert wird.

Claus et al. (1987) konnten nach Infusion von Östrogenen ins Uteruslumen zum Östruszeitpunkt eine Steigerung der Anzahl der Myometriumkontraktionen von 20 auf 50 in der Stunde beobachten. Eine Messung der PGF<sub>2</sub> in den Uterusvenen zeigte einen erheblichen Anstieg auf mehrere pg/ml innerhalb von ein bis vier Minuten nach der Applikation von jeweils 10 µg 17 $\beta$ -Östradiol, Östron und Östronsulfat, nicht aber nach Insemination von Saline. Somit erwies sich die PGF<sub>2</sub>-Freisetzung als spezifischer Östrogeneffekt.

Letzteres wird auch durch die Arbeiten von Dierkes (1991) und Wilkes (1991) untermauert. Von einer begrenzten Anzahl Jungsauen wurden in regelmäßigen Abständen Blutproben entnommen und durch Messung deren Progesteron-, Östradiol- und PGFM-Konzentration Hormonprofile erstellt. Dierkes (1991) infundierte unmittelbar nach Feststellung der stehenden Rausche Östrogene (11,5 µg), Seminalplasma bzw. abgetötetes Sperma. Dabei beobachtete er nach transzervikaler Östrogen- und Spermainfusion Anstiege der mittleren peripheren Konzentrationen der Prostaglandin F-Metaboliten mit zum Teil signifikanten Unterschieden gegenüber den Ausgangswerten. Die Seminalplasmabehandlung hatte in diesem Versuch keine signifikanten Veränderungen der PGFM-Konzentrationen zur Folge. Bei Wilkes (1991) hingegen traten nach Seminalplasma- und Östrogeninfusion deutliche Steigerungen der PGF<sub>2</sub>-Werte im peripheren Blut der verwendeten Jungsauen auf. Bemerkenswert hierbei war, daß dieser Anstieg nicht mit der Östrogenmenge zu korrelieren schien, da bei Benutzung von 1,1 µg alle Sauen steilere und deutlichere Anstiege zeigten als bei 11,5 µg. Niedrige Progesteronkonzentrationen vor und während der Brunst sowie der rapide Anstieg im periovulatorischen Zeitraum erwiesen sich als typisch für den Hormonverlauf einer rauschenden Sau. Dierkes (1991) spricht dabei von einer für brünstige Sauen charakteristischen „Progesteronwanne“. Die auftretenden Veränderungen im Blutplasmalogesteronspiegel während des Zyklus wurden bereits durch verschiedene Untersucher dokumentiert. Bereits am zweiten Tag nach dem LH-Peak sind im peripheren Blut deutlich erhöhte Progesteronwerte festzustellen (Van de Wiel et al., 1981). Ein weiterer Anstieg am dritten und vierten Tag nach Östrusbeginn wird gefolgt von einem steilen Anwachsen der Werte am siebenten und achten Tag (Stabenfeldt et al., 1969). Durch direkte Messungen in der Ovarvene konnte Elsaesser (1982) das Maximum der Progesteronkonzentration am 10. bis 12. Tag ermitteln. Untersuchungen von Stabenfeldt et al. (1969) sowie Hendricks et al. (1972) erbrachten Maximalwerte von 35 ng/ml bzw. 33,2 ng/ml. Ab dem 15.

Tag (Stabenfeldt et al., 1969), nach Thilander und Rodriguez-Martinez (1989) ab dem 18. Tag kommt es zum stärkeren Abfall der Progesteronkonzentration im Blut, die bis zum Östrus hin Werte von weniger als 1 ng/ml erreichen wird (Hendricks et al., 1972). Helmond et al. (1986) setzten einen Progesteronanstieg im Blut von mehr als 1 ng/ml über die Basallinie hinaus als Ovulationszeitpunkt fest.

In einer Vielzahl von Besamungsversuchen wurde als Maß für den Spermientransport im weiblichen Genitale die Anzahl der akzessorischen Spermien in der Zona pellucida der wiedergefundenen Eizellen und Embryonen verwendet. Diese steht in einem ursächlichen Zusammenhang zur Befruchtungsrate (Alanko, 1974; Weitze, 1989). So stellte Waberski (1994) eine doppelt so hohe akzessorische Spermienanzahl in der Zona pellucida fest, wenn vor der Besamung Seminalplasma (Kontrolle NaCl) infundiert wurde. Zugleich wurde bei Andrade Moura (1988), Weitze et al. (1989), Rabeler (1990) und Guilen Soares (1995) unterstrichen, daß außer den Östrogenen des Seminalplasmas noch andere Komponenten eine Rolle spielen. Andrade Moura (1988) verwendete als Infusionsmedien vor der eigentlichen Insemination mit Tiefgefriersperma (in Makrotüb-Röhrchen oder Flachbehältnissen) 50 ml Seminalplasma, 50 ml Glucose-EDTA-Verdünner mit 11,5 µg Östrogen bzw. 50 ml Glucose-EDTA-Verdünner. Die Seminalplasmainfusion führte zu einer erhöhten Spermienanzahl in der Zona pellucida und zu besseren Befruchtungsraten. Eine positive Wirkung der Östrogene zeigte sich nur bei dem Teil der Probanden, die mit Sperma aus Makrotübröhrchen besamt wurden. Weitze et al. (1989) dokumentierten nach Infusion von Seminalplasma, Östrogenen und Verdünner eine im Vergleich zu Seminalplasma deutlich verminderte Reaktion auf die Östrogenapplikation hinsichtlich akzessorischer Spermien in der Zona pellucida und der Befruchtungsrate. Bei Versuchen von Rabeler (1990) verbesserte die „Insemination“ von Seminalplasma den Spermientransport und die Befruchtungsrate signifikant gegenüber Östrogen- und Verdünnergaben, wobei die Ergebnisse nach Östrogenapplikation die nach Verdünnerapplikation übertrafen. Die Befruchtungsrate betrug in der Seminalplasmagruppe 85,2 %, in der Östrogen-Gruppe 74,5 % und in der Verdünner-Gruppe 53,8 %. Die Unterschiede sind statistisch gesichert. Guilen Soares (1995) infundierte 24 Stunden nach Brunstfeststellung 50 ml Seminalplasma, aktivkohlebehandeltes Seminalplasma, aktivkohlebehandeltes Seminalplasma mit Zusatz von 10 µg 17 $\beta$ -Östradiol, physiologische Kochsalzlösung bzw. Seminalplasma eines zweiten Pools. Unmittelbar darauf erfolgte die Besamung. Zwischen den Befruchtungsraten in den verschiedenen Behandlungsgruppen bestanden keine statistisch absicherbaren Unterschiede. Die Aktivkohlebehandlung (Entfernung der Östrogene) führte jedoch zu geringeren akzessorischen Spermien-

zahlen im Vergleich zu unbehandeltem Seminalplasma. Der Autor schlußfolgert, daß Seminalplasma einen spezifischen, über den Volumenreiz hinausgehenden Effekt auf die befruchtungskompetente Spermienpopulation im Eileiter hat. Die Steigerung des Spermientransportes scheint nur partiell von Östrogenen abhängig zu sein.

Von Interesse war zudem die Wirkung einer Seminalplasmavorapplikation bei Besamungen mit unterschiedlichen Inseminationsdosen, um den Effekt auf den Spermientransport quantifizieren zu können. Peña Alfaro (1988) ermittelte zwischen der Seminalplasma-Gruppe und der Verdünner-Gruppe bei Besamungen mit 2,0 sowie auch mit 0,5 Mrd. Spermien/100 ml signifikante Unterschiede in der Anzahl akzessorischer Spermien in der Zona pellucida. Für den spezifischen Effekt sprach dabei, daß die Insemination von 0,5 Mrd. Spermien bei zusätzlicher Applikation von Seminalplasma höhere Spermienrückgewinnungsraten erbrachte als die Besamung mit 2,0 Mrd. Samenzellen bei Verwendung von Verdünner.

Willmen (1989) konnte durch ihre Versuche mit den Dosisgruppen 2,0; 1,0 und 0,5 Mrd. Spermien diese Ergebnisse untermauern. In allen mit Seminalplasma behandelten Gruppen erhielten 95,8 bis 99,2 % der Zonae pellucidae akzessorische Spermien, in der Verdünnergruppe waren es hingegen nur 35,0 % (0,5 Mrd. Spermien) bis 84,7 % (2,0 Mrd. Spermien). Damit zeigte sich, daß nach Seminalplasmagabe, unabhängig von der Anzahl der aus der Inseminationsportion verfügbaren Samenzellen, genügend Spermien zum Ort der Fertilisation transportiert wurden, um über 95 % der Eizellen zu befruchten. Verdeutlicht wird der Seminalplasmaeffekt auch dadurch, daß in der Verdünner-Gruppe nur 0,3 % der Zonae mehr als 120 Spermien enthielten, wogegen es in der Seminalplasma-Gruppe 23,1 % waren. Der Seminalplasmaeffekt wurde insbesondere in der mit 0,5 Mrd. Spermien besamten Sauengruppe deutlich, in welcher die mittlere Anzahl akzessorischer Spermien bei der Seminalplasmaanwendung gegenüber der Verdünnerinfusion um den Faktor 85,3 zunimmt. Die Befruchtungsrate zeigte gleichermaßen zu wertende Ergebnisse: Ohne Seminalplasmavorbehandlung sank der Parameter signifikant von 92,2 % auf 24,2 % ab. Rath et al. (1989) konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Spermienrückgewinnungsraten zwischen Sauen mit Verdünnervorapplikation (Varianten B und D) und mit Seminalplasmaapplikation (Varianten A und C) bei Besamungsdosen von 2,0 (Varianten A und B) und 0,5 Mrd. (Varianten C und D) Spermien ermitteln. Mehr als 120 Samenzellen wurden bei 26 % der Zonae der Variante A, 5 % der Variante B, 25 % der Variante C und 0 % der Variante D gefunden. Die Befruchtungsraten zwischen den Gruppen unterschieden sich nicht. Die Autoren beobachteten jedoch auch einen Einfluß des Seminalplasmas auf die Embryonenqualität. Der Anteil intakter Embryonen verringerte sich bei Reduktion der Besamungsdosis nicht, wenn eine Präinsemination mit Seminalplasma erfolgte.

Der Wirkung des Seminalplasmas auf die Befruchtungskompetenz der Spermien sind natürlich auch Grenzen gesetzt. Unter suboptimalen Bedingungen, z.B. bei Reduktion der Samenzellen in der Besamungsdosis (? 0,3 Mrd. Spermien) oder Verlängerung des Intervalls zwischen Insemination und Ovulation (12 bis 20 Stunden), kann es keinen ersichtlichen Einfluß des Seminalplasmas auf die Befruchtungsrate geben. Es vermag nicht, die Zahl der fertilen Samenzellen am Ort der Befruchtung effektiv zu erhöhen (Waberski et al., 1995c).

Außerdem hat Seminalplasma keinen langanhaltenden Effekt auf das weibliche Genitale, was Giles et al. (1990) aus den Ergebnissen ihrer Versuche schlußfolgerten. Eine Suspension mit toten Spermien, Seminalplasma bzw. Eialbumin wurde Jungsauen am zweiten Östrustag und Altsauen am zweiten Tag p.p. infundiert. Die Besamungen erfolgten im darauffolgenden Östrus. Weder die Trächtigkeitsrate noch die Anzahl der Embryonen am 38. Tag p.c. bei den Jungsauen, noch die Trächtigkeitsrate sowie die Wurfgröße bei den Altsauen zeigten Unterschiede in Abhängigkeit vom Infusionsmedium. Eine Steigerung der Reproduktionsleistung durch Seminalplasmaapplikation ist also nur unter bestimmten Bedingungen möglich.

### **2.1.2.3 Einfluß des Seminalplasmas auf den Ovulationsvorgang**

Die wohl eindrucksvollste Wirkung des Seminalplasmas ist die Vorverlegung der Ovulation. Hierzu gab es in den letzten Jahren umfangreiche Forschungsarbeiten (Brutgans, 1983; Peña Alfaro, 1988; Willmen, 1989; Lotz, 1990; Rabeler, 1990; Weitze et al., 1990a; 1990b; Niemann, 1991). Vereinfacht wurden die Studien mit der Einführung des Real-time-Sektorscanners (5 MHz) zur Ovarkontrolle bei der Sau (Habeck, 1989). Damit wurde es möglich, die Follikelentwicklung über einen bestimmten Zeitraum zu beobachten. Das Verschwinden der Follikel im sonographischen Bild galt als Indiz für die stattgefundene Ovulation. In älteren Arbeiten (Peña Alfaro, 1988; Willmen, 1989) erfolgte eine retrospektive Berechnung/Schätzung des Ovulationszeitpunktes unter Zuhilfenahme der von Hunter (1974) ermittelten Altersangaben für die verschiedenen Teilungsstadien, die sich auf den Eizellaktivierungspunkt beziehen. Da die Ovulation vor der Eizellaktivierung (2. meiotische Teilung nach Inkorporation der befruchtenden Samenzelle) erfolgte, wurde zur Schätzung des Ovulationszeitpunktes ein Zeitraum von sechs Stunden zu den von Hunter (1974) ermittelten Intervallen zwischen Aktivierung und Entwicklungsstadium der Eizelle addiert. Der geschätzte Ovulationszeitpunkt ergab sich aus der Differenz zwischen dem Zeitraum Besamung – Spülung des Genitaltraktes und dem Embryonalalter.

Bei all den Untersuchungen ging es vor allem auch darum, die an der Ovulationsauslösung beteiligten Komponenten einzugrenzen, die Frage nach den Ablaufmechanismen zu beantwor-

ten und Zusammenhänge zwischen dem Zeitpunkt der Seminalplasmabehandlung und ovulationsauslösender Wirkung aufzudecken.

Unmittelbar vor der Besamung applizierte Peña Alfaro (1988) Seminalplasma bzw. Verdünner intrazervikal an Jungsauen. Die Anwendung von Seminalplasma führte gegenüber der Verdünnervorbehandlung zu einer rechnerischen Vorverlegung des Eizellaktivierungspunktes um durchschnittlich 12,9 Stunden. Willmen (1989) ermittelte in einem ähnlichen Versuch ein im Durchschnitt um 4,7 Stunden, Rabeler (1990) um 3,9 Stunden kürzeres Intervall Besamung–Ovulation, wenn Seminalplasma infundiert wurde, was sich jedoch statistisch in beiden Fällen nicht absichern ließ.

Die intrazervikale Seminalplasmainfusion zwei Stunden vor der Besamung ergab bei Versuchen von Wagner-Rietschel (1991) zwar eine stabile, aber statistisch nicht abzusichernde Tendenz zur Verkürzung der Brunst um 3,0 und des Zeitraumes Brunstbeginn–Ovulation um 2,8 Stunden.

Zu einer deutlichen Vorverlegung der Ovulation führte eine intrauterine Applikation von Seminalplasma 16 Stunden nach Duldungsbeginn (Everwand, 1990). Bei den Kontroll-Tieren wurde die Ovulation im Mittel 40,0 Stunden nach dem Brunstbeginn festgestellt, bei den Sauen der Versuchsgruppe schon nach 30,6 Stunden. Im Hinblick auf die Gesamtdauer der Rausche zeigte sich eine Verkürzung dieser, wenn die Ovulation deutlich vorverlegt wurde (SP-Gruppe 41,7 Std.; Kontrolle 54,3 Std.).

Signifikant frühere Ovulationszeiten ermittelte auch Lotz (1990), wenn Jungsauen Seminalplasma „inseminiert“ wurde, sobald sie Duldungserscheinungen (Stunde 0) zeigten. Der durchschnittliche Ovulationszeitpunkt lag in der SP-Gruppe bei 30,1 (? 7,6) Stunden nach Brunstbeginn, in der Kontroll-Gruppe bei 44,5 (? 4,9). Eine geringere Östruslänge bei deutlicher Ovulationsvorverlegung trat auch in diesem Versuch auf (SP-Gruppe 50,9 Std., Kontroll-Gruppe 59,1 Std.).

Niemann (1991) konnte zwischen den Behandlungszeitpunkten Duldungsbeginn und 16 Stunden später keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf den Ovulationszeitpunkt feststellen. In beiden Versuchsdurchgängen ergaben sich zwischen der SP-Gruppe und der Kontroll-Gruppe aber deutliche Differenzen. Eine zweimalige Applikation von Seminalplasma zur Stunde 0 und 16 führte nicht zu einer weiteren Vorverlegung des Ovulationszeitpunktes.

In Auswertung verschiedener Versuche postulierten Weitze et al. (1990a) sowie Waberski, (1995d), daß der deutlichste Effekt hinsichtlich der Ovulationsvorverlegung erreicht wird, wenn Seminalplasma gleich zu Beginn der stehenden Rausche (Stunde 0) appliziert wird. Bei Behandlung 24 Stunden nach Brunstfeststellung, dem praxisüblich ersten „richtigen“ Besa-

mungszeitpunkt, war keine Ovulation mit Seminalplasma zu induzieren. 16 Stunden nach Brunstfeststellung war die Reaktion auf die Infusion sehr variabel. Die Stunde-0-Gruppe wies mit einer Vorverlegung der Ovulation um durchschnittlich 10,7 Stunden den ersichtlichsten Effekt auf. Dadurch, daß im Gegensatz zu den letztgenannten Probanden keine Sau der Stunde-16-Gruppe, einen Effekt von mehr als acht Stunden aufwies und zudem vermehrt geringere von zwei und sechs Stunden beobachtet wurden, zeigt sich, daß die Seminalplasmawirkung kein „Alles-oder-Nichts-Ereignis“ ist, sondern mit steigenden Intervallen zwischen Brunstbeginn und Behandlung abnimmt (Waberski, 1995d).

Umfangreiche Studien zum Zeitraum Brunstbeginn–Ovulation führte Wagner-Rietschel (1991) durch. Von den durch ihn untersuchten 427 Altsauen ovulierten 82,4 % 32 bis 56 Stunden nach Brunstbeginn. Nach Kolb (1984) ist bekannt, daß die meisten Eizellen zwischen der 36. und der 44. Stunde der Rausche freigesetzt werden. Um diese Zeitspanne möglichst eng zu halten und den Brunstvorgang bei mehreren Tieren zu vereinheitlichen, bedient man sich der Ovulationssynchronisation. Bei ovulationssynchronisierten Sauen erwartet man den Beginn der Ovulationen 40 bis 42 Stunden nach der HCG-Gabe (Dziuk u. Polge, 1962). Bei synchronisierten Altsauen stellte Steffens (1984) über 4 bis 9, bei Jungsaunen über 6 bis 10 Stunden Ovulationen fest. Thüring (1987) ermittelte durchschnittliche Ovulationszeiträume von 9,5 Stunden für Altsauen und 7,2 Stunden für Jungsaunen, jeweils nach Ovulationssynchronisation. Hormonbehandelte Sauen erbringen eine höhere Ovulationsrate als unbehandelte Tiere. Cheng (1981) stellte bei Jungsaunen durchschnittliche Werte von 22,6 ( $\pm$  10,6) fest. Jacob u. Elze (1989) geben 19,7 Ovulationen für synchronisierte und 14,7 für spontanrauschende Jungsaunen an. Mit den höheren Ovulationsraten verlängert sich auch der Ovulationszeitraum (Cheng, 1981), was mit einem Anstieg der Anzahl der degenerierten und von der Norm abweichenden Embryonen, besonders in den ersten drei Tagen p.ovul. einhergeht (Dziuk u. Polge, 1962; Jacob u. Elze, 1989). Hunter (1966) ermittelte starke Embryonenverluste am vierten Tag p.c. bei Tieren mit mehr als 36 Ovulationen.

Auf der Suche nach dem Mechanismus der Ovulationsauslösung und den dabei wirksamen Inhaltsstoffen des Seminalplasmas fiel der Blick auch in diesem Fall zuerst auf die beträchtlichen Mengen an Östrogen im Eberseminalplasma. Claus et al. (1987) und Zöttl (1988) nehmen als möglichen Wirkungsmechanismus eine östrogengesteuerte Prostaglandinfreisetzung im Uterus an. Bereits wenige Minuten nach Infusion von Östrogen waren erhöhte PGF<sub>2</sub>?-Konzentrationen in der Uterusvene meßbar (Claus et al., 1987). Gleiches ist bei Dierkes (1991) und Wilkes (1991) zu lesen. Spät ovulierende Tiere wiesen einen geringeren Anstieg auf als



früh ovulierende; zum Teil auch keinen; worin Wilkes (1991) einen deutlichen Zusammenhang zwischen PGF-Anstieg und Vorverlegung der Ovulation sieht. Um einen Einfluß auf letztgenannten Vorgang ausüben zu können, müssen die im Endometrium produzierten Prostaglandine über einen direkten Weg zum Ovar transportiert werden, was aufgrund der speziellen Blutgefäßführung im Genitaltrakt (Gegenstromprinzip) (Kotwica, 1980; Koch u. Berg, 1990) gewährleistet wäre. An den Eierstöcken kann PGF<sub>2</sub> Enzymsysteme aktivieren, die für die Auflösung der Follikelwand verantwortlich sind (Espey u. Coons, 1976; Espey, 1980; Schröder u. Talbot, 1982). Claus (1989) und Zöttl (1988) gehen dabei von einem additiven Effekt der als Antwort auf die „inseminierten“ Östrogene im Uterus und der intrafollikulär gebildeten Prostaglandine im Ovulationsgeschehen aus.

Doch auch bei diesem Prozeß stellt sich nach den Ergebnissen von Rabeler (1990), Everwand (1990), Lotz (1990), Weitze et al. (1990b) und Niemann (1991) die Frage, ob nicht auch andere Inhaltsstoffe des Seminalplasmas an der Ovulationsvorverlegung beteiligt sind. Intrazervikale Östrogeninfusionen erreichten in genannten Arbeiten nie die Wirkung einer Seminalplasmaapplikation, obwohl die Östrogenkonzentration im Seminalplasma um ein Vielfaches niedriger war als in der verwendeten Östrogenlösung. Bei der weiteren Suche bediente man sich des „Mariensee-Modells“. Dabei fungierte das linke Uterushorn der Sau als Kontrolle, indem es vom Gebärmutterkörper abgesetzt wurde und somit der Infusion nicht zugänglich war. So vorbereitete Sauen ovulierten nach Seminalplasmaapplikation am Versuchsovar im Mittel 10,7 Stunden früher als am Kontroll ovar. Nach nahezu vollständiger Entfernung der Östrogene aus dem Seminalplasma durch Aktivkohlebehandlung betrug die Ovulationsvorverlegung 7,3 Stunden. Erneuter Zusatz von Östrogenen führte wieder zum vollständigen Effekt (Ovulationsvorverlegung um 10,0 Std.). Nach Einsatz unterschiedlicher Molekulargewichtsfractionen aktivkohlebehandelten Seminalplasmas zeigte sich, daß andere aktive Substanzen in der 1 bis 10 kDa-Fraktion zu suchen sind (Südhoff, 1994; Waberski et al., 1995a). Nach Zusatz des eiweißspaltenden Enzyms Pronase zu der aktivkohlebehandelten Seminalplasmafraktion konnte im Tiermodell keine ovulationsauslösende Wirkung mehr festgestellt werden. Damit ist zu vermuten, daß die unbekannt Komponente ein Peptid ist. Darüber hinaus wurde nach Filtration der Fraktion belegt, daß unterhalb von 1 kDa keine Aktivität mehr besteht; kleinste Moleküle und Ionen also nicht an dem Ovulationseffekt beteiligt sein dürften (Waberski, 1995d). Aus diesen Ergebnissen heraus wird ein polyfaktorielles Geschehen vermutet, welches Östrogene und andere Inhaltsstoffe des Seminalplasmas; wahrscheinlich auch reflektorische und immunologische Vorgänge; miteinbezieht.

Es gibt in der letzten Zeit auch Meinungen, die die durch PGF hervorgerufenen Mechanismen in Frage stellen. Intrazervikale Infusionen von PGF<sub>2</sub> (250 µg Dinoprost) und PGE<sub>2</sub> (250 µg Dinoprost) erbrachten keinen Einfluß auf den Ovulationszeitpunkt (Südhoff, 1994; Waberski, 1994; 1996).

Ein Vergleich des Intervalls Infusion–Ovulation am ipsi- und kontralateralen Ovar (Differenz  $y = 8,4$ ) konnte erste Hinweise auf einen lokalen, d.h. zwischen Uterus und Ovar gerichteten Effekt geben (Waberski et al., 1995b). Die Autoren stellten dadurch die Annahme in Frage, daß PGF und möglicherweise andere unter Seminalplasmaeinfluß im Uterus gebildete Substanzen über den klassischen Counter-Current-Blutweg zum Ovar gelangen. In Auswertung der Ergebnisse scheint es notwendig, daß die aktiven Substanzen Kontakt zur Uterusspitze und zur uterotubalen Verbindung erhalten, wo ein ausgeprägtes Lymphsystem als möglicher Übertragungsweg ausgebildet ist. Eine unmittelbare Passage über den Eileiter ist nicht von Bedeutung. Waberski (1996) formulierte daraufhin eine die Resultate der vorherigen Arbeiten in Frage stellende Vermutung, wonach die ovulationsfördernde Wirkung direkt durch Seminalplasmakomponenten vermittelt wird und der Uterus als Syntheseorgan ovulationsinduzierender Substanzen keine Rolle spielt.

#### **2.1.2.4 Einfluß des Seminalplasmas auf die Spermien**

Säugetierspermien werden in der Cauda epididymidis in einem Ruhezustand aufbewahrt und werden motil, wenn sie bei der Ejakulation mit Seminalplasma zusammenkommen. Verschiedene Zucker wurden auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Spermien vom Zustand der Ruhe in die Bewegung zu versetzen. Dabei erwiesen sich Monosaccharide als gute Motilitätsinitiatoren, wogegen Trisaccharide die Aktivität der Spermien reduzierten (Tso et al., 1987). Mann u. Lutwak-Mann (1981) führten die Motilitätsstimulation auf das Vorhandensein spezifisch aktiver Substanzen zurück, wobei sie zwei Gruppen unterschieden; die katalytisch aktiven (Ionen, Nucleotide) und die Nährstoffe (Fructose, Milchsäure). Im Seminalplasma des Bullen existiert zudem das Sperm Forward Motility Protein. Acott u. Hoskins (1978) schrieben ihm die Fähigkeit zu, die ineffektiven Bewegungen der Spermischwänze im Nebenhoden in eine vorwärtsgerichtete Bewegungsart der ejakulierten Samenzellen umzuwandeln.

Ein deutlicher Einfluß auf die Spermienmotilität wurde auch für Eberseminalplasma bewiesen. Dieser erwies sich als konzentrationsabhängig und eberspezifisch. Tso u. Lee (1980) zeigten, daß durch viermaliges Waschen in Tris-HCl immotil gewordene Spermien nach Zugabe von Seminalplasma ihre Vorwärtsbeweglichkeit zurückerlangten. Dieser Effekt setzte bereits bei 0,1 % der originären Seminalplasmakonzentration im Puffer ein. Die volle Wiederherstellung

der ursprünglichen Motilität wurde aber erst bei 10 % erreicht. Zudem wiesen die Autoren nach, daß die dafür verantwortlichen Komponenten des Seminalplasmas kälteresistent und hitzelabil sind, Eigenschaften, die auch Proteine aufweisen.

Gleichgerichtete Beobachtungen gibt es auch bei anderen Spezies. Nach Waschen und Resuspendieren in Puffer immotil gewordene Spermien des Bullen wurden nach Zugabe von Seminalplasma wieder aktiviert. Jedoch stellten Baas et al. (1983) fest, daß die Dauer des Erhalts der Motilität abnahm, je mehr Seminalplasma den Spermien zugesetzt wurde. Sie schlußfolgerten, daß Seminalplasma neben motilitätswiederherstellenden Faktoren auch solche enthält, die zur permanenten Inaktivierung führen.

Den Einfluß von Seminalplasma auf Motilität und Akrosomenintegrität bei der Gefrierkonservierung von Pferdesamen untersuchten Ahlemeyer et al. (1991). Sie verarbeiteten Proben, die 5 %, 10 % oder 15 % Seminalplasma enthielten, sowie sechs Ejakulate, denen nach der Zentrifugation 98 % des Flüssigkeitsüberstandes abgesaugt wurden. Hinsichtlich der Akrosomenintegrität gab es keine Unterschiede. Die Auftaumotilität nahm jedoch mit zunehmendem Seminalplasmaanteil signifikant ab. Auch das Absaugen des gesamten Flüssigkeitüberstandes wirkte sich tendentiell ähnlich reduzierend auf die Bewegungsaktivität der Samenzelle aus wie der Verbleib von 10 oder 15 % Seminalplasma. Braun et al. (1994) untersuchten den Einfluß von Seminalplasma auf die Motilität von epididymalen und ejakulierten Spermien des Hengstes während der Flüssigkonservierung. Von sechs Vatertieren wurden die Spermien aus dem Nebenhodenschwanz durch Spülung mit Seminalplasma bzw. Magermilch gewonnen. Vier Ejakulate dreier Hengste wurden nach zehn Minuten verdünnt, bei vier weiteren Ejakulaten dieser Hengste wurde schon in das Auffanggefäß Verdünner gegeben. Die acht Samenproben wurden zentrifugiert und mit Magermilch-Verdünner resuspendiert, der 0 %, 5 % oder 25 % Seminalplasma enthielt. Bei 5°C erfolgte eine Lagerung bis 48 Stunden. Nebenhodenspermien, die mit Seminalplasma gespült wurden, zeigten vor und nach der Zentrifugation eine signifikant bessere Motilität. Nach 24 und 48 Stunden hatte das Spülmedium keinen Einfluß mehr. Samenproben mit 25 % Seminalplasma erbrachten durchweg bessere Motilitätsparameter. Die Autoren sprechen dem Seminalplasma des Hengstes neben motilitätsfördernden aber auch motilitätshemmende Eigenschaften zu.

Untermauern konnten diese Ergebnisse Rommel et al. (1995), welche bei einem Anteil von 25 % Seminalplasma im Verdünner eine Erhöhung der Geschwindigkeit der Vorwärtsbewegung feststellten. Zudem konnten sie auch unterschiedliche Wirkungen auf die Motilität nach Zugabe homo- bzw. heterologen Hengstseminalplasmas feststellen. Gleiches wurde von Singer et al. (1989) und Magnus et al. (1991) für das Seminalplasma des Menschen postuliert. Interessan-

terweise haben die verschiedenen Fraktionen des Ejakulates des Mannes auch unterschiedliche Effekte auf die Motilität von Spermien. Sekrete der Prostata wirken stimulierend, Samenblasenflüssigkeit besitzt hingegen eine oder mehrere Fraktionen, die die Spermienmotilität unterdrücken (Lindholmer, 1974). Durch chromatographische und immunologische Untersuchungen konnten motilitätsfördernde und -hemmende Komponenten im humanen Seminalplasma gefunden werden (Bavister, 1975; Luterman et al., 1991; Robert u. Gagnon, 1994). Aus der Samenblasendrüsensflüssigkeit isolierten Robert u. Gagnon (1994) den Sperm-motility-inhibitor (SPMI). Der Level seiner Aktivität in dieser Flüssigkeit ist 13,6 mal höher als im Seminalplasma (Luterman et al., 1991). Hierin begründet sich die motilitätshemmende Wirkung der Sekrete der Samenblasendrüse. Beim Schwein fanden Jeng et al. (1993) die Motilitätsinhibitoren SMI-1 und SMI-2 mit einem Molekulargewicht von ca. 15.000. Beide senkten den Anteil motiler Spermien dosisabhängig.

Wicke u. Stähr (1992; 1993) stellten in ihren Versuchen fest, daß der motilitätsbeeinflussende Effekt des Seminalplasmas verschiedener Eber nicht gleich ist. Mit Hilfe der computerassistierten Motilitätsanalyse (CASA) beobachteten sie den Einfluß homologen und heterologen Seminalplasmas auf die Spermienbeweglichkeit, die Bewegungsformen und die Geschwindigkeiten der Samenzellen. Dabei kamen ausgewählte Ejakulate von Ebern mit guter bzw. schlechter Motilität zum Einsatz. Der Prozentanteil motiler Spermien konnte bei den Ejakulaten mit schlechter Motilität durch Zugabe von Seminalplasma aus Ejakulaten mit guter Motilität zum Teil signifikant verbessert werden. Bei einigen Kombinationen war sogar eine Verdopplung des Anteils motiler Spermien festzustellen. Wurde den Spermien des „guten“ Ebers das Seminalplasma des „schlechten“ zugefügt, verringerte sich die Beweglichkeit dieser. Hierbei war der Effekt aber weniger prägnant, als bei heterologem Seminalplasmazusatz zu den Samenzellen des „schlechten“ Ebers. In einem anderen Versuch (Wicke u. Stähr, 1993) wurden vierzehn Ejakulate entweder mit Seminalplasma (Variante I) oder mit dem Verdüner SCHÖNOW I (Variante II) versetzt. Zwischen beiden Varianten ergaben sich signifikante Unterschiede beim Anteil motiler (I = 52,3 (? 19,2); II = 6,4 (? 12,5)) und linear beweglicher Spermien (I = 33,5 (? 14,7); II = 12,5 (? 12,5)). Seminalplasma erwies sich in diesen Versuchen zum Teil als ausgesprochen motilitätsfördernd, wobei eberspezifische Effekte deutlich zutage traten. Auch in den Versuchen von Nehring et al. (1994) konnte sich heterologes Seminalplasma im Vergleich zu homologem auf den Anteil motiler Spermien und deren Geschwindigkeit unterschiedlich auswirken. Die Effekte reichen von stark hemmend bis stark steigernd. Verbesserungen konnten nur erzielt werden bei Kombinationen von Spermaproben mit

schlechten Motilitätswerten und Seminalplasma aus Ejakulaten mit hohen Motilitätswerten. Die deutlichsten Differenzen zeigten sich bei der Geschwindigkeit linear beweglicher Spermien.

Man kann nun die Frage aufwerfen, ob nicht die Zugabe von Seminalplasma aus einem Ejakulat mit guten Motilitätswerten zu einem Ejakulat mit schlechten Spermienmotilitätswerten dessen Befruchtungskompetenz erhöhen könnte (Stähr, 1995). Zwar spielen im weiblichen Genitale für die Samenzelle vorwiegend passive Transportmechanismen eine Rolle, jedoch ist innerhalb des Eileiters und bei der Durchdringung der Eizellen eine aktive Bewegung unbedingt erforderlich (Stähr u. Nehring, 1997).

Was nun für das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Kombinationen aus Spermien und Seminalplasma verantwortlich ist, bleibt noch spekulativ. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang spezielle fördernde Komponenten im Seminalplasma, die bei den verschiedenen Vartieren in qualitativer und quantitativer Hinsicht Unterschiede zeigen könnten. Diese Annahme wurde ursächlich auch in Beziehung zu den bei Mischsperma beobachteten Effekten gesetzt (Nehring et al., 1994).

Heydorn u. Pauffler (1976) vermuteten in diesem Zusammenhang Interaktionen zwischen den Spermien, den Spermien und dem Seminalplasma sowie dem Seminalplasma der beteiligten Vartiere, die möglicherweise durch bestimmte Förderungs- oder Hemmfaktoren ausgelöst werden und die Überlegenheit von Mischsperma gegenüber Reinsperma bedingen. In einem Besamungsversuch wurden 1535 Sauen mit Misch- bzw. Reinsperma inseminiert. Von den 862 mit Reinsperma besamten Sauen ferkelten 58,1 % ab und erbrachten eine durchschnittliche Wurfgröße von 9,9 Ferkeln. Signifikant höher war mit 65,1 % die Abferkelrate bei den mit Mischsperma inseminierten Tieren. Die mittlere Wurfgröße dieser Gruppe betrug 10,1 Ferkel. Bei 23 Kombinationen übertrafen in 19 Fällen die Besamungsergebnisse von Mischsperma die von beiden (10 Fälle) oder zumindest einer Reinspermabesamung. In einem ähnlichen Versuch von Heydorn u. Hobein (1977) mit 3179 Besamungen wurde in der Gruppe der mit Mischsperma besamten Sauen eine Trächtigkeitsrate von 64,9 %, in der Reinspermagruppe von 59,4 % erreicht. Die Wurfgrößen betragen 10,03 bzw. 9,68 Ferkel.

Wechselwirkungen zwischen den Samenkomponenten sowie eine Abhängigkeit der Befruchtungsleistung einer Spermakomponente von der anderen bewiesen Heydorn et al. (1977) sowie Seidl u. Heydorn (1978). Die Anteile der Ferkel jeweils eines Vartieres innerhalb eines Wurfes aus Mischspermabesamung erbrachten zum Teil erhebliche Unterschiede. So stammten nach Besamung mit der Kombination B + C 92,5 % der Ferkel von Vater B und nur 7,5 % von C. Der Frage folgend, ob B selektiv gefördert oder C selektiv gehemmt wurde, stellten Seidl u.

Heydorn (1978) Samenchargen jeweils aus dem Sperma des einen Ebers und dem Seminalplasma des anderen her und beobachteten am ersten Tag an den Spermien von C zu 61 % flockige Anlagerungen an den Schwänzen, an den Spermien von B nur zu 12 %; am zweiten Tag an den Spermien von C zu 69 %, an B zu 7 %. Sie vermuteten Reaktionen von individualspezifischen Faktoren der Spermien von C mit korrespondierenden Faktoren des Plasmas von B; Vorgänge, die in den Bereich der Immunologie hineinragen. Die Erhöhung von Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen beim Einsatz von Mischsperma bedarf also mit hoher Wahrscheinlichkeit gezielter Eberkombinationen. Bestätigt wurde letzteres auch durch Arbeiten von Conrad u. Zeuner (1978).

Keine Unterschiede zwischen den Befruchtungsergebnissen nach Besamungen mit Rein-, Di- oder Trisperma fand Grooten (1988) in einem groß angelegten Feldversuch der Schweineforschungsgesellschaft „Nieuw Dalland“. Nur hinsichtlich der Wurfgröße waren positive Einflüsse durch Trispermaeinsatz festzustellen.

Bortolozzo (1992) konnte nach Mischspermabesamungen Befruchtungsraten von 83 % erreichen, womit diese signifikant höher waren als die im Durchschnitt mit den Einzelejakulaten erreichten (74,4 %). Anhand der Anzahl akzessorischer Spermien in der Zona pellucida ließen sich ebenfalls zahlenmäßige Unterschiede zwischen den Gruppen zugunsten des Mischspermas erkennen.

Wegmann (1990) stellte eine Verbesserung spermatologischer Parameter nach Einfrieren bei Mischsperma gegenüber Reinsperma fest. Die Motilität bei Trisperma war in 75 % der Fälle höher als das jeweilige Mittel der drei Einzelejakulate, was bezüglich der Kopfkappenintegrität für 96 % der Fälle galt.

Der Untersuchung des Einflusses des Seminalplasmaaustausches bei Bullen auf verschiedene Spermienparameter widmete Vitt (1996) ihre Arbeit. Dabei wurde vor der Gefrierkonservierung von acht Ejakulaten dreier Vatertiere mit schlechten Befruchtungsergebnissen das eigene Seminalplasma durch Zentrifugation entfernt und daraus drei Varianten:

1. mit eigenem Seminalplasma,
2. mit fremdem Seminalplasma von Bullen mit besserer NRR und
3. ohne Seminalplasma, nur mit Verdünner hergestellt.

Nach dem Auftauen wurden die Proben hinsichtlich des Prozentanteils motiler und lebender Spermien und des Zustands des akrosomalen Randes untersucht. Bei allen drei Bullen zeigte sich bei keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den Varianten mit eigenem Seminalplasma und der Variante mit Seminalplasma von Bullen mit besseren Befruchtungsleistungen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Variante ohne Seminal-

plasma und den Varianten mit Seminalplasma ergab sich im Anteil motiler und lebender Spermien in der Swim-up-Probe, in der durch Heparin induzierbaren Akrosomenreaktion (AR) und auch in der absoluten Anzahl an AR. Der Seminalplasmaaustausch als eine Möglichkeit zur Aufbesserung der Spermaproben fand in diesen Ergebnissen keine Bestätigung. Die Autorin erachtet die Zeit des Kontaktes der Spermien mit dem eigenen Seminalplasma bis zur Zentrifugation als ausreichend, um die Rezeptoren auf der Oberfläche der Samenzellen mit eigenen Proteinen zu besetzen. Ein Hinzufügen von fremden Seminalplasma mit qualitativ unterschiedlichen Bestandteilen könnte dann wirkungslos sein.

#### **2.1.2.5 Einfluß des Seminalplasmas auf Kapazitation, Akrosomenreaktion, Erkennung und Bindung der Eizelle**

Der Kapazitationsprozeß ist die Voraussetzung für die Hyperaktivierung der Spermien, die Interaktionen mit der Eizelle und die Akrosomenreaktion. Im Verlaufe dessen werden auf der Oberfläche der Samenzelle Rezeptoren freigelegt, die in die Vorgänge der Bindung zwischen Spermium und Eizelle involviert sind (Nieschlag u. Behre, 1996). Mudra u. Busch (1991) geben für diesen Reifungsprozeß beim Eber eine Dauer von vier bis sechs Stunden an. Der Ablauf der Kapazitation muß zeitlich fein reguliert sein, da zu früh kapazitierte Spermien vorzeitig Alterungserscheinungen zeigen und, insbesondere bei langen Abständen zwischen Besamung und Ovulation, für eine Befruchtung der Eizelle nicht mehr zur Verfügung stehen. Entscheidenden Anteil an dieser Abstimmung haben im Seminalplasma enthaltene sogenannte „Dekapazitations- und Kapazitationsfaktoren“, die eine vorschnelle Reifung verhindern bzw. den Prozeß stimulieren (Waberski, 1994). Mit diesen Seminalplasmabestandteilen kommen die Samenzellen im Nebenhoden oder erst zum Zeitpunkt der Ejakulation in Berührung, und unter ihrem „Schutzmantel“ werden sie auf dem Transportweg durch den Uterus vor Reaktionen bewahrt, die erst zu einem späteren Zeitpunkt im Eileiter ablaufen sollen (Nieschlag u. Behre, 1996).

Bereits Chang (1957) und Bedford u. Chang (1962) erbrachten Beweise für die dekapazitierende Wirkung des Seminalplasmas. Aus dem Uterus gewonnene, bereits kapazitierte Kaninchenspermien konnten nach Mischen mit Seminalplasma wieder in den Zustand der Befruchtungsunfähigkeit zurückversetzt werden. Durch abermaliges Verbringen der Spermien in den weiblichen Genitaltrakt konnten diese wieder rekapazitieren. Bedford u. Chang (1962) schlußfolgerten aus der Tatsache, die Dekapazitationsfaktoren mit Hochgeschwindigkeitszentrifugation entfernen zu können, daß es sich dabei um große Moleküle handelt. Derartige Wirkstoffe konnten auch Dukelow et al. (1967) in Eberseminalplasma nachweisen.

Pursel (1983) verbrachte in Seminalplasma bzw. BTS aufgetaute Spermien durch operative Maßnahmen in den Eileiter von brünstigen Sauen. Wenn Seminalplasma als Resuspensionsmedium verwendet wurde, waren nach fünf Stunden nur 5 % der ovulierten Eizellen befruchtet, hingegen 45 %, wenn die Spermien in BTS aufgetaut worden sind. 24 Stunden nach Besamung war zwischen den beiden Gruppen mit Befruchtungsraten von 90 bzw. 81 % kein signifikanter Unterschied mehr vorhanden, was deutlich den kapazitationshemmenden Effekt von Seminalplasma zeigt. Sowohl Cholesterin (Davis, 1976) und Spermin, ein an die Spermienoberfläche bindendes Polyamin (Rubinstein u. Breitbart, 1991), führen zur Dekapazitation, entweder durch Einbau in die bzw. Blockade von Abbauprozessen in der Plasmamembran.

Mit in den Mittelpunkt des Interesses rückten in den letzten Jahren lectinähnliche Moleküle an der Oberfläche der Spermien. Ihre Identifizierung erwies sich als wichtig für das Verständnis des Mechanismus der speziesspezifischen Befruchtung (Töpfer-Petersen et al., 1994). Offensichtlich spielen die verschiedenen Proteine eine wesentliche Rolle in der komplizierten Kette der Ereignisse, die schließlich zur Kapazitation, Gametenerkennung und Spermien-Eizell-Bindung führen (Jonáková et al., 1991; Calvete et al., 1993; Calvete et al., 1994b; Töpfer-Petersen et al., 1994; Calvete et al., 1995a; Calvete et al., 1996). Ihre Kohlenhydratbindungsfähigkeit erlaubt den Kontakt zu den Glycoproteinen der Zona pellucida (ZP 1, 2 und 3) (Töpfer-Petersen et al., 1994) und leitet in die Initialphase der Fertilisation ein (Mahnaz und Töpfer-Petersen, 1995). Die Spermadhesine des Ebers sind Lectine mit einer Molekülmasse von 12 bis 14 (16) kDa (Töpfer-Petersen et al., 1993; Calvete et al., 1994b; Calvete et al., 1995a; Dostálová et al., 1995b). Sie bestehen aus 109 (111) bis 133 Aminosäuren (Calvete et al., 1993; Mahnaz u. Töpfer-Petersen, 1995) und werden in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, insbesondere in der Samenblasendrüse und im Rete testis synthetisiert und bilden einen wesentlichen Part des Proteinspektrums des Seminalplasmas. Im Zuge der Ejakulation erfolgt die Assoziation mit der Spermienoberfläche (Calvete et al., 1993; Dostálová et al., 1994a), worauf die gesamte Akrosomenkappe eingehüllt wird (Dostálová et al., 1995b).

Die Analyse des biologischen Ursprunges, der Lokalisation auf der Oberfläche, des Ligandenverhaltens, der Primärstruktur, der posttranslationalen Modifizierung und die quantitative Bestimmung der die Samenzellen überziehenden Spermadhesine in den verschiedenen Stadien des Lebens des Schweinespermiums, lassen darauf schließen, daß es sich um multifunktionelle Proteine handelt (Calvete et al., 1995a).

Nach der Ejakulation formen die Spermadhesine eine dicke Schicht auf dem Kopf des Spermiums (Dostálová et al., 1994b), die aus je 12 bis 66 Mio AQN 1-, AQN 2- und AQN 3-



Molekülen sowie 50 Mio AWN-Molekülen (Form 1 und 2) besteht (Calvete et al., 1995a). 90 % der AQN 3 und AWN 1 sind Proteine mit einer relativen Molekülmasse von über 50.000, die restlichen 10 % und AQN 1 und 2 sind niedermolekulare Proteine (Mr 16.000 bis 30.000) (Dostálová et al., 1995b).

Eine große Subpopulation der Spermadhesine ist locker mit der Oberfläche verbunden und fungiert als Dekapazitationsfaktoren (Dostálová et al., 1994b). So werden 60 % der absorbierten AQN 1, 2 und 3 nach drei Stunden In-vitro-Kapazitation wieder abgestreift. Die Menge an AWN 1 sinkt auf den Level, der auf Nebenhodenspermien zu finden ist, die AWN 2 Population ist völlig entfernt (Calvete et al., 1994b; 1995a). Die verbleibenden Spermadhesine, welche fest mit der Spermienoberfläche verbunden sind, spielen entweder eine Rolle als positive Kapazitationsfaktoren und/oder bei der Gametenerkennung und -bindung (Dostálová et al., 1994b).

AWN 1 ist ein 14 kDa-Molekül und wird im Rete testis und im Epithel der Samenblasendrüse synthetisiert. Es stellt das einzige Spermadhesin dar, welches auf der Oberfläche der Nebenhodenspermien lokalisiert werden kann, was wahrscheinlich wesentlich für den Kapazitationsvorgang ist (Calvete et al., 1994a; Dostálová et al., 1994b; Sinowatz et al., 1995). Die nach der Kapazitation auf der Oberfläche verbleibenden AWN 1-Epitope sind in der Lage, bestimmte Oligosaccharidketten der Zona pellucida der Oocyte (Gal ? ?1-3? Gal NAc-Sequenzen) zu erkennen und steuern dadurch die speziesspezifische Befruchtung (Dostálová et al., 1995a). Bei Rückgewinnung von Spermien aus der uterotubalen Verbindung wurden genannte Epitope auf der Oberfläche identifiziert (Töpfer-Petersen et al., 1995b).

AWN 2 unterscheidet sich von der ersten Form durch seine N-terminale Azetylierung (Sanz et al., 1992b). Es wird erst in der Flüssigkeit der Samenblasendrüse gefunden und anschließend an ejakulierte Spermien gebunden. Nach der Kapazitation ist es nicht mehr auf der Spermienoberfläche nachweisbar, so ist es wahrscheinlich, daß diese Isoform einen reinen Dekapazitationsfaktor darstellt (Dostálová et al., 1994b). Auf ähnlichem, aber nicht gleichem Wege, wirkt AQN 1 im Kapazitationsprozeß (Sanz et al., 1992a).

AQN 2 ist einzigartig in der Familie der porcinen Spermadhesine. Dieses Mitglied allein ist dafür bekannt, daß es glycosyliert ist und nur eine schwache Affinität zur Zona pellucida besitzt. Die AQN 2-Fraktion besteht aus zwei Glycoproteinen. Eine Komponente ist identisch mit dem PSP I, einem wichtigen porcinen Seminalplasmaprotein, die zweite Komponente ist eine glycosylierte Form des AQN 3. Die geringe Affinität zur Zona pellucida der glycosylierten Spermadhesine ist zurückzuführen auf Strukturänderungen im Polypeptid-Netzwerk (Calvete et al., 1993).

PSP II wurde von der nicht-heparinbindenden Fraktion des Seminalplasmas isoliert. Der PSP I/PSP II-Komplex ist aber nur locker an die Spermienoberfläche gebunden und scheint wie AWN 2 vollständig während der Kapazitation entfernt zu werden. Somit ist eine Bedeutung bei der Gameten-Interaktion unwahrscheinlich (Calvete et al., 1995b).

Weitere bedeutende Kapazitationsfaktoren sind die Acrosin-Inhibitoren. Ihr Ursprung liegt in den Samenblasendrüsen. Nach der Ejakulation werden sie an den vorderen Teil des Spermiums gebunden und schützen die spezifischen Zonabindungsstellen während der Uteruspassage. Mit dem Kapazitationvorgang werden sie vollständig abgelöst, worauf die Rezeptorstellen wieder frei werden und eine Bindung an die Zona pellucida der Oozyte möglich ist (Jonáková et al., 1992). Eine Schlüsselrolle in den frühen Stadien der Befruchtung spielt Proacrosin. Seine spezifische Zona pellucida-Bindungsstelle wird aus positiv geladenen Aminosäuren (Arginin, Histidin, Lysin) geformt und kontaktiert mit bestimmten Glycoproteinen der Zona pellucida (Jansen et al., 1995). Jenneckens et al. (1995) konnten zeigen, daß nach Austausch nur einer Aminosäure an der Bindungsstelle die Affinität zu Zona pellucida-Glycoproteinen drastisch sinkt. Eberproacrosin besitzt lytische Eigenschaften und leitet die Zonapenetration ein (Jansen et al., 1995). Trotz heftiger Bewegungen des Spermiums entwickelt sich ein inniger Kontakt zwischen den Galactosylgruppen des Zona pellucida-Proteins ZP 3 und den Rezeptoren des Spermiums. Für die Interaktionen sind eine Reihe von Komponenten auf der Oberfläche der Samenzelle (Spermadhesine und Kohlenhydratgruppen der Spermienmembran) verantwortlich (Calvete et al., 1992). Das porcine ZP 3 hat ein Molekulargewicht von 55 kDa und enthält zwei Polypeptid-Untereinheiten (? und ?). Beide sind in den Bindungsprozeß involviert (Töpfer-Petersen et al., 1993; Blase et al., 1995). Interaktionen an den Kontaktstellen zwischen Spermium und Zona lösen die Exozytose des Akrosoms aus (Wassarman, 1992).

Für die Akrosomenreaktion gibt es, wie für die Kapazitation, fördernde und hemmende Faktoren. Da eine AR nur in Gegenwart von Kalzium-Ionen stattfinden kann, wogegen die Kapazitation auch in kalziumfreien Medien vor sich geht (Schülke, 1991), können Substanzen, wie z.B. Caltrin (calcium transport inhibitor) durch Blockade der Ca-Aufnahme die AR hemmen (Rufo et al., 1982). Aus dem Seminalplasma von Kaninchen isolierten Eng u. Oliphant (1978) eine Komponente, welche infolge von Enzymhemmung die Bindung der Samenzelle an die Zona pellucida und somit die Akrosomenreaktion verhindert. Sie nannten dieses Glycoprotein Acrosome stabilizing Factor (ASF). Fördernden Einfluß besitzen, z.B., heparinbindende Proteine (Sanz et al., 1993) und eine von den Samenblasendrüsen sezernierte Arylsulfatase (Gadalla et al., 1993). Nach Vollendung der Akrosomenreaktion induzieren Bestandteile der Zona pellucida die Umwandlung von Proacrosin zu Acrosin, einem biologisch aktiven Enzym. Somit

wirkt die Zona pellucida regulierend auf das exakte Timing der Befruchtungseignisse (Töpfer-Petersen u. Cechova, 1990). Acrosin funktioniert dann als ein Bindungsglied zwischen akrosomenreagiertem Spermium und Zona pellucida. Einsetzende lokale Verdauungsprozesse bewirken dann eine Lösung der Bindungsplätze zwischen Akrosom und Zona und lassen das Spermium tiefer eindringen bis hin zur kompletten Penetration (Töpfer-Petersen et al., 1990). Wechselwirkungen zwischen Proteinen der Plasmamembran der Samenzelle und der Eizelle führen zur Zell-Zell-Fusion (Calvete u. Töpfer-Petersen, 1995).

#### **2.1.2.6 Bedeutung des Seminalplasmas bei der Konservierung**

Über den Einfluß von Seminalplasma bei der Spermakonservierung ist bislang wenig bekannt. Durch die hohe Ausverdünnung, die bei der Flüssigkonservierung üblich ist, wird der Seminalplasmaanteil, der in einer Besamungsportion vorhanden ist, stark minimiert. Dadurch sind den Seminalplasmawirkungen mit Sicherheit erhebliche Grenzen gesetzt. Waberski (1994) stellte sogar die Hypothese auf, daß vielleicht nicht die reduzierte Spermienzahl, sondern der verringerte Seminalplasmaanteil der limitierende Faktor der Ejakulatverdünnung ist. Zumindest bildet das Plasma eine direkt verfügbare Energiequelle für die Spermien (White, 1980). Auch lassen die Daten über die Zusammensetzung dieses Mediums einen Vergleich mit Verdünnern zu (Schülke, 1991). Gesichert ist jedoch auch, daß die Sekrete der Samenblasendrüse anregend auf die Stoffwechselaktivität der Spermien wirken und dadurch die Konservierbarkeit beeinträchtigen (Stähr, 1995). Da der Anteil dieser Flüssigkeit am gesamten Seminalplasma 30 bis 50 % beträgt, ist dessen Einfluß kaum zu vernachlässigen (Gadalla et al., 1993).

Die Literatur läßt auf diesem Gebiet vorhandene Wissenslücken erkennen. Bestimmte Seminalplasmakomponenten sind hinsichtlich ihrer Wirkungen auf das Spermienmotilitätsverhalten und die Kapazitation sowie Akrosomenreaktion aber im Zusammenhang mit dem Bovinen Serumalbumin (BSA) zu betrachten (Hoppe u. Whitten, 1974; Lindholmer, 1974; Aonuma et al., 1982; Harrison et al., 1982; Go u. Wolf, 1985; Schaap, 1987). Dabei ist hinlänglich bekannt, daß der Einsatz von BSA zur Verbesserung der Eberspermaflüssigkonservierung bisher zweifelsohne am erfolgreichsten war (Stähr u. Nehring, 1997). BSA wird aus Rinderblut gewonnen (Peters, 1975) und besitzt eine Domänenstruktur mit drei unabhängigen Untereinheiten, die sich jeweils aus zwei Subdomänen zusammensetzen (Brown, 1977). Dem BSA wird eine motilitätsstimulierende und -konservierende Wirkung zugeschrieben, die nicht an die Makromoleküleigenschaften gebunden sein soll. Vielmehr spricht man von einem spezifischen Effekt des BSA (Lindholmer u. Eliasson, 1974; Shannon et al., 1983; Waberski, 1988; Dirksen, 1991). BSA hat die Fähigkeit, die bei hohen Verdünnungsgraden auftretenden Motilitätsverluste weit-

gehend zu verhindern (Schaap, 1987). Seine starke motilitätsinitiierende Wirkung wiesen Baas et al. (1983) nach. Aufgrund des Vergleiches des BSA mit vitalen Seminalplasmakomponenten (Lindholmer, 1974; Harrison et al., 1982; Schaap, 1987) liegt der Gedanke nahe, nach Identifizierung aktiver Substrate im Seminalplasma des Ebers, diese Bestandteile zu synthetisieren und dem flüssigkonservierten Sperma zuzusetzen (Waberski, 1996).

Mehr Kenntnis zur Bedeutung des Seminalplasmas gibt es bei der Gefrierkonservierung. Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen beeinflussen die Kälteschockempfindlichkeit der Eberspermien, was ein Problem bei dieser Konservierungsform ist. Eine Steigerung der Kälteschockresistenz der Spermien der spermienreichen Fraktion läßt sich durch zwei- bis fünfständige Inkubation bei Zimmertemperatur in seminalplasmahaltigem Milieu erreichen (Pursel et al., 1972). Diese als „Holding“ bezeichnete Inkubationszeit hat vermutlich den Mechanismus eines Coating-Effektes an der Samenzelloberfläche, in dessen Verlauf sich Proteinbestandteile des Seminalplasmas an die Oberfläche der Spermien anlagern (Einarsson, 1971; Pavelko u. Carbo, 1976). Dies sorgt für einen zusätzlichen Schutz der Akrosomen durch Komponenten des Seminalplasmas (Pursel et al., 1973), eine Reduktion der Auswirkungen des Kälteschocks auf des Motilitätsverhalten war jedoch nicht ersichtlich. Schmidt et al. (1982) testeten an 18 Ejakulaten Coating-Zeiten von 15, 60, 90 und 120 Minuten. Anschließend wurde das Sperma vorverdünnt und in einer modifizierten Form des Westendorf-Verfahrens (Westendorf et al., 1975) weiterverarbeitet. Nach dem Auftauen zeigte sich im Thermoresistenztest bei 40°C ein mit zunehmender Coatingzeit deutlicher Abfall der Spermienüberlebensrate, so daß ein unmittelbarer positiver Einfluß einer längeren Coatingzeit nicht erkennbar war. Das Sperma blieb aber nach der Vorverdünnung noch vier Stunden während der Abkühlphase in Kontakt mit seinem Seminalplasma, somit konnten sich auch in dieser Zeit Proteinbestandteile an die Oberfläche der Spermien anlagern.

Eine Anwesenheit von Seminalplasma während der gesamten Haltezeit hält auch Fazano (1986) nicht für unbedingt erforderlich. Das frühzeitige Entfernen durch Zentrifugation wirkte sich nicht negativ auf Motilität und Akrosomintegrität nach dem Auftauen aus. Der Autor räumte sogar ein, daß ein möglicher positiver Effekt der frühen Abtrennung des Seminalplasmas durch die doppelte Zentrifugation eventuell kompensiert wurde.

Moore et al. (1976) verbinden die Abkühlung der Spermien in Seminalplasma mit einem negativen Effekt in Form von auftretenden Membranschäden. Dagegen konnten Romeny et al. (1974) keine erwähnenswerten schädigenden Einflüsse des Coating-Effektes feststellen. Eine erst nach zweistündiger Haltezeit vorgenommene Verdünnung führte zu einer geringen Steigerung des Anteils an Spermien mit normaler Kopfkappe bei gleichzeitiger Herabsetzung des

Prozentanteiles beweglicher Spermien. Paquignon (1985) erachtet das Fehlen oder Vorhandensein des Seminalplasmas während des Gefrierprozesses als unerheblich für die Auftauqualität. Eine Entfernung ist jedoch aus technologischen Gesichtspunkten vorteilhaft, da durch das geringe Volumen Einfrier-, Lager- und Auftauprozesse erleichtert werden.

Wiederum von Interesse war Seminalplasma als Auftau- bzw. Resuspensionsmedium. Carbo u. Einarsson (1971) erreichten für Tiefgefriersperma eine sehr hohe Trächtigkeitsrate von 79 %, nachdem sie 11 Sauen mit in Seminalplasma aufgetauten Pellets besamt hatten. Eine Ursache dafür sahen Einarsson u. Viring (1973b) in der Steigerung der Überlebenszeit der Samenzellen im weiblichen Genitale, infolge des Schutzes der Spermien durch Anlagerung von Seminalplasmaproteinen an die Oberfläche. Sie inseminierten 10 Mrd. tiefgefrorene Spermien und untersuchten die Verteilung nach ein bis vier Stunden im Genitaltrakt. Dabei fanden sie deutlich mehr Spermien nach vier Stunden im Eileiter, wenn diese in Seminalplasma aufgetaut worden waren.

Bei Versuchen von Romeny et al. (1974) wurden als Auftaulösung Magermilch, Seminalplasma-Verdünner (30 %ig) und Milch-Seminalplasma-Verdünner verwendet. Gegenüber den Kontrollen waren die Anteile motiler und morphologisch normaler Spermien unmittelbar nach dem Auftauen in den Medien mit biologischen Inhaltsstoffen signifikant erhöht, zum Teil verdoppelt. Die Überlegenheit von seminalplasmahaltigen Auftaumedien beschäftigte auch Westendorf et al. (1975), Larsson u. Einarsson (1976a) und Andrade Moura (1988).

Der Frage, ob nach genereller intrazervikaler Applikation von Seminalplasma vor der Besamung ein zusätzlicher befruchtungsfördernder Effekt durch Seminalplasma als Resuspensionsmedium erreichbar ist, widmete sich Stampa (1989). Die Hälfte der Sauen wurde mit in rein saliner Lösung, die andere Hälfte mit in 30 % Seminalplasma enthaltender Lösung resuspendierten Spermien besamt. Hinsichtlich Spermientransport und Trächtigkeitsrate und Fetenzahl am 25. bis 30. Tag p.ins. gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen seminalplasmafreien und -haltigen Medien. Stampa (1989) vermutet, daß Seminalplasma weniger die Spermieigenschaften an sich beeinflußt, vielmehr denn das Ovulationsgeschehen.

### **3 Eigene Untersuchungen**

#### **3.1 Aufgabenstellung**

Aus der Literaturübersicht wird deutlich, daß das Seminalplasma des Ebers vielfältige Wirkungen auf die Spermienzellen und das weibliche Genitale ausübt. Schlußfolgernd daraus sollte diesem Medium beim Verdünnungsprozeß in der Eberspermaproduktion mehr Beachtung geschenkt werden.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, weitere Faktoren im Rahmen der Wirkungen des Seminalplasmas auf die Spermienmotilität und den Befruchtungsvorgang zu prüfen, um den Wissensstand über die Einflüsse des Eberseminalplasmas zu erweitern. Dabei sollte in dieser Arbeit der Einfluß des Seminalplasmas als Verdünnerzusatz eine besondere Rolle spielen. Es wird dazu untersucht, wie sich ein erhöhter Anteil Seminalplasma in konserviertem Ebersperma auf die Spermienmotilität *in vitro* sowie auf die Befruchtungsfähigkeit *in vivo* auswirkt. Besondere Berücksichtigung finden hierbei eberspezifische Aspekte.

Verschiedene Autoren (Tso u. Lee, 1980; Wicke u. Stähr, 1992, 1993; Nehring et al., 1994) zeigten schon, daß Seminalplasma die Spermienmotilität beeinflußt und dabei eberspezifische Effekte, die von stark hemmend bis stark steigernd reichten, existieren. Darauf aufbauend untersuchten wir, welche Wirkungen ein Zusatz von homologem bzw. heterologem Seminalplasma zu flüssigkonserviertem Sperma verschiedener Eber auf die Spermienmotilität im Thermo-resistenztest hat.

Aus den Erkenntnissen zur Spermienmotilitätsbeeinflussung und dem derzeitigen Wissen um den ovulationsvorverlegenden Effekt des Seminalplasmas (Brutgans, 1983; Peña Alfaro, 1988; Willmen, 1989; Lotz, 1990; Rabeler, 1990; Weitze et al., 1990a; Weitze et al., 1990b; Niemann, 1991; Süddhoff, 1994; Waberski, 1994; Waberski, 1995d) entstand die Frage, inwieweit sich ein homologer bzw. heterologer Seminalplasmazusatz zum flüssigkonservierten Sperma von guten bzw. schlechten Befruchtern auf die Befruchtungsergebnisse auswirken kann? Hierzu wurde ein Besamungsversuch mit 24 Jungsaugen durchgeführt, der zudem die Ermittlung des Progesteronprofils jeder Sau über 28 Tage hinweg enthielt, wodurch eventuelle Reaktionen des Tieres auf die Applikation des Seminalplasmas gezeigt werden sollten. Zur Schonung der Tiere erfolgte eine Bestimmung der P<sub>4</sub>- Progesteronausscheidung über den Kot.

Aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten ist es von Interesse, ob es zwischen mengenmäßig verschiedenen Seminalplasmaanteilen im Verdünner Unterschiede hinsichtlich der Wirkung auf die

Motilität flüssigkonservierter Spermien gibt, um Aussagen über den optimalen Anteil von Seminalplasma oder Bestandteilen dessen im Verdüner machen zu können. Zur Bearbeitung dieser Problematik wurden Halte- und Thermoresistenztests durchgeführt. Weiterführend wurde geprüft, wie sich der Zusatz eines bestimmten Seminalplasmaanteils zum Verdünnermedium auf die Befruchtungsergebnisse und die Spermienmotilität unter Praxisbedingungen auswirken kann und ob dabei eberspezifische Unterschiede existieren.

## 3.2 Material und Methode

### 3.2.1 Allgemeine Methodik

In diesem Abschnitt werden die Methoden erläutert, die in den verschiedenen Versuchen dieser Arbeit wiederkehrend angewendet wurden.

Die **Gewinnung von Sperma** erfolgte am Phantom mit Hilfe einer künstlichen Vagina mit Spermaauffangbeutel im Wärmedämmkörper. Das Ejakulat wurde anschließend zur Abtrennung des Bulbourethraldrüsensekretes durch eine dreifache Gazelage in einen vorgewärmten graduierten Meßzylinder filtriert. Daran schloß sich die Beurteilung hinsichtlich Aussehen, Volumen, Motilität, Konzentration und morphologisch abweichenden Spermienformen an. Zur Schätzung der Spermienkonzentration diente das Spermio-Densimeter nach Karras. Die Motilität wurde durch eine erfahrene Laborantin mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes bei 250 facher Vergrößerung ermittelt.

Flüssigkonservierte Spermaportionen wurden unabhängig vom verwendeten Verdünnermedium bei 17°C und Dunkelheit gelagert.

Zur **Seminalplasmagewinnung** wurde das Sperma 10 min lang bei 770 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand ist dekantiert und einer weiteren 10 minütigen Zentrifugation bei 3100 g ausgesetzt worden. Das danach überstehende Seminalplasma war nahezu spermienfrei. Es wurde dekantiert, in 100 ml-Plastikflaschen gefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Die Beurteilung des Spermienmotilitätsverhaltens in den unterschiedlich aufbereiteten Spermaportionen erfolgte nach einer Lagerungsdauer von 24 bzw. 72 Stunden im **Halte-** und/oder **Thermoresistenztest**. Dabei ist der Prozentanteil motiler Spermien von einer erfahrenen Laborantin ermittelt worden. Als motile Spermien werden vorwärts- und kreisbewegliche Spermien bezeichnet.

Für den Haltetest wurde aus bei 17°C gelagerten Spermaportionen mit einem Glasstab jeweils ein Tropfen des flüssigkonservierten Spermas entnommen und auf einen vorgewärmten Objektträger (40°C) gegeben. Nach Abdeckung durch ein vortemperiertes Deckgläschen (40°C) wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 250 facher Vergrößerung die Spermienmotilität beurteilt.



Für den Thermoresistenztest sind aus einer jeweiligen Probe 10 ml flüssigkonserviertes Sperma in ein Reagenzglas pipettiert worden, welches anschließend in ein temperiertes Wasserbad (40°C) gestellt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 5 min ist mit Hilfe eines Glasstabes jeweils zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 120, 180, 240 und 300 min nach Ende der Inkubationszeit nach Aufrühren des flüssigkonservierten Spermas ein Tropfen entnommen und auf einen vor-temperierten Objektträger (40°C) gegeben worden. Der Tropfen wurde mit einem vorgewärmten Deckgläschen (40°C) abgedeckt. Anschließend erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskopes bei 250 facher Vergrößerung die Beurteilung durch Ermittlung des Prozentanteils motiler Spermien.

Bei den zu den Versuchen verwendeten Sauen führten wir eine **Ovulationssynchronisation** durch. Sie wurden terminorientiert besamt. Zur Synchronisation der Ovulation der 24 Jungsauen erhielt jedes Tier über 15 Tage hinweg jeweils um 7<sup>00</sup> Uhr 20 mg Altrenogest (Regumate®) mit dem Futter verabreicht. 24 Stunden nach der letzten Verabreichung von Regumate® wurden 1000 I.E. PMSG (Prolosan®) intramuskulär injiziert. 79 Stunden danach erfolgte eine intramuskuläre Injektion von 500 I.E. HCG (Ovogest®). 24 Stunden nach der HCG-Applikation wurde die erste künstliche Besamung (KB I), 15 Stunden später die zweite künstliche Besamung (KB II) durchgeführt.

Die Ovulationssynchronisation der 196 Altsauen wurde folgendermaßen durchgeführt: 24 Stunden nach dem Absetzen der Ferkel sind jeder Sau 1000 IE PMSG (Prolosan®) intramuskulär appliziert worden. 58 Stunden nach der PMSG-Injektion wurden 50 µg D-Phe<sup>6</sup>-LHRH (Gonavet®) intramuskulär injiziert. Die künstlichen Besamungen der aller Altsauen führte ein Besamungstechniker durch. Die KB I erfolgte 24 Stunden, die KB II 42 Stunden nach der Applikation von Gonavet®.

### 3.2.2 Versuchsreihe I

Dieser Versuch besteht aus folgenden Abschnitten:

1. **Vorversuch** (Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung) zur Untersuchung der Wirkung eines Zusatzes von homologem bzw. heterologem Seminalplasma zu flüssigkonserviertem Sperma auf die Spermienmotilität
2. **Besamungsversuch** zur Feststellung der Wirkung eines homologen bzw. heterologen Seminalplasmazusatzes zum flüssigkonservierten Sperma von guten bzw. schlechten Befruchtern auf die Befruchtungsergebnisse
3. **P<sub>4</sub>-Progesteronbestimmung** zur Untersuchung der Existenz eines möglichen Zusammenhanges zwischen Seminalplasmazusatz zum Verdünnermedium und P<sub>4</sub>-Progesterongehalt im Kot der inseminierten Sau sowie der mit dieser Bestimmung einhergehenden Möglichkeiten, die Reaktionen der Sau auf eine Ovulationssynchronisation zu kontrollieren und Zyklus-anomalitäten zu erfassen

#### 3.2.2.1 Vorversuch

##### **Tiermaterial**

Bei den Ebern, die für die Untersuchungen mittels Thermoresistenztest genutzt wurden, handelte es sich um die Eber A und B aus dem Bestand des Instituts für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V.. Beide gehörten zur Rasse Deutsches Edelschwein und waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen zweieinhalb Jahre alt. Diese Eber wurden aufgrund von Mängeln im Exterieur nicht für die Zucht benutzt und waren aus dem Bestand einer Eberaufzuchtstation selektiert worden. Die Haltung der Eber erfolgte in Einzelbuchten. Für den Eber A war charakteristisch, daß seine Ejakulate stets einen Anteil motiler Spermien von 75 bis 85 % zeigten. Ejakulate des Ebers B wiesen Motilitätswerte zwischen 60 und 65 % auf.

##### **Versuchsdurchführung**

Von Eber A und B wurden sieben bzw. sechs Ejakulate gewonnen und anschließend geteilt. Eine Hälfte des jeweiligen Ejakulates wurde zur Seminalplasmagewinnung genutzt. Die zweite Hälfte des gewonnenen Ejakulates wurde mit dem Verdünner SCHÖNOW I versetzt, so daß 100 ml 6,0 Mrd. bewegliche Spermien enthielten. Nach 72-stündiger Lagerung dieser Sperm-

aportionen wurde Seminalplasma der Eber A und B bei 40°C im Wasserbad aufgetaut. Die Spermaportionen sind dreigeteilt und in drei Varianten nachverdünnt worden:

1. Nachverdünnung mit dem Verdüner SCHÖNOW II
2. Nachverdünnung mit homologem Seminalplasma
3. Nachverdünnung mit heterologem Seminalplasma

Die Spermienkonzentration betrug danach 2,0 Mrd. bewegliche Spermien pro 100 ml. Die jeweiligen Verdünnungsvarianten wurden anschließend in einem Thermoresistenztest untersucht.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Verdünners SCHÖNOW I und II  
(mod. nach Stähr und Nehring, 1997)

Bestandteile (g/l)	SCHÖNOW	
	I	II
Glucose	40,0	3,0
EDTA	2,0	
Natriumcitrat	3,7	18,0
Natriumhydrogencarbonat	1,2	2,1
Natriumchlorid		0,4
Cystein	0,05 <sup>1</sup>	

<sup>1</sup>Acetylcystein, außerdem Antibiotika

### **3.2.2.2 Besamungsversuch**

#### **Tiermaterial**

##### a) Eber

Bei den Besamungsebern und Seminalplasmaspender für den Besamungsversuch der Versuchsreihe I handelte es sich um zwei Pietraineber einer Besamungseberstation. Beide Eber waren zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns zwei Jahre alt. Ihre Haltung erfolgte in Einzelbuchten. Im routinemäßigen Arbeitsprozeß wurden die Eber wöchentlich zwei- bis dreimal abgesamt.

Der Eber F zeichnete sich durch besonders gute Befruchtungsergebnisse (FI: 756; AFR: 77,8 %; IGF/W: 10,7) aus. Der Eber V hingegen wies schlechte Befruchtungsleistungen auf (FI: 280; AFR: 30,0 %; IGF/W: 10,2).

Die Auswahl der Eber vollzog sich nach einer in Anhang A beschriebenen Verfahrensweise.

##### b) Sauen

Zur Besamung waren 24 Jungsauen; Hybridsauen aus Wechselkreuzungen zwischen Deutschem Edelschwein und Deutscher Landrasse; mit einem Gewicht von 90 bis 110 kg von der Schweinezuchtanlage L. zur Verfügung gestellt worden. Die Sauen wurden zu zweit in Laufstallbuchten in den Stallgebäuden der Tierklinik für Fortpflanzung und Geburtshilfe der Freien Universität Berlin (Standort Mitte) untergebracht.

#### **Seminalplasmagewinnung und -verarbeitung**

Je vier Ejakulate der Vatertiere F und V dienten im Vorfeld des Besamungsversuches zur Seminalplasmagewinnung.

Alle gewonnenen Seminalplasmaportionen sind nochmals im Wasserbad bei 40°C aufgetaut worden, um durch Vermischen der Chargen eines jeden Ebers zwei Pools herzustellen, welche wiederum in Mengen von je 100 ml bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren (-20°C) wurden.

#### **Aufbereitung der Besamungsportionen**

Die Eber F und V wurden am Tage der KB I abgesamt. Zeitgleich tauten im Wasserbad (40°C) 300 ml Seminalplasma jedes Pools auf. Diese bildeten dann nach Vermischen mit jeweils 700 ml BTS die Verdünnermedien für die Spermakonservierung. Den filtrierten Ejakulaten wurde soviel Sperma entnommen, daß davon pro Eber zehn Besamungsportionen (100 ml) mit je 1,0 Mrd. beweglichen Spermien herstellbar waren. Diese Menge wurden nochmals halbiert, in ei-

nen vorgewärmten graduierten Meßzylinder pipettiert. Danach erfolgte die Verdünnung mit dem homologen bzw. dem heterologen Seminalplasma-BTS-Gemisch (30 % SP) ad 500 ml. Es entstanden vier Varianten (jeweils fünf 100 ml-Portionen) flüssigkonservierten Spermas:

1. Sperma des Ebers F + Seminalplasma, homolog (F/F)
2. Sperma des Ebers F + Seminalplasma, heterolog (F/V)
3. Sperma des Ebers V + Seminalplasma, heterolog (V/F)
4. Sperma des Ebers V + Seminalplasma, homolog (V/V)

Tabelle 4: Zusammensetzung von BTS (mod. nach Stähr und Nehring, 1997)

Bestandteile (g/l)	
Glucose	37,0
EDTA	1,25
Natriumcitrat	6,0
Natriumhydrogencarbonat	1,25
Kaliumchlorid	0,75

In den drei aufeinanderfolgenden Besamungsdurchgängen (mit je acht Sauen) wurden pro Variante zwei Sauen besamt. Jeweils eine Spermaportion diente als Reserve.

### **Gewinnung und Differenzierung der Embryonen- und Eizellen, Ermittlung des Befruchtungserfolges**

68 bis 96 Stunden nach KB I wurden die Embryonen bzw. Eizellen durch Spülung der Eileiter und Uterushornspitzen gewonnen. Die Embryonengewinnung erfolgte chirurgisch durch Laparotomie in der Linea alba mit folgenden Arbeitsschritten:

1. Prämedikation mit Stresnil (10 mg /kg Körpergewicht)
2. Legen eines Ohrvenenkatheters
3. Intravenöse Injektion von Thiopental (5 mg/kg Körpergewicht), bei Bedarf bis zu 1/3 nachinjiziert
4. Fixierung der Tiere in Rückenlage
5. Eröffnung der Bauchhöhle in der Linea alba zwischen den letzten beiden Zitzenpaaren auf ca. 15 cm, Unterbindung größerer Unterhautgefäße
6. Vorlagerung von Uterushornspitze, Eileiter und Eierstock einer Seite
7. Unterbindung größerer Gefäße, Absetzen von Eierstock, Eileiter und 15 cm Gebärmutterhornspitze (mit Darmklemme verschlossen)

8. exenterierte Organe bzw. -teile wurden in einer Nierenschale mit 37°C warmer NaCl-Lösung in das benachbarte Labor verbracht
9. mit Uterushornspitze, Eileiter und Eierstock der anderen Seite wurde wie unter (6) bis (8) beschrieben verfahren
10. Verschluß der Uterus- und Laparotomiewunde antibiotische Versorgung
11. im Labor erfolgte das Absetzen der Ovarien und nach gründlicher Spülung mit NaCl eine Beurteilung des Funktionszustandes und Zählung der Corpora lutea
12. Eileiter und Uterushornspitze wurden ebenfalls mit NaCl abgespült und vorsichtig abgetupft
13. Einführung einer Knopfkanüle in das Ostium abdominale tubae, Entfernung der Darmklemme vom abgesetzten Ende des Uterushornes und Fixation dieses mit Hilfe zweier Tuchklemmen über einer Petrischale
14. Injektion von 2 x 20 ml einer 39°C warmen, phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) durch die Knopfkanüle, Rückgewinnung der Spülflüssigkeit unter leichter Massage des Eileiters und des Uterushornes in zwei Petrischalen bei Vermeidung von Blutbeimischung.

Tabelle 5: Zusammensetzung der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) (in mg)

NaCl	8000
Cl	200
MgCl <sub>2</sub>	100
CaCl <sub>2</sub>	100
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1000
Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	150
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200
Glucose	1000
Na-Pyruvat	36
Na-Penicillin C	20
Streptomycin	40
Aqua bidest	ad 1000 ml

Unmittelbar nach der Spülung kamen die aufgefangenen Embryonen/Eizellen unter einem Stereomikroskop bei 25-60 facher Vergrößerung zur Untersuchung. Beurteilt wurde die Anzahl der gefundenen Eizellen und Embryonen sowie deren Teilungsstadien und Integrität. Eizellen im Einblastomeren-Stadium oder mit Fragmentation galten als unbefruchtet. Embryonen, die im Vergleich zu den übrigen eine retardierte Entwicklung oder Anzeichen einer Degeneration der Blastomeren bzw. Alterationen der Zona pellucida aufwiesen, wurden als anomal dekla-

riert. Für die Ermittlung des Befruchtungserfolges kamen lediglich die als normal bezeichneten Embryonen in Betracht, die nach den von Andrade Moura (1988) zusammengefaßten Kriterien beurteilt wurden:

1. gleichmäßig perivitelliner Raum und gleichmäßig verteilte Blastomeren (Hancock, 1961; Hunter, 1974; Niemann, 1987; Peña Alfaro, 1988; Andrade Moura, 1988),
2. Anwesenheit akzessorischer Spermien in der Zona pellucida (Polge, 1982; Niemann, 1987; Peña Alfaro, 1988; Andrade Moura, 1988),
3. Entwicklungsstadien entsprechend der Zeit zwischen Besamung und Spülung (Hunter, 1974; Peña Alfaro, 1988).

Als Befruchtungsrate wurde danach der Anteil normal entwickelter Embryonen an der Gesamtzahl gefundener Eizellen und Embryonen bezeichnet.

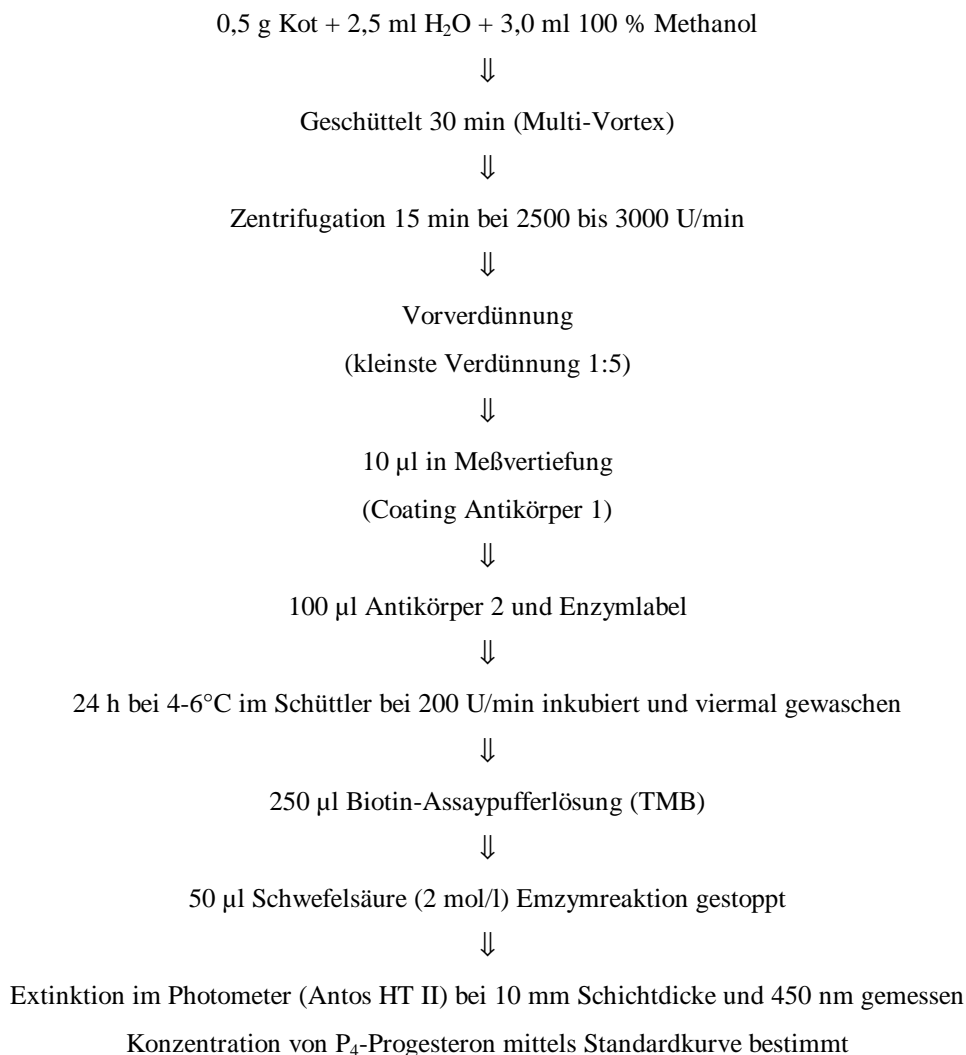
### 3.2.2.3 Progesterongehalt im Kot

Von den 24 Jungsauen des Besamungsversuches wurden Kotproben gesammelt. Die rektale Entnahme erfolgte jeweils um 16<sup>00</sup>Uhr

- am Tage der Einstallung (Tag -24)
- an fünf Tagen während der Regumate-Gabe (Tage -20, -16, -11, -8 und -6)
- täglich ab der PMSG-Injektion bis zum vierten Tag nach KB I (Tage -5 bis 3)

Dabei entsprach der Tag 0 dem Tag, an welchem im Rahmen der Ovulationssynchronisation die Freisetzung der Eizellen erwartet wurde.

Die Kotproben lagerten bis zur Bestimmung des P<sub>4</sub>-Progesterongehaltes (4-Pregnen-3,20-Dione) mittels Enzymimmunoassay (EIA) bei -20°C. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Labor der Tierklinik für Fortpflanzung und Geburtshilfe der Freien Universität Berlin (Standort Mitte) nach einer anschließend schematisch dargestellten Verfahrensweise:





### **3.2.3 Versuchsreihe II**

Dieser Versuch besteht aus folgende Abschnitten:

1. **Vorversuch** (Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung, Thermoresistenztests nach 24- sowie 72-stündiger Spermalagerung) zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Seminalplasmaanteile im Verdünnermedium auf die Motilität flüssigkonservierter Spermien
2. **Feldversuch** zur Untersuchung der Wirkung eines bestimmten Seminalplasmaanteils im Verdünner auf die Befruchtungsergebnisse in praxi unter Berücksichtigung einer möglichen Eberspezifität; parallellaufende Labortests (Haltetests nach 24- sowie 72-stündiger Spermalagerung, Thermoresistenztests nach 24- sowie 72-stündiger Spermalagerung) zur Untersuchung des o.g. auf die Spermienmotilität unter Praxisbedingungen

#### **3.2.3.1 Vorversuch**

##### **Tiermaterial**

Zur Durchführung dieser Untersuchungen wurden fünf Eber des Instituts für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. als Sperma- und Seminalplasmaspender verwendet. Sie waren Vertreter der Rassen Deutsches Edelschwein (zwei Eber), Pietrain (zwei Eber) und Deutsches Sattelschwein (ein Eber). Hierbei handelte es sich um Selektionseber einer Eberaufzuchtstation, die aufgrund ihrer Mängel im Exterieur nicht für die Zucht benutzt werden konnten. Die Tiere hatten ein Alter von ein bis zwei Jahren. Ihre Haltung erfolgte in Einzelbuchten. Die Ejakulate dieser Eber wiesen kontinuierlich hohe Spermienmotilitätswerte (zwischen 75 und 90 %) auf.

##### **Versuchsdurchführung**

25 Ejakulate der Versuchseber dienten der Seminalplasmagewinnung. Das Seminalplasma wurde zum Zwecke der Poolung aller Chargen nochmals bei 40°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 50 ml-Portionen wiederum bei -20°C gelagert.

Von den fünf Ebern wurden an fünf Tagen weiterhin insgesamt 21 Ejakulate gewonnen und von jedem Ejakulat eine Spermaportion (mit 2,0 Mrd. beweglichen Spermien in 100 ml) je Verdünnervariante (A, B, C, D) hergestellt.

Zur Herstellung der Varianten wurde am jeweiligen Tag ein Teil des Seminalplasmapools aufgetaut. Folgende Verdünnervarianten wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Spermienmotilität im Haltetest nach 72-stündiger sowie im Thermoresistenztest nach 24- und 72-stündiger Lagerungsdauer untersucht:

- A = BTS ohne Seminalplasmaanteil
- B = BTS mit 10 % Seminalplasmaanteil
- C = BTS mit 20 % Seminalplasmaanteil
- D = BTS mit 40 % Seminalplasmaanteil

### 3.2.3.2 Feldversuch

#### Tiermaterial

##### a) Eber

Als Seminalplasmaspender wurden aus dem Bestand einer Besamungseberstation neun Vatertiere mit besonders guten Befruchtungsleistungen im Feld (FI, AFR, IGF/W) ausgewählt. (s. Tabelle 25 im Anhang B). Fünf Tiere waren Hybrideber, die vier anderen gehörten der Rasse Pietrain an. Sieben Eber hatten ein Alter von eineinhalb bis zweieinhalb Jahren, zwei Hybrideber waren vier Jahre alt. Die Haltung der Vatertiere erfolgte in Einzelbuchten. Im routinemäßigen Arbeitsprozeß wurden die Eber zwei- bis dreimal wöchentlich abgesamt.

Aus dem Bestand des Institutes für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. wurde als weiterer Seminalplasmaspender ein Eber der Rasse Pietrain ausgewählt, der sich in früheren Untersuchungen (Wicke, 1995) konstant durch eine deutliche motilitätsverbessernde Wirkung seines Seminalplasmas auf heterologe Spermien auszeichnete. Zudem wiesen seine Ejakulate stetig Spermienmotilitätswerte von 80 bis 90 % auf. Infolge von Fehlern an den Gliedmaßen konnte er nicht für die Zucht genutzt werden und war aus dem Bestand einer Eberaufzuchtstation selektiert worden. Der Eber war zum Versuchszeitpunkt zweieinhalb Jahre alt. Er wurde in einer Einzelbuche gehalten.

Zur Herstellung der Inseminationsportionen lieferten 20 weitere Vatertiere der Besamungseberstation im routinemäßigen Produktionsprozeß an acht verschiedenen Tagen 21 Ejakulate. Darunter befanden sich Pietrain- und Hybrideber sowie ein Tier der Belgischen Landrasse. Diese Eber hatten ein Alter von ein bis zweieinhalb Jahren und wurden in Einzelbuchten gehalten. Ihre Absamung erfolgte zwei- bis dreimal wöchentlich.

##### b) Sauen

Im Rahmen des Feldversuches wurden 196 Altsauen einer Schweinezuchtanlage G. besamt. Die Tiere waren Sauen aus Kreuzungen der Rassen Deutsches Edelschwein und Deutsche Landrasse bzw. Masthybriden. Sie hatten jeweils ein bis sechs Würfe erbracht. Ihre Haltung erfolgte im Kastenstand.

## **Seminalplasmagewinnung und -verarbeitung**

Zur Seminalplasmagewinnung dienten je vier Ejakulate der neun Vatertieren der BES sowie 17 Ejakulate des Ebers des IFN. Zum Anlegen zweier Pools wurde das Seminalplasma bei 40°C im Wasserbad aufgetaut. Der größere Pool (= Pool 1) (8 Liter) enthielt danach Seminalplasma der neun Vatertiere der BES, der kleinere (= Pool 2) (2 Liter) das Seminalplasma des Ebers vom IFN. Nach Einfüllen des gepoolten Seminalplasmas in 100 ml-Plastikflaschen lagerte dieses bei -20°C bis zu seiner Verwendung als Verdünnerzusatz.

## **Aufbereitung der Besamungsportionen**

Die Gewinnung der Ejakulate zur Herstellung der Besamungsportionen erfolgte am Tag der KB I. Zeitgleich wurde eine zur Aufbereitung der vom Versuchsbetrieb bestellten Anzahl Spermaportionen benötigte Menge Seminalplasma des Pools 1 bzw. 2 bei 40°C im Wasserbad aufgetaut und dem BTS-Medium bis zu einem Volumenanteil von 40 % zugesetzt. Es kamen im Feldversuch folgende Varianten zum Einsatz:

- E = BTS
- F = BTS mit 40 % Seminalplasma des Pools 1 (SP der neun Eber der BES)
- G = BTS mit 40 % Seminalplasma des Pools 2 (SP des Ebers des IFN)

Die mittels dieser Verdünnervarianten hergestellten Spermaportionen (100 ml) enthielten 2,0 Mrd. motile Spermien.

Der Feldversuch gliederte sich folgendermaßen in zwei Teile:

- An sechs Absamtagen wurden 18 Ejakulate von 17 Vatertieren nach dem Split-sample-Verfahren mit den **Verdünnervarianten E und F (Versuchsteil 1)**,
- an zwei Absamtagen drei Ejakulate von drei Ebern mit den **Verdünnervarianten E und G (Versuchsteil 2)** verdünnt.

Im Rahmen des **Versuchsteils 1** wurden je Variante (E und F) insgesamt 77 Sauen besamt, im Rahmen des **Versuchsteils 2** (Varianten E und G) je 21 Sauen. Während der Versuchsdurchführung wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Spermaportionen, welche mit BTS bzw. BTS mit 40%igem Seminalplasmazusatz konserviert worden sind, auf die Sauen hinsichtlich der Anzahl ihrer bisherigen Würfe (ein bis sechs) geachtet.

### **Laboruntersuchungen**

Jeweils eine Probe aller Spermaportionsvarianten wurde im Haltetest und im Thermoresistenztest nach 24- bzw. 72-stündiger Spermalagerung hinsichtlich des Anteils motiler Spermien beurteilt.

### **Befruchtungsergebnisse**

Mit Hilfe des Programmes „KW-Supersau IV“ wurden in der Schweinezuchtanlage G. die entsprechenden Daten für jede Sauengruppe erfaßt. Die Spermaportionen waren mit verschlüsselten Kennzeichen vor der Ebernummer versehen worden, so daß die Varianten eindeutig zugeordnet werden konnten. Es gelangten die Fruchtbarkeitsdaten AFR, und IGF/W in die Auswertung. Zusätzlich wurde für diesen Versuch die Maßzahl  $IGF/W \times AFR$  geschaffen.

### 3.2.4 Statistische Methoden

Die Dateneingabe und -organisation erfolgte mit dem Datenbankbetriebssystem dBASE IV, Version 1.5. Die statistische Auswertung der Daten wurde unter Nutzung des Programmpaketes SPSS for Windows, Version 6.0 durchgeführt. Die graphischen Darstellungen sind mit Hilfe des Programmes Microsoft Word, Version 6.0 erstellt worden.

Die Verfahren der schließenden Statistik sind in dieser Arbeit lediglich im Sinne einer beschreibenden Statistik verwendet worden. Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen daher Verallgemeinerungen nicht bedenkenlos zu.

Für die in den jeweiligen Haltetests ermittelten Spermienmotilitätswerte wurde das arithmetische Mittel ( $\bar{y}$ ), die Standardabweichung ( $s$ ) sowie das 0,95-Konfidenzintervall ( $\mu_u, \mu_o$ ) für den Erwartungswert  $\mu$  der Grundgesamtheit berechnet. Desgleichen erfolgte eine Bestimmung des arithmetischen Mittels für die Spermienmotilitätswerte einer jeden Versuchsvariante zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten im Thermoresistenztest. Desweiteren sind für die Ovulations- und Befruchtungsraten des Besamungsversuches der Versuchsreihe I und dem Parameter IGF/W des Feldversuches Mittelwert und Standardabweichung ( $\bar{y} \pm s$ ) berechnet worden. Da die  $P_4$ -Progesteronwerte eine schiefe Verteilung aufwiesen, erfolgte eine Transformation dieser durch dekadisches Logarithmieren, wodurch sich eine Verteilung ergab, die annähernd normal ist. Zu weitere Analysen und für graphische Darstellungen wurden das arithmetische Mittel ( $\bar{y}$ ) und die Standardabweichung ( $s$ ) der transformierten Werte genutzt. Bei der Beschreibung der Ergebnisse sowie bei deren Diskussion wurden jedoch die antilogarithmierten Werte ( $10^{\bar{y}} (10^{\bar{y}-s}; 10^{\bar{y}+s})$ ) verwendet.

Die statistische Auswertung der Spermienmotilitätswerte der Thermoresistenztests der Vorversuche der beiden Versuchsreihen ist mit Hilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse ( $\alpha = 0,05$ ) hinsichtlich der Faktoren Seminalplasmaanteil und Zeit durchgeführt worden. Zusätzlich erfolgten, da jeweils mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, mittels SCHEFFE-Test ( $\alpha = 0,05$ ) paarweise Vergleiche der Einzelwerte zu den bestimmten Untersuchungszeitpunkten.

Zur Analyse der Ergebnisse der Haltetests des Vorversuches der Versuchsreihe II diente die einfaktorielle Varianzanalyse ( $\alpha = 0,05$ ). Paarweise Vergleiche der Einzelgruppen erfolgten wiederum mit Hilfe des SCHEFFE-Tests ( $\alpha = 0,05$ ).

Obwohl die Werte der Variable Spermienmotilität (%) zwischen 0 und 100 nicht in jedem Falle um 50 liegen und somit eigentlich nicht von einer Normalverteilung gesprochen werden kann, ist als statistische Methode die Varianzanalyse verwendet worden. Grund dafür ist die sehr

komplexe Versuchsanstellung, bei der sich in der Beschreibung der Variable keine Auswertung auf einer verteilungsfreien Basis machen läßt. Außerdem kann im allgemeinen davon ausgegangen werden, daß die Varianzanalyse robust gegen die Verletzung der Verteilungsannahme reagiert, wenn die Gruppenumfänge nicht allzu gering sind.

Als statistische Methode zur Analyse der Ergebnisse der Halte- und Thermoresistenztests der Laboruntersuchungen im Feldversuch (Versuchsreihe II) sowie der Resultate (IGF/W) der Besamungen im Feldversuch diente der t-Test ( $\alpha = 0,05$ ).

Die Auswertung der  $P_4$ - Progesteronkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit (Tag) erfolgte über die logarithmisch transformierten Werte mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse ( $\alpha = 0,05$ ). Zum Vergleich der Ergebnisse der Kotprogesteronausscheidung zwischen den einzelnen Sauengruppen in Abhängigkeit vom Seminalplasmazusatz wurden die einfaktorielle Varianzanalyse ( $\alpha = 0,05$ ) sowie nachfolgend paarweise Vergleiche der Einzelwerte an den Tage 0 bis 3 unter Verwendung des SCHEFFE-Tests ( $\alpha = 0,05$ ) genutzt.

Bei der Variable Befruchtungsrate im Besamungsversuch der Versuchsreihe I kann nicht von einer symmetrischen Verteilung ausgegangen werden. Obwohl aus diesem Grunde die Analysen unter Verwendung der Medianwerte zuzüglich oberem und unterem Quartil aussagekräftiger wären, erfolgten diese in Anbetracht einer besseren Vergleichbarkeit mit fachlich ähnlich gelagerten Arbeiten dennoch anhand des arithmetischen Mittels ( $\bar{y}$ ) und der Standardabweichung ( $s$ ). Die statistische Auswertung dieses Merkmals erfolgte mit Hilfe des KRUSKAL-WALLIS-Test ( $\alpha = 0,05$ ).

### 3.3 Ergebnisse

#### 3.3.1 Versuchsreihe I

##### 3.3.1.1 Vorversuch

?Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung

Die Spermien des Ebers A zeigten bei Nachverdünnung mit dem homologen Seminalplasma (Eber A/Var. 2) ab dem Untersuchungszeitpunkt 30 min des Thermoresistenztests stetig Motilitätswerte, die deutlich über 50 % lagen. Vom Beginn des Thermoresistenztests bis zum Untersuchungszeitpunkt 180 min erfolgte ein Anstieg des Anteils motiler Spermien auf 56,7 %. Bis zum Ende des Thermoresistenztests kam es dann zu einem leichten Absinken der Spermienmotilitätswerte auf 54,6 %.

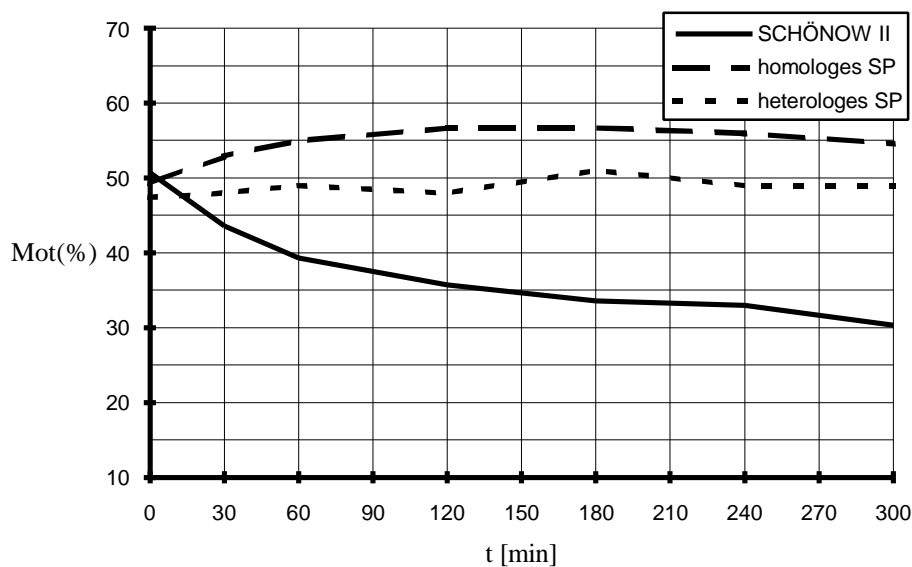


Abbildung 1: Einfluß verschiedener Nachverdünnungsmedien (Verdüner SCHÖNOW II, homologes bzw. heterologes Seminalplasma) auf die mittlere Motilität?%? der Spermien des Ebers A im Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung

Bei Nachverdünnung mit heterologem Seminalplasma (Eber A/Var. 3) wiesen die Spermien des Ebers A über den Zeitraum von 300 min hinweg relativ gleichbleibende Motilitätswerte um 50 % auf (47,4 bis 51,0 %). In letzterer Variante waren somit zu jedem Zeitpunkt des Thermo-



resistenztests geringfügig weniger Spermien motil als in der Nachverdünnungsvariante mit homologem Seminalplasma (Eber A/Var. 2). Die geringste Differenz zwischen den Anteilen motiler Spermien dieser beiden Varianten besteht zu Beginn des Thermoresistenztests mit 1,9 %, die größte zum Zeitpunkt 120 min mit 8,7 %. Die Differenzen zwischen den Prozentanteilen motiler Spermien dieser Nachverdünnungsvarianten zu den übrigen Untersuchungszeitpunkten des Thermoresistenztests bewegen sich zwischen 4,9 und 7,0 %. Die Unterschiede sind zu keinem Zeitpunkt signifikant ( $\alpha = 0,05$ ). Im Vergleich mit den Motilitätswerten bei Nachverdünnung mit homologem (Eber A/Var.2) und heterologem Seminalplasma (Eber A/Var. 3) erbrachten die Spermien des Ebers A geringere Prozentanteile motiler Spermien, wenn sie mit dem Verdüner SCHÖNOW II (Eber A/Var. 1) versetzt wurden. Zwar waren zu Beginn des Thermoresistenztestes mit 50,7 % bei Nachverdünnung mit dem Verdüner SCHÖNOW II (Eber A/Var. 1) mehr Spermien beweglich als bei Nachverdünnung mit homologem (Eber A/Var. 2) bzw. heterologem Seminalplasma (Eber A/Var. 3) (49,3 bzw. 47,4 %), so sank aber dann die Spermienmotilität in ersterer Nachverdünnungsvariante (Eber A/Var. 1) bis zum Ende des Thermoresistenztests bis auf 30,3 % stetig herab. Schon nach 60 min des Thermoresistenztests waren bei Nachverdünnung mit dem Verdüner SCHÖNOW II (Eber A/Var. 1) nur weniger als 40 % der Spermien motil (39,3 %); die Spermienmotilitätswerte in der homologen Nachverdünnungsvariante (Eber A/Var. 2) waren zu diesem Zeitpunkt deutlich höher (55,0 %). Bis zum Ende des Thermoresistenztests vergrößerte sich die Differenz zwischen den Spermienmotilitätswerten beider Varianten auf 24,3 %. Statistisch abzusichern ( $\alpha = 0,05$ ) waren die Unterschiede zwischen den Anteilen motiler Spermien bei Nachverdünnung mit homologem Seminalplasma (Eber A/Var.2) und dem Verdüner SCHÖNOW II (Eber A/Var.1) ab dem Untersuchungszeitpunkt 60 min des Thermoresistenztests (s. Tabelle 6 und Abbildung 1).

Tabelle 6: Einfluß verschiedener Nachverdünnungsmedien (Verdüner SCHÖNOW II, homologes bzw. heterologes Seminalplasma) auf die Spermienmotilität (y)?%? im Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung

Eber	Variante	Probenanzahl n	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
A	1	7	50,7	43,6	39,3	35,7	33,6	33,0	30,3
A	2	7	49,3	52,9	55,0	56,7	56,7	56,0	54,6
A	3	7	47,4	48,0	49,0	48,0	51,0	49,0	48,9
B	1	6	47,5	38,3	28,3	26,0	23,3	19,7	17,0
B	2	6	45,0	37,5	33,3	26,3	23,6	18,3	14,2
B	3	6	42,7	43,7	41,7	35,3	38,3	32,0	27,2

Die Spermien des Ebers B zeigten im Vergleich zu den Spermien des Ebers A in jeder Nachverdünnungsvariante geringere Motilitätswerte (s. Tabelle 6). Auffallend ist auch der stetige Abfall der Motilitätswerte der Spermien des Ebers B bis zum Ende des Thermoresistenztestes in allen drei Nachverdünnungsvarianten. Dabei sanken die Motilitätswerte bei Nachverdünnung mit dem Verdüner SCHÖNOW II (Eber B/Var. 1) von 47,5 % bis zum Ende des Thermoresistenztests auf 17,0 % und bei Nachverdünnung mit homologem Seminalplasma (Eber B/Var. 2) von 45,0 % auf 14,2 % herab.

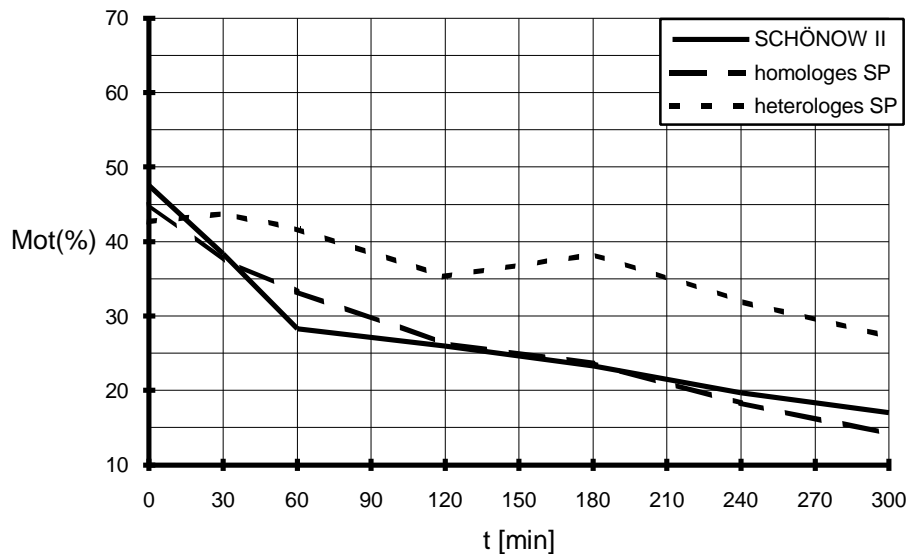


Abbildung 2: Einfluß verschiedener Nachverdünnungsmedien (Verdüner SCHÖNOW II, homologes bzw. heterologes Seminalplasma auf die mittlere Motilität[%] der Spermien des Ebers B im Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung

Bei Nachverdünnung mit heterologem Seminalplasma (Eber B, Var. 3) konnten im Vergleich zu den anderen beiden Varianten bessere Ergebnisse hinsichtlich der Spermienmotilität erzielt werden. Der Abfall der Spermienmotilitätswerte bis zum Ende des Thermoresistenztests betrug lediglich 15,5 %. Nach 300 min waren noch 27,2 % der Spermien motil. Damit waren zum Ende des Thermoresistenztests bei Nachverdünnung des Spermas des Ebers B mit heterologem Seminalplasma (Eber B/Var. 3) fast doppelt so viele Spermien wie bei Nachverdünnung mit homologem Seminalplasma (Eber B/Var. 2) motil. Verdeutlichung findet dies auch in der graphischen Darstellung (s. Abbildung 2). Die Unterschiede zwischen den Nachverdünnungsvarianten bezüglich der Motilität der Spermien des Ebers B sind statistisch nicht zu sichern ( $\alpha = 0,05$ ).

### 3.3.1.2 Besamungsversuch

Insgesamt wurden bei 23 Jungsauen 567 Corpora lutea gezählt. Dies entspricht einer Ovulationsrate von 24,6 (? 7,9) pro Sau. Durch Besamungen mit Sperma, welches einen zusätzlichen Anteil Seminalplasma des guten Befruchters enthielt, wurden in beiden Sauengruppen durchschnittlich über 25 Ovulationen je Tier erreicht (F/F: 25,2 (? 9,4); V/F: 25,4 (? 6,1)). Sauen, die Sperma des schlechten Befruchters mit homologem Seminalplasmaanteil (V/V) im Verdünner erhielten, zeigten eine mittlere Ovulationsrate von 24,5 (? 11,2). Mit 23,7 (? 5,1) erzielten die Sauen, die Sperma des guten Befruchters mit heterologem Seminalplasmaanteil (F/V) im Verdünner erhielten, die geringste durchschnittliche Ovulationsrate. Zwischen den vier Sauengruppen gibt es diesbezüglich jedoch keine signifikanten Unterschiede (? = 0,05). Durch Spülung der Eileiter und Uterushornspitzen konnten 385 normal entwickelte (? 3 Blastomeren) und 64 anomale Embryonen und 94 Eizellen zurückgewonnen werden (s. Tabelle 7 sowie Tabelle 24 im Anhang B). Die auf Basis der Anzahl gezählter Corpora lutea errechnete Wiederfindungsrate beträgt 95,7 %.

Tabelle 7: Einfluß des Seminalplasmaaustausches bei flüssigkonservierten Spermaportionen auf die Befruchtungsergebnisse

Variante	Sauen n	tragende Sauen n	C. l. (y ? s)	Eizellen n	anom. Emb. n	norm. Emb. n	BR [%] (y ? s)
F/F	6	6	25,2 ? 9,4	22	20	98	70,1 ? 31,3
F/V	6	6	23,7 ? 5,1	52	9	79	53,0 ? 34,7
V/F	5*	5	25,4 ? 6,1	9	23	94	77,7 ? 19,6
V/V	6	6	24,5 ? 11,2	11	12	114	82,9 ? 29,2
ges.	23	23	24,6 ? 7,9	94	64	385	70,6 ? 29,9

\*Eine Sau (Nr. 14) dieser Gruppe erbrachte nur unbefruchtete Eizellen. Sie wurde aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit zur Berechnung der Werte dieses Versuches nicht herangezogen.

Insgesamt konnte eine Befruchtungsrates von 70,6 (? 29,9) % erreicht werden. In der Gruppe der Sauen, die mit Sperma des schlechten Befruchters mit homologem Seminalplasmazusatz zum Verdünner (V/V) besamt wurden, konnte mit 82,9 (? 29,2) % die höchste Befruchtungsrates erreicht werden. Drei der sechs Sauen dieser Gruppe (Nr. 19, 23, 24) wiesen keine unbefruchteten Eizellen bzw. anomalen Embryonen auf. Die Befruchtungsrates der Sauen Nr. 22 und 20 lagen mit 94,4 % bzw. 76,5 % ebenfalls über dem Durchschnitt der Ergebnisse aller 23 Sauen.

Die Befruchtungsrate in der Sauengruppe, die Spermia desselben Ebers (V) mit Zusatz des Seminalplasmas des guten Befruchters (V/F) erhielt, lag mit 77,7 (? 19,6) % unter der der Sauengruppe, die mit Spermaportionen der Variante V/V besamt wurden. Ein Tier dieser Gruppe (Sau Nr. 16) erreichte eine Befruchtungsrate von 100,0 %, zwei mit 94,4 bzw. 71,9 % über dem Gesamtdurchschnitt aller Sauen liegende Werte.

Nach Besamungen mit Spermia des guten Befruchters unter Zusatz des homologen Seminalplasmas (F/F) konnte eine Befruchtungsrate von 70,1 (? 31,3) % erzielt werden. Auch von diesen sechs Tieren wies eins eine Befruchtungsrate von 100,0 % auf. Zwei Tiere (Nr. 1 und 2) erbrachten nur 30,0 bzw 32,4 % normal entwickelte Embryonen, alle anderen über der im Gesamtdurchschnitt der 23 Sauen (70,6 (? 29,9) %) liegende Befruchtungsrate.

Im Vergleich mit den anderen Sauengruppen eine geringere Befruchtungsrate von 53,0 (? 34,7) % erbrachten die Besamungen mit Spermia des guten Befruchters mit Zusatz des heterologen Seminalplasmas (F/V) zum Verdünner. Keines der Tiere der Gruppe wies eine Befruchtungsrate von 100,0 % auf, lediglich zwei Sauen erzielten mit 95,5 % (Nr. 8) bzw. 87,5 % (Nr. 12) über dem Gesamtdurchschnitt aller Probandinnen liegende Werte.

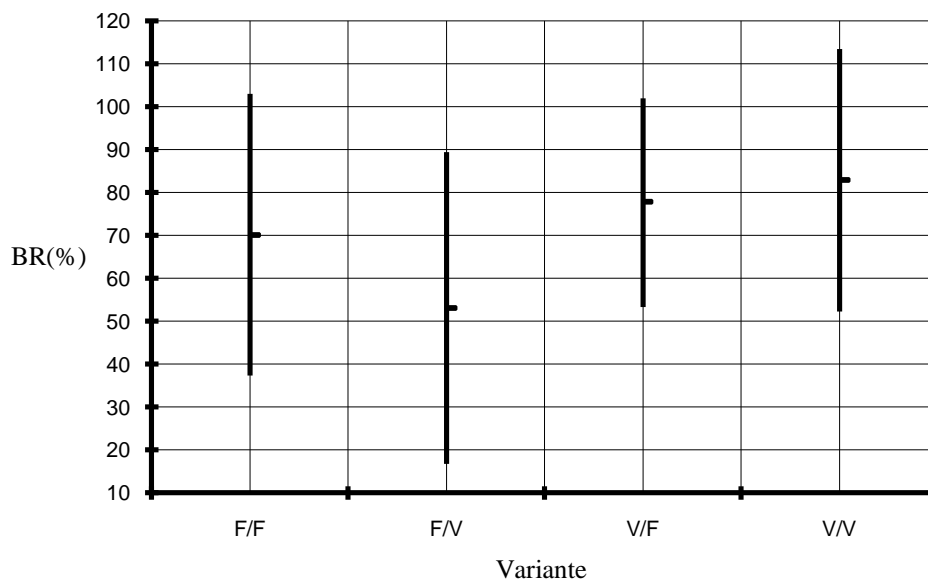


Abbildung 3: Einfluß des Seminalplasmaaustausches bei flüssigkonservierten Spermaportionen auf die Höhe der Befruchtungsrate (y ? s) % ?

Mit Ausnahme der Gruppe der Sauen, die Spermia des guten Befruchters mit Seminalplasmazusatz des schlechten Befruchters (F/V) zum Verdünner erhielten, wurden in jeder Jungsauengruppe

gruppe Befruchtungsraten von über 70 % erzielt. In dieser Gruppe ist auch im Vergleich mit den anderen die niedrigste Ovulationsrate (23,7 (? 5,1)) zu verzeichnen. Auffallend ist die hohe Standardabweichung des Merkmals Befruchtungsraten. Zwischen den vier Verdünnervarianten konnten hinsichtlich dieses Parameters mittels Kruskal-Wallis-Test ( $\alpha = 0,05$ ) keine statistisch gesicherten Unterschiede ermittelt werden.

### 3.3.1.3 Progesterongehalt im Kot

Die im Mittel höchsten Progesteronkonzentrationen im Kot der Jungsaugen wurden am Tag 3 nach der Ovulation (Tag 0) gefunden. Der Durchschnitt der an diesem Tag erhobenen  $P_4$ -Progesteronwerte betrug 321,8 (137,5; 753,2) ng/g. Der Mittelwert des Kotprogesterongehaltes am Tag 2 ist mit 156,4 (56,3; 434,7) ng/g fast doppelt so groß wie der am Tag 1 (80,2 (32,3; 199,0) ng/g) und weniger als halb so groß wie der am Tag 3 (321,8 (137,5; 753,2) ng/g). Der  $P_4$ -Progesteronwert am Tag 3 ist signifikant ( $\alpha = 0,05$ ) verschieden von denen am Tag 0, -1, -2, -4 und -6. So war ein stetiger Anstieg des Progesterongehaltes im Kot vom Tag der Ovulation an zu beobachten (s. Abbildung 4 und Tabelle 26 im Anhang B). Zwischen den Progesteronkonzentrationen, die an den anderen Tagen ermittelt wurden, gibt es keine statistisch gesicherten Differenzen ( $\alpha = 0,05$ ).

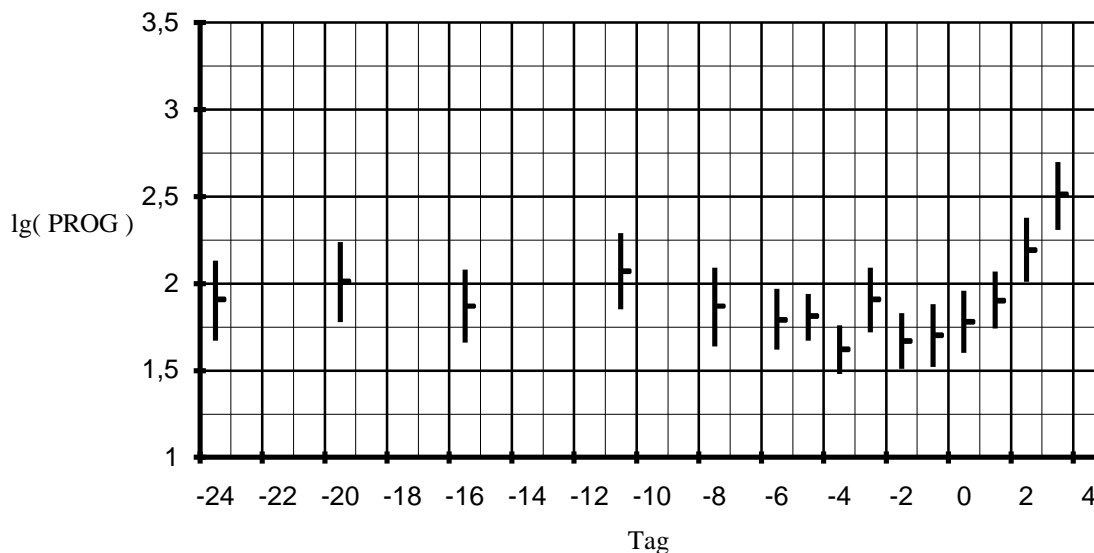


Abbildung 4:  $P_4$ -Progesterongehalt (dekadisch logarithmiert) ( $y \pm s$ ) im Kot der Jungsaugen (Tag 0 = Tag der Ovulation)

Geringere Mittelwerte konnten vom Ende der regumate®-Gabe (Tag -8) mit 73,9 (21,6; 225,6) ng/g bis zum Tag 1 p.ovul. (80,2 (32,3; 199,0) ng/g) gefunden werden, wobei der niedrigste am Tag -4 (41,5 (22,7; 75,8) ng/g), somit einen Tag nach der PMSG-Applikation, erhoben wurde.

Hinsichtlich des Kotprogesterongehaltes bestehen zwischen einigen Einzeltieren große Unterschiede. Die Werte schwanken am Tag 3 zwischen 84,9 und 1263,0 ng/g. Fast allen untersuchten Jungsaunen gemein ist der Anstieg der Kotprogesteronwerte ab dem Tag der induzierten Ovulation (Tag 0). Ein Teil dieser Tiere (Sauen 1; 2; 3; 5; 7; 8; 17; 20; 23) zeigte zwischen den Werten der einzelnen Meßtage zuvor (-24 bis -1) kaum Unterschiede. Die anderen (Sauen 4; 6; 10; 11; 12; 15; 16; 18; 19; 22 und 24) lassen hingegen einige Schwankungen ihrer Kotprogesteronkonzentration im Zeitraum vor der Ovulation erkennen. Dabei weist die Sau Nr. 22 sogar drei Gipfel auf, die verschieden groß sind und sich an den Tagen -8; -5 und -3 befinden. Auch die Sau Nr. 19 zeigt drei Gipfel im Verlauf ihrer P<sub>4</sub>-Progesteronwerte, die sich an den Tagen -20, -11 und 3 befinden. An den Eierstöcken dieser Tiere fanden wir bei unseren Untersuchungen 18 bzw. 34 Gelbkörper. Der ausgesprochen hohe Kotprogesterongehalt der Sau 4 an den Tagen -24 und -20 (1067,7 ng/g bzw. 2343,9 ng/g) sinkt bis zum Tag -8 (32,6 ng/g) herab. Nach folgendem leichten Anstieg bis Tag -4 fallen die Werte wiederum bis zum Tag der Ovulation (19 C.l.), um dann erneut anzusteigen.

Ein Anwachsen der Kotprogesteronwerte schon ab dem Tag -2 konnte bei den Sauen 13 (30 C.l.) und 14 (8 C.l.) ermittelt werden. Die Probandinnen 9 und 21 zeigten nach sehr wechselhaften Konzentrationen keine Anstiege um den Ovulationszeitpunkt (Tage -2 bis 2), bei 20 bzw. 8 Ovulationen. Darstellungen der Progesteronprofile für die Einzeltiere befinden sich im Anhang B (Abbildungen 14 bis 37).

Vergleicht man die mittleren P<sub>4</sub>-Progesteronkonzentrationen der vier Sauengruppen miteinander (s. Abbildung 5) zeigt sich folgendes Ergebnis: Die Ausgangswerte am Tag der Einstallung (-24) waren in den beiden Gruppen, die Sperma mit Seminalplasma des guten Befruchters erhielten, höher als in den anderen zwei Gruppen (F/F: 448,1 ng/g; V/F: 267,2 ng/g gegenüber F/V: 45,4 ng/g und V/V: 99,5 ng/g).



Abbildung 5: Mittlerer P<sub>4</sub>-Progesterongehalt (dekadisch logarithmiert) im Kot der vier Jungsauengruppen

Während des weiteren zeitlichen Verlaufs der P<sub>4</sub>-Progesteronkonzentrationen war auffällig, daß die Mittelwerte der Sauengruppe, die Sperma der Variante F/V erhielt, bis zum Tag 1 stetig unter 100,0 ng/g lagen. Erst danach wurden, im Gegensatz zu allen anderen Sauengruppen, darüberliegende Kotprogesteronkonzentrationen erreicht (Tag 2: 229,2 ng/g; Tag 3: 260,2 ng/g). In allen Sauengruppen zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Kotprogesterongehaltes vom Tag der erwarteten Ovulation (Tag 0) bis zum Tag 3.

Am Tag 0 erreichten die Sauen, die Sperma des schlechten Befruchters mit zusätzlichem Anteil Seminalplasma des guten Befruchters (V/F) im Verdünner erhielten, mit 316,0 ng/g den höchsten Mittelwert aller Sauengruppen. Dementsprechende Verhältnisse lagen auch an den Tagen 1 und 2 vor, wobei jedoch die zahlenmäßigen Unterschiede der mittleren Kotprogesteronkonzentrationen zwischen den einzelnen Sauengruppen am Tag 2 geringer waren. Am Tag 3 erbrachten die Sauengruppen, die Sperma mit einem zusätzlichen Seminalplasmaanteil des guten Befruchters (F/F, V/F) im Verdünner erhielten mit 629,0 bzw. 519,5 ng/g (25,2 (± 9,4) bzw. 25,4 (± 6,1) C.I.) höhere P<sub>4</sub>-Progesterongehalte als die Sauengruppen, die Sperma mit Seminalplasmazusatz des schlechten Befruchters (F/V, V/V) inseminiert bekamen (260,2 bzw. 400,1 ng/g) (23,7 (± 5,1) bzw. 24,5 (± 11,2) C.I.). Zwischen den Sauengruppen ließen sich mittels SCHEFFE-Test ( $\alpha = 0,05$ ) jedoch an keinem Tag der Untersuchung signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ ) hinsichtlich des P<sub>4</sub>-Progesterongehaltes im Kot finden.

### 3.3.2 Versuchsreihe II

#### 3.3.2.1 Vorversuch

- Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung
- Thermoresistenztest nach 24-stündiger Spermalagerung
- Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung

#### Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung

Die Spermienmotilität in der Variante ohne Seminalplasmazusatz zum Verdünner (A) war im Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung mit 57,7 ( $\pm$  9,5) % signifikant ( $\alpha = 0,05$ ) niedriger als in den Varianten mit seminalplasmahaltigen Verdünnermedien (B, C, D). Bei den Proben mit 10, 20 und 40 % Seminalplasma im Verdünner war ein Ansteigen des Mittelwertes der Spermienmotilität mit wachsenden Seminalplasmaanteil zu verzeichnen (s. Tabelle 8 und Abbildung 6). Die Unterschiede zwischen den drei Varianten mit seminalplasmahaltigem Verdünnermedium sind jedoch statistisch nicht zu sichern ( $\alpha = 0,05$ ).

Tabelle 8: Einfluß verschiedener Seminalplasmaanteile im Verdünnermedium auf die Spermienmotilität im Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Probenanzahl n	Spermienmotilität % ( $\bar{y} \pm s$ )	$\mu_u$	$\mu_o$
A	0	21	57,7 $\pm$ 9,5 a	55,0	60,2
B	10	21	63,8 $\pm$ 9,0 b	61,4	66,2
C	20	21	65,4 $\pm$ 10,2 b	63,1	67,7
D	40	21	67,6 $\pm$ 8,6 b	65,5	69,8

a, b: Werte mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $\alpha = 0,05$ )



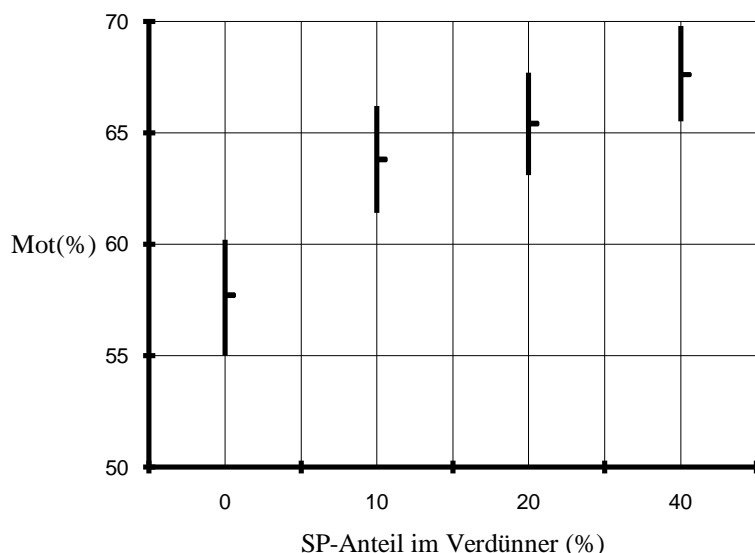


Abbildung 6: Einfluß verschiedener Seminalplasmaanteile im Verdünnermedium auf die Spermienmotilität ( $y \pm s$ ) im Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung

### Thermoresistenztest nach 24 stündiger Spermalagerung

Im Thermoresistenztest nach 24-stündiger Spermalagerung war in allen vier Spermaportionsvarianten (A, B, C, D) die Spermienmotilität über 300 min hinweg mit Werten um 70 % und darüber sehr hoch. Anzumerken ist auch, daß der Anteil motiler Spermien in allen Varianten, im Vergleich zum Beginn, zum Ende des Thermoresistenztests höher war (s. Tabelle 9 und Abbildung 7).

Tabelle 9: Einfluß verschiedener Seminalplasmaanteile im Verdünnermedium auf die Spermienmotilität ( $y$ ) im Thermoresistenztest nach 24-stündiger Spermalagerung

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Probenanzahl n	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
A	0	21	65,6	65,6	70,6	71,7	70,6	72,8	73,3
B	10	21	70,0	73,9	75,6	76,7	75,6	75,6	76,7
C	20	21	70,6	72,8	75,6	76,7	77,2	77,8	78,3
D	40	21	72,2	73,3	75,6	76,7	77,2	77,8	77,8

In den Proben mit seminalplasmafreiem Verdünnermedium (A) war die Spermienmotilität zu jedem Testzeitpunkt aber deutlich geringer als die in den Proben mit Seminalplasmazugabe (B, C, D). Die Unterschiede zwischen ersterer Variante (A) und jeder weiteren erwiesen sich als signifikant ( $p = 0,05$ ). Zu den Untersuchungszeitpunkten 60 und 120 min lagen in allen drei Varianten mit seminalplasmahaltigen Verdünnern gleiche Spermienmotilitätswerte vor (75,6 % bzw. 76,7 %). In den Proben, die 10 % Seminalplasma im Verdünner enthielten, kam es bis zum Ende des Thermoresistenztests nicht zu einer weiteren Erhöhung der Spermienmotilität, wohingegen in den Varianten mit 20 bzw. 40 %igem Seminalplasmaanteil im Verdünner ein weiterer Anstieg des Anteils motiler Spermien erfolgte. Mit 78,3 % war die Spermienmotilität in der Variante mit 20 % Seminalplasma im Verdünner (C) zum Abschluß des Thermoresistenztests geringfügig höher als in der Variante mit 40 % Seminalplasmaanteil (D) (77,8 %). Zwischen den Varianten mit 10, 20 und 40 % Seminalplasmaanteil im Verdünner (B, C, D) existieren zu keinem Zeitpunkt des Thermoresistenztests signifikante Unterschiede ( $p = 0,05$ ).

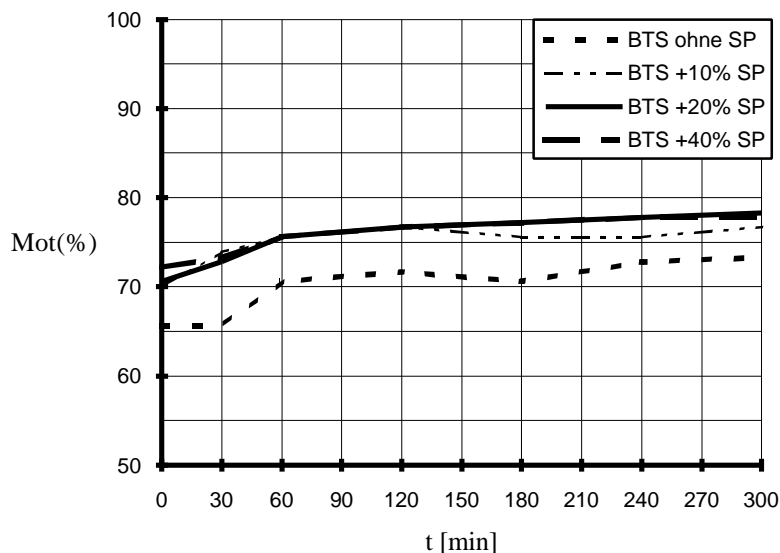


Abbildung 7: Einfluß verschiedener Seminalplasmaanteile im Verdünnermedium auf die mittlere Spermienmotilität (%) im Thermoresistenztest nach 24-stündiger Spermalagerung

## Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung

Im Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung war die Spermienmotilität mit Werten zwischen 60 und 73 % in allen vier Versuchsvarianten (A, B, C, D) recht hoch. Auch lag am Ende dieses Thermoresistenztestes ein höherer Anteil motiler Spermien als zum Beginn des Tests vor. (s. Tabelle 10 und Abbildung 8).

Tabelle 10: Einfluß verschiedener Seminalplasmaanteile im Verdünnermedium auf die Spermienmotilität (%) im Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Probenanzahl n	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
A	0	21	60,2	61,7	63,6	65,0	66,4	66,0	66,7
B	10	21	67,4	69,0	70,2	71,1	71,4	72,6	72,9
C	20	21	67,4	68,1	69,3	70,5	70,7	70,7	71,0
D	40	21	68,3	69,3	71,2	71,2	72,9	72,9	72,9

Die Spermienmotilität in den Proben der Variante mit seminalplasmafreiem Verdünnermedium (A) war zu jedem Zeitpunkt geringer als die in den Proben der Varianten mit seminalplasmahaltigen Verdünnern (B, C, D). Die Unterschiede zwischen der Variante A und den Varianten mit 10, 20 bzw. 40 % Seminalplasmazusatz zum Verdünner sind statistisch abgesichert ( $p = 0,05$ ).

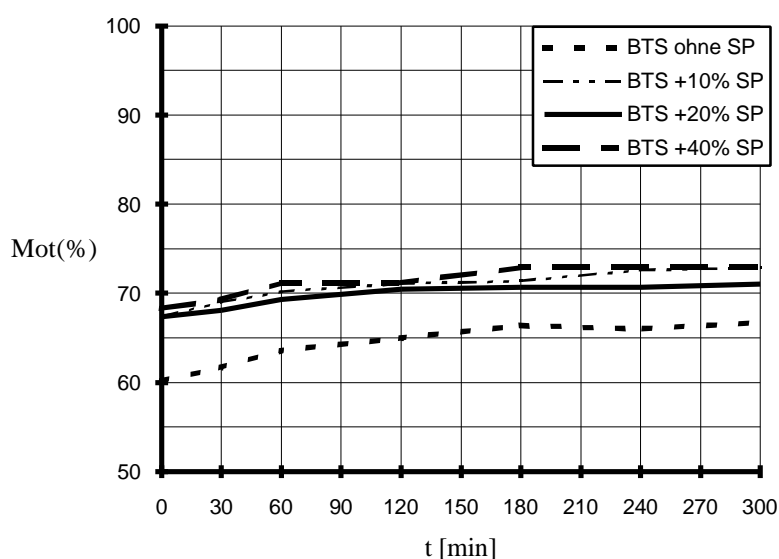


Abbildung 8: Einfluß verschiedener Seminalplasmaanteile im Verdünnermedium auf die mittlere Spermienmotilität (%) im Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung

Mit Ausnahme des Beginns des Thermoresistenztests (0 min) war der Anteil motiler Spermien in den Proben der Variante mit 20 % Seminalplasma (C) im Verdünner stets etwas geringer als der in den Proben der zwei anderen Varianten mit Seminalplasmaanteil im Verdünner (B, D). Zum Ende des Thermoresistenztests lagen in den Varianten mit 10 und 40 % Seminalplasma-zusatz zum BTS-Medium identische Spermienmotilitätswerte vor (72,9 %). Zwischen den Varianten mit seminalplasmahaltigen Verdünnermedien (B, C, D) existieren hinsichtlich der Spermienmotilitätswerte zu keinem Zeitpunkt des Thermoresistenztests signifikante Unterschiede ( $\alpha = 0,05$ ).

### 3.3.2.2 Feldversuch

#### Laboruntersuchungen zum Feldversuch

- Haltetest nach 24-stündiger Spermalagerung
- Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung
- Thermoresistenztest nach 24-stündiger Spermalagerung
- Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung

#### Versuchsteil 1

Im **Haltetest nach 24-stündiger Spermalagerung** ist die Spermienmotilität in den Proben der Variante mit seminalplasmafreiem Verdünner (E) mit 52,0 (? 12,5) % geringfügig höher als in denen der Variante mit einem Anteil von 40 % des Seminalplasmagemisches aus Ejakulaten von neun guten Befruchtern (F) (48,9 (? 16,4)) (s. Tabelle 11). Der Unterschied ist nicht signifikant ( $\alpha = 0,05$ ).

Tabelle 11: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die Spermienmotilität im Haltetest nach 24-stündiger Spermalagerung (SP aus Pool 1)

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Probenanzahl n	Spermienmotilität % (y ? s)	$\mu_u$	$\mu_o$
E	0	18	52,0 ? 12,5	45,7	58,1
F	40	18	48,9 ? 16,4	40,7	57,0

Im **Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung** wiesen die Proben der Variante mit seminalplasmafreiem Verdünnermedium (E) mit 40,6 (? 17,2) % deutlich höhere Motilitätswerte auf als die der Variante mit Seminalplasmaanteil (F) (s. Tabelle 12 und Abbildung 9). Der Unterschied konnte statistisch gesichert werden ( $\alpha = 0,05$ ).

Die Motilität der Spermien in der Verdünnervariante F sank in den zwischen den beiden Tests liegenden 48 Stunden deutlicher ab als die der Variante E. Die Differenzen der Mittelwerte betragen 21,5 bzw. 11,4.

Tabelle 12: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die Spermienmotilität im Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung (SP aus Pool 1)

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Probenanzahl n	Spermienmotilität % ( $\bar{y} \pm s$ )	$\mu_u$	$\mu_o$
E	0	18	40,6 $\pm$ 17,2 a	32,0	49,1
F	40	18	27,4 $\pm$ 15,0 b	19,5	35,1

a, b: Werte mit ungleichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ( $\alpha = 0,05$ )

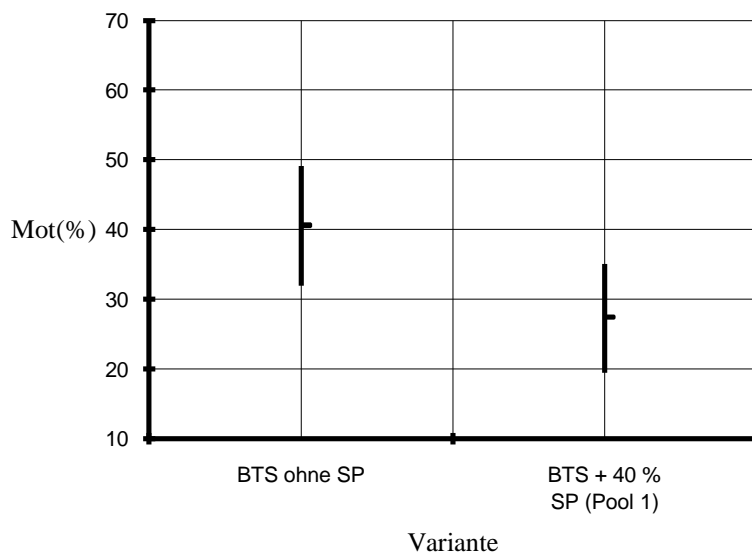


Abbildung 9: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die Spermienmotilität ( $\bar{y} \pm s$ ) im Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung (SP aus Pool 1)

Im **Thermoresistenztest nach 24-stündiger Spermialagerung** waren die Motilitätswerte der Spermien in der Variante F (mit Seminalplasmazusatz) zu jedem Untersuchungszeitpunkt höher als die der Samenzellen in der Variante ohne Seminalplasmazusatz zum Verdünner (E) (s. Tabelle 13 und Abbildung 10). Die Unterschiede sind signifikant ( $p = 0,05$ ). In beiden Varianten war jeweils ein starker Abfall des Anteils motiler Spermien bis zum Ende des Thermoresistenztests zu verzeichnen. Weniger als die Hälfte der jeweilig anfänglich motilen Samenzellen waren in der Variante mit seminalplasmafreiem Verdünner (E) nach 120 Minuten, in der Variante mit Seminalplasmazusatz zum Verdünnermedium (F) nach 180 Minuten noch beweglich. Zum Ende des Thermoresistenztests fanden sich in den Proben beider Varianten kaum noch motile Spermien (Variante E: 3,9 %; Variante F: 8,9 %).

Tabelle 13: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die Spermienmotilität (%) im Thermoresistenztest nach 24-stündiger Spermialagerung (SP aus Pool 1)

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Probenanzahl n	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
E	0	18	46,1	43,9	29,4	22,2	16,7	7,8	3,9
F	40	18	52,8	49,4	35,6	31,7	25,6	19,4	8,9

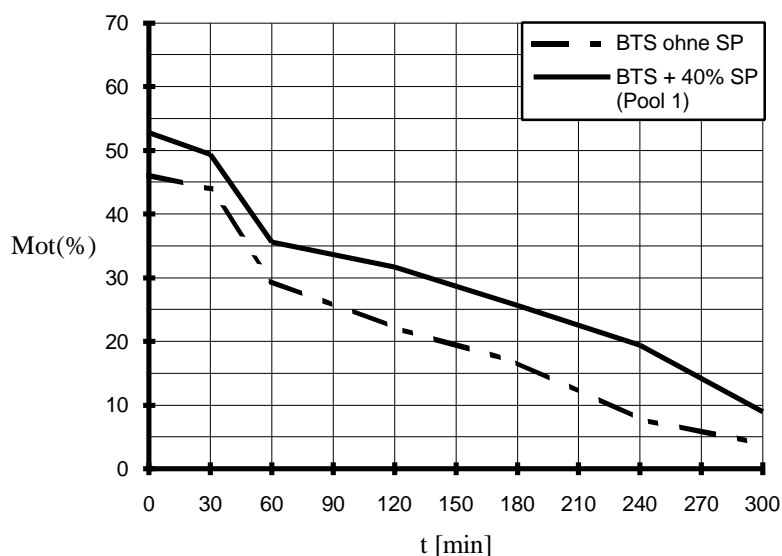


Abbildung 10: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die mittlere Spermienmotilität (%) im Thermoresistenztest nach 24-stündiger Spermialagerung (SP aus Pool 1)

Im **Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermialagerung** (s. Tabelle 14 und Abbildung 11) waren die Spermienmotilitätswerte in den Proben der Variante mit seminalplasmafreiem Verdünnermedium (E) zu jedem Zeitpunkt höher als in denen der Variante mit seminalplasmahaltigem Verdünner (F). Die Unterschiede sind signifikant ( $p = 0,05$ ).

Die Spermienmotilitätswerte waren bereits zu Beginn des Thermoresistenztests in beiden Varianten mit 39,4 bzw. 26,2 % relativ gering. Auffallend war auch in diesem Test der starke Abfall der Motilitätswerte bis zum Ende des Thermoresistenztests. In den Proben der Variante E waren zum Abschluß des Thermoresistenztests nach 72-stündiger Spermialagerung noch 20,6 % der Spermien motil. In der Variante mit 40 % Seminalplasma im Verdünnermedium (F) waren schon 60 min nach Beginn des Thermoresistenztests weniger als 20 % der Spermien beweglich. Bis zum Ende sank die Spermienmotilität in den Proben letzterer Variante auf 7,7 % herab.

Tabelle 14: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die Spermienmotilität (%) im Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermialagerung (SP aus Pool 1)

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Probenanzahl n	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
E	0	18	39,4	36,8	33,5	28,8	26,2	23,8	20,6
F	40	18	26,2	20,9	17,4	14,4	12,1	9,7	7,7

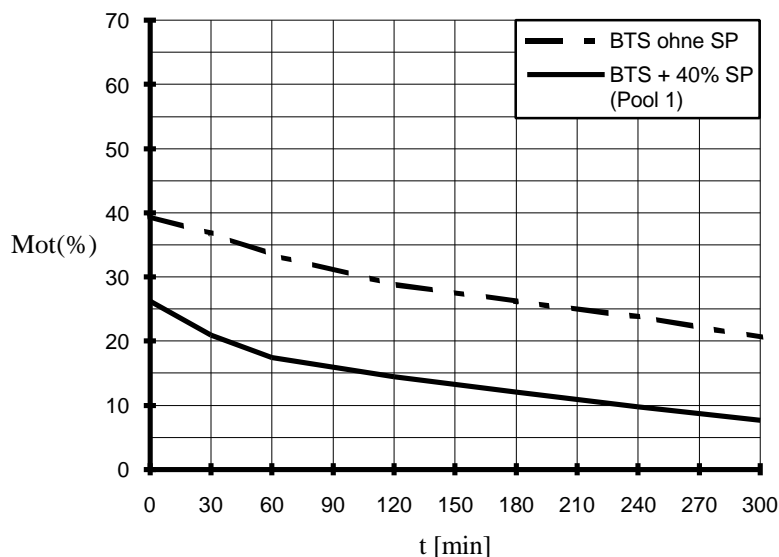


Abbildung 11: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die mittlere Spermienmotilität (%) im Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermialagerung (SP aus Pool 1)



## Versuchsteil 2

Die Variante G mit 40 %igem Anteil Seminalplasma aus Ejakulaten eines ausgewählten Ebers im Verdünner (s. 3.2.2.2 - Tiermaterial/Eber) wies im **Haltetest nach 24- und 72-stündiger Spermalagerung** hinsichtlich der Spermienmotilität höhere Werte auf als die Variante mit seminalplasmafreiem Verdünnermedium (E). Der Unterschied zeigte sich im Haltetest nach 24-stündiger Lagerung deutlicher (s. Tabelle 15). Hier waren in den Proben der Variante E 41,7 (? 7,6) % und in denen der Variante G 56,6 (? 7,6) % der Spermien motil. Bis zum Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung veränderte sich der Spermienmotilitätswert der Variante E kaum (40,0 (? 17,3) %), in der Variante G waren hingegen zu dem Zeitpunkt weniger Spermien motil als im Haltetest nach 24-stündiger Spermalagerung (45,0 (? 5,0) %) (s. Tabelle 16). Die Unterschiede zwischen den Varianten hinsichtlich der Spermienmotilität waren in keinem der Haltetests signifikant (? = 0,05).

Tabelle 15: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die Spermienmotilität im Haltetest nach 24-stündiger Spermalagerung (SP aus Pool 2)

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Probenanzahl n	Spermienmotilität?% ? (y ? s)	$\mu_u$	$\mu_o$
E	0	3	41,7 ? 7,6	22,7;	60,6
G	40	3	56,6 ? 7,6	37,7;	75,7

Tabelle 16: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die Spermienmotilität im Haltetest nach 72-stündiger Spermalagerung (SP aus Pool 2)

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Probenanzahl n	Spermienmotilität?% ? (y ? s)	$\mu_u$	$\mu_o$
E	0	3	40,0 ? 17,3	3,0	83,0
G	40	3	45,0 ? 5,0	32,6	57,4

Im **Thermoresistenztest nach 24-stündiger Spermalagerung** waren die Motilitätswerte der Spermien in den Proben der Variante mit 40 %igem Seminalplasmaanteil im Verdünner (G) zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung höher als die der Spermien in den Proben der Variante mit seminalplasmafreiem Verdünner (E). (s. Tabelle 17 sowie Abbildung 12). Die Unterschiede sind statistisch gesichert ( $p = 0,05$ ).

In beiden Varianten sanken die Spermienmotilitätswerte vom Beginn bis zum Ende des Thermoresistenztests nahezu parallel ab. So waren zu Beginn des Thermoresistenztests in den Proben der Variante mit seminalplasmahaltigem Verdünner (G) 60,0 % der Spermien motil und zum Ende 46,7 %, in den Proben der Variante mit seminalplasmafreiem Verdünner waren es 41,7 bzw. 25,0 %. Die Spermienmotilitätswerte in der Variante G lagen stetig über 45 %, die der Variante E über 25 %.

Tabelle 17: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die Spermienmotilität (%) im Thermoresistenztest nach 24-stündiger Spermalagerung (SP aus Pool 2)

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Probenanzahl n	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
E	0	3	41,7	31,7	30,0	25,0	26,7	25,0	25,0
G	40	3	60,0	55,0	46,7	46,7	50,0	48,3	46,7

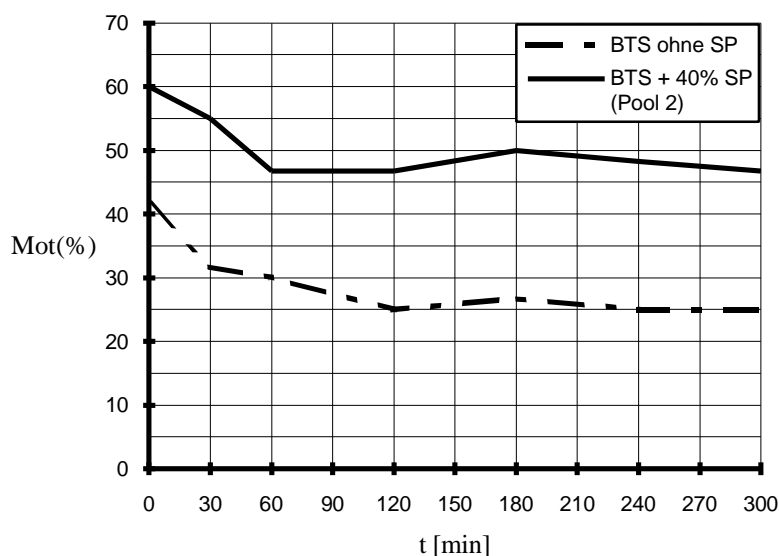


Abbildung 12: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die mittlere Spermienmotilität (%) im Thermoresistenztest nach 24-stündiger Spermalagerung (SP aus Pool 2)

Im **Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung** waren in der Variante mit seminalplasmahaltigem Verdünner (G) zu jedem Zeitpunkt mehr Spermien motil als in der Variante mit seminalplasmafreiem Verdünner (E). Die Unterschiede sind statistisch gesichert ( $p = 0,05$ ). Die Spermienmotilitätswerte fallen stetig nahezu parallel vom Beginn des Thermoresistenztests bis zum Ende ab. In den Proben der Variante mit seminalplasmahaltigem Verdünner waren zum Beginn des Thermoresistenztests 51,7 % der Spermien motil, zum Ende 33,3 %; in den Proben der Variante mit seminalplasmafreiem Verdünnermedium waren es 40,0 bzw. 16,7 % (s. Tabelle 18 und Abbildung 13).

Tabelle 18: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die Spermienmotilität (%) im Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung (SP aus Pool 2)

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Probenanzahl n	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
E	0	3	40,0	36,7	30,0	23,3	20,0	16,7	16,7
G	40	3	51,7	48,3	43,3	36,7	35,0	33,3	33,3

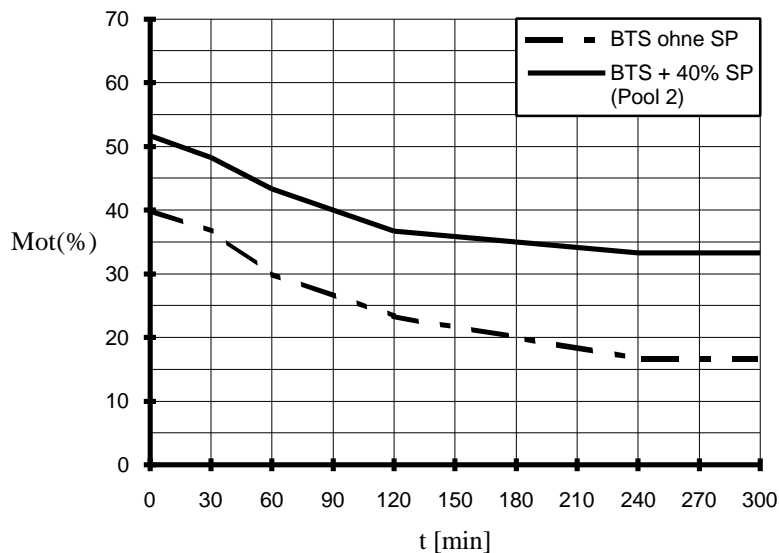


Abbildung 13: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die mittlere Spermienmotilität (%) im Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung (SP aus Pool 2)

## Befruchtungsergebnisse

### Versuchsteil 1

Von den 77 Altsauen, die mit Spermaportionen, welche mit einem seminalplasmafreien Verdüner (E) konserviert worden waren, besamt wurden, ferkelten 88,3 % ab. Pro Wurf wurden in dieser Gruppe durchschnittlich 9,7 (? 4,6) Ferkel geboren. Bezogen auf 100 Erstbesamungen wären dies 856,5 Ferkel. Von 77 mit seminalplasmahaltigem Verdüner (SP aus Pool 1) konservierten Spermaportionen (F) besamten Altsauen ferkelten 85,7 % ab. Diese Sauen erbrachten eine durchschnittliche Wurfgröße von 9,3 (? 4,7) Ferkeln.

Tabelle 19: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die Befruchtungsergebnisse (SP aus Pool 1)

Variante	SP-Anteil im Verdüner (%)	Anzahl EB n	Abferkelrate ?% ?	IGF/W x AFR	IGF/W (y <sub>1</sub> ? s)
E	0	77	88,3	856,5	9,7 ? 4,6
F	40	77	85,7	797,0	9,3 ? 4,7

Bezieht man diese Ergebnisse auf 100 Erstbesamungen, so entspräche dies 797,0 und damit 59,5 Ferkeln weniger als mit Besamungen unter Nutzung eines Verdünners ohne zusätzlichen Seminalplasmaanteil geboren wurden. Somit sind die Befruchtungsergebnisse, die mit den Spermaportionen der Variante E erreicht wurden, in allen erfaßten bzw. berechneten Parametern geringfügig höher als die der Variante mit Seminalplasmazusatz zum Verdünnermedium (F). Die Unterschiede sind statistisch nicht zu sichern (? = 0,05).

## Versuchsteil 2

Im Versuchsteil 2 konnte in der Gruppe der Sauen, welche mit Sperma mit seminalplasmafreiem Verdünner (E) besamt wurden, eine Abferkelrate von 90,5 % erreicht werden. Von den 21 Sauen, die mit seminalplasmahaltigem Verdünner (SP aus Pool 2) konservierten Sperma (G) besamt wurden, ferkelten 85,7 % ab. In letzterer Sauengruppe wurden je Wurf im Durchschnitt 1,1 Ferkel mehr geboren als in der Gruppe der Sauen, die Spermaportionen der Variante E erhielten (9,5 (? 4,8) bzw. 8,4 (? 4,0) Ferkel).

Tabelle 20: Einfluß eines seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermediums auf die Befruchtungsergebnisse (SP aus Pool 2)

Variante	SP-Anteil im Verdünner (%)	Anzahl EB n	Abferkelrate ?% ?	IGF/W x AFR	IGF/W (y <sub>1</sub> ? s)
E	0	21	90,5	760,2	8,4 ? 4,0
G	40	21	85,7	814,2	9,5 ? 4,8

Die höheren Zahlen insgesamt geborener Ferkel je Wurf in der Versuchsgruppe, die Sperma mit seminalplasmahaltigem Verdünner (G) erhielten, bewirkten, daß auch der Parameter IGF/W x AFR in dieser Sauengruppe höhere Werte aufweist (814,2 gegenüber 760,2). Nach Besamungen mit Sperma unter Nutzung des seminalplasmahaltigen Verdünners (G) wurden, bezogen auf 100 Erstbesamungen, 54,0 Ferkel mehr geboren als nach Besamungen mit Sperma, welches mit seminalplasmafreiem Verdünner konserviert worden war. Die Differenzen sind statistisch nicht zu sichern (? = 0,05).

#### 4 Diskussion

Seminalplasma sollte bei der Ausverdünnung der Ejakulate in der Eberspermaproduktion mehr Beachtung geschenkt werden. Der Verdünnungsgrad flüssigkonservierten Spermas wird üblicherweise auf der Grundlage der im Ejakulat vorhandenen Spermien und der erwünschten Zahl an Spermien pro Besamungsdosis errechnet. Derzeit werden etwa zwei bzw. drei Milliarden Spermien pro Portion verwendet. Bei diesem Vorgang bleibt jedoch unberücksichtigt, daß der Seminalplasmaanteil erheblich reduziert wird und darin enthaltene aktive Substanzen mit ausverdünnung werden. Den vielfältigen Wirkungen des Seminalplasmas (Waberski, 1995d) sind folglich enge Grenzen gesetzt. Möglicherweise ist sogar nicht die reduzierte Spermienzahl, sondern der verringerte Seminalplasmaanteil der limitierende Faktor der Ejakulatverdünnung (Waberski, 1994).

Darüber hinaus kommt es auch darauf an, nach den Ursachen der Seminalplasmaeffekte zu forschen. Betrachtung fanden hierbei die verschiedensten Inhaltsstoffe des Seminalplasmas. So gab es umfangreiche Untersuchungen zur Bedeutung des hohen Seminalöstrogenanteils. Zumindest partiell sind diese Substanzen an den Vorgängen im weiblichen Genitale beteiligt, die den zeitlichen Ablauf der Befruchtung regulieren. Dazu gehören ovulationsinduzierende und spermienmotilitätsbeschleunigende Wirkungen (Houang-Vu, 1987; Claus et al., 1987; Zöttl, 1988; Waberski, 1994). Zum anderen untersuchten Tso u. Lee (1980), Mann u. Lutwak-Mann (1981), Tso et al. (1987) sowie Jeng et al. (1993) verschiedene Substanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Spermienmotilität. Über die Effekte der seit neuerem im Mittelpunkt der Betrachtung stehenden Spermadhesine des Ebers existiert ein noch lückenhaftes Wissen. Offensichtlich spielen diese lectinähnlichen Moleküle eine wesentliche Rolle in der Kette der Ereignisse, die zur Befruchtung führen (Jonáková et al., 1991; Calvete et al., 1993; Calvete et al., 1994b; Töpfer-Petersen et al., 1994; Calvete et al., 1995a; Calvete et al., 1996).

Gründe für die Notwendigkeit der Weiterführung der Untersuchungen ergeben sich aus den noch vorhandenen Wissenslücken auf diesem Gebiet sowie den Fragen aus den Reihen der Spermaproduzenten hinsichtlich praxisrelevanter Konsequenzen. Bei letzterem spielen besonders die noch wenig erforschten Wirkungen des Seminalplasmas bei der Konservierung von Ebersperma sowie die beim Einsatz von Mischsperma beobachteten Effekte eine Rolle.

Die eigenen Untersuchungen hatten daraus folgend das Ziel, weitere Faktoren im Rahmen der Wirkungen des Seminalplasmas auf die Spermienmotilität und den Befruchtungsvorgang zu

prüfen, womit ein Beitrag zur Vervollkommnung des Wissens auf diesem Gebiet geleistet werden soll. Von Interesse war der Einfluß von Seminalplasma als Verdünnerezusatz, wobei die Eberspezifität besonders berücksichtigt wurde.

Zur Beurteilung der Effekte des Seminalplasmazusatzes zum Verdünnern auf die Spermienmotilität dienten Schätzungen dieser in Halte- und Thermoresistenztests. Die Spermienmotilität ist ein Hinweis für den ungestörten Ablauf verschiedener Stoffwechselfvorgänge und eine Voraussetzung für die Fähigkeit zur Befruchtung. Da Sperma des Ebers im Vergleich zu dem anderer Spezies einen höheren Anteil kreisbeweglicher Spermien aufweist, empfiehlt sich die Schätzung des Anteils motiler Spermien aller Bewegungsformen (Stähr u. Nehring, 1997).

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand beschäftigte sich mit der Frage der Wirkung eines zusätzlichen Seminalplasmaanteils im Verdünnern auf das Befruchtungsvermögen derartig flüssigkonservierten Spermas. Als Parameter dienten hierbei die Befruchtungsraten, die sich aus dem Anteil normal entwickelter Embryonen an der Gesamtheit wiedergefundener Embryonen und Eizellen ergab, sowie die Abferkelrate und die Anzahl insgesamt geborener Ferkel je Wurf.

Außerdem war von Interesse, inwieweit die Insemination von Sperma mit zusätzlichem Anteil von Seminalplasma guter bzw. schlechter Befruchter im Verdünnern an der Einstellung der Progesteronkonzentration im Kot beteiligt sein kann. Dazu dienten Bestimmungen des P<sub>4</sub>-Progesterongehaltes mittels Enzymimmunoassay.

Die methodischen Voraussetzungen für die Durchführung der Versuche waren günstig, da für die Auswahl des männlichen und weiblichen Tiermaterials jeweils zahlenmäßig große Bestände mit umfangreichem Datenmaterial zur Verfügung standen. Jedoch sind den Aussagen der Untersuchungen auch Grenzen gesetzt. Als solche sind die in einigen Versuchsteilen aus wirtschaftlichen Gründen geringen Stichprobenumfänge zu nennen.

Aufgrund der Vielfältigkeit und Heterogenität der einzelnen Versuche in Durchführung und verwendetem Tiermaterial soll die Diskussion in Abschnitte gegliedert und dadurch Unübersichtlichkeit vermieden werden.

**Im Vorversuch der Versuchsreihe I** erwies sich das Seminalplasma des Ebers, dessen Ejakulate stets hohe Motilitätswerte (75 bis 85 %) aufwiesen, sowohl als homologer sowie auch als heterologer Zusatz zum flüssigkonservierten Sperma als am deutlichsten motilitätsstimulierend.

In homologer Nachverdünnung ergaben sich teilweise signifikant höhere Motilitätswerte als in der Nachverdünnungsvariante mit industriemäßig hergestelltem Verdünner SCHÖNOW II.

Bei Zugabe dieses Seminalplasmas zu flüssigkonserviertem Sperma eines Ebers, dessen Ejakulate geringere Spermienmotilitätswerte (60 bis 65 %) aufwiesen, wurde zu fast jedem Untersuchungszeitpunkt des Thermoresistenztests deutlich mehr motile Spermien ermittelt als in homologer Nachverdünnungsvariante der Ejakulate bzw. nach Zugabe von industriemäßig hergestelltem Verdünner SCHÖNOW II. Diese Unterschiede waren statistisch aber nicht signifikant. Auffallend war bei diesen Untersuchungen die wesentlich bessere Überlebensdauer der Spermien, wenn ihnen Seminalplasma aus Ejakulaten mit hohen Motilitätswerten zugegeben wurde. Zeigte sich in homologer Nachverdünnung mit diesem Seminalplasma von Anfang bis zum Ende des Thermoresistenztestes sogar ein leichter Anstieg der Spermienmotilität, so wiesen die Spermien des „schlechten“ Ebers bei heterologer Nachverdünnung einen deutlich geringeren Spermienmotilitätsabfall auf als bei homologer bzw. Nachverdünnung mit dem Verdünner SCHÖNOW II.

Diese Versuche lassen die Aussage zu, daß heterologes Seminalplasma im Vergleich zu homologem den Anteil motiler Spermien unterschiedlich beeinflussen kann und Seminalplasma aus Ejakulaten mit hohen Motilitätswerten steigernde Effekte auf die Bewegungsaktivität der Samenzellen besitzt. Seminalplasmafreien Medien ist derartiges Seminalplasma deutlich überlegen.

Methodisch ähnliche Versuche führten Wicke u. Stähr (1992, 1993) sowie Nehring et al. (1994) durch. Wicke u. Stähr (1992, 1993) stellten in ihren Untersuchungen an der CASA fest, daß Seminalplasma motilitätsfördernd sein kann. Wurden Ejakulate mit Seminalplasma statt Verdünner versetzt, ergaben sich beim Anteil motiler und linear beweglicher Spermien signifikant höhere Werte. Weitere Versuche bewiesen, daß diese motilitätsbeeinflussende Wirkung des Seminalplasmas eberspezifisch ist. Spermien aus Ejakulaten mit schlechter Spermienmotilität zeigten nach Zugabe von Seminalplasma aus Ejakulaten mit guter Motilität signifikant höhere Motilitätswerte. Auch die Spermien der „guten“ Ejakulate ließen sich durch heterologes „schlechtes“ Seminalplasma hinsichtlich ihrer Beweglichkeit beeinflussen, dieser hemmende Effekt war jedoch weniger ausgeprägt als der motilitätsfördernde des Seminalplasmas aus Ejakulaten mit guter Motilität. Auch Nehring et al. (1994) bestätigten die eberspezifischen Verhältnisse. Heterologes Seminalplasma wirkte sich auf den Anteil motiler Spermien und deren Geschwindigkeit anders aus als homologes. Sowohl stark hemmende als auch stark steigernde



Effekte traten auf. Die Ergebnisse unserer Versuche konnten die von Wicke u. Stähr (1992, 1993) und Nehring et al. (1994) untermauern.

Es ist bekannt, daß es Unterschiede in der Zusammensetzung des Seminalplasmas zwischen Ebern gibt (Mann u. Lutwak-Mann, 1981; Claus et al., 1983; Claus et al., 1987). Diese können qualitativer als auch quantitativer Natur sein. Dabei existieren Bestandteile, die die Motilität fördern, zum anderen solche, die die Motilität hemmen. Es liegt somit der Gedanke nahe, daß das zugefügte Seminalplasma fördernde Komponenten in mehr oder minderer Quantität besitzt und folglich die Spermienmotilität unterschiedlich beeinflussen kann. Zu denken wäre hierbei an katalytisch aktive Stoffe, wie Ionen, Nukleotide und Nährstoffe (Fruktose, Milchsäure) (Mann u. Lutwak-Mann, 1981) oder spezielle Proteine, wie das Sperm Forward Motility Protein (Acott u. Hoskins, 1978). Tso et al. (1987) machten Monosaccharide für die Motilitätsstimulation verantwortlich, wogegen sie Trisaccharide als beweglichkeithemmende Substanzen einstuften. So könnten also voneinander abweichende Monosaccharid-Trisaccharid-Verhältnisse des Seminalplasmas zweier Eber Unterschiede hinsichtlich der Wirkung auf die Spermienmotilität bedingen. Zum anderen ist bekannt, daß Sekrete der Prostata des Menschen motilitätsstimulierend wirken, die der Samenblasenflüssigkeit motilitätshemmend. Sollte dies auch für das Schwein gelten, würden Differenzen in den Prozentanteilen dieser Faktoren unterschiedliche Wirkungen auf die Spermienmotilität hervorrufen.

Die deutliche Überlegenheit von Seminalplasma aus Ejakulaten mit hohen Motilitätswerten gegenüber industriemäßig hergestellten Verdünnern hinsichtlich der Spermienmotilitätsstimulation sowie der Überlebensdauer der Spermien im Thermoresistenztest könnte Resultat bestimmter natürlicher Wirkstoffe des Seminalplasmas sein. Die Spermienmotilität ist Ausdruck eines ungestört ablaufenden Stoffwechsels der Samenzelle (Stähr u. Nehring, 1997). Substanzen des Seminalplasmas tragen möglicherweise zur Optimierung des Stoffwechsels bei, sei es durch Bereitstellung natürlicher Nährstoffe, die ein industriemäßig hergestellter Verdünner nicht enthält, durch katalytisch wirksame Substanzen oder solchen, die sich aus dem endogenen Stoffwechsel ergeben. Die eigenen Versuche zeigten auch, daß Seminalplasma aus Ejakulaten mit niedriger Spermienmotilität lediglich bei Zugabe zu Spermien aus Ejakulaten mit hoher Motilität dem industriemäßig hergestellten Verdünner hinsichtlich der Spermienmotilitätsstimulation überlegen sein kann. Dabei spielen vermutlich Seminalplasmaproteine an der Oberfläche dieser Spermien eine Rolle, die zum größten Teil die Rezeptoren bedecken und den motilitätshemmende Effekt des Seminalplasmas aus Ejakulaten mit niedriger Spermienmotilität abschwächen. Ein späteres Hinzufügen von fremden Seminalplasma mit qualitativ oder quanti-

tativ anderen Bestandteilen erachtete Vitt (1996) nach Versuchen beim Rind aufgrund des Kontaktes der Spermien mit eigenem Seminalplasma nach der Ejakulation und der daraus folgenden Besetzung der Oberflächenrezeptoren durch dieses als wirkungslos. Diese Aussage kann für Eberseminalplasma nicht bestätigt werden. Daraus resultiert die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur Klassifizierung der Motilitätsstimulatoren im Seminalplasma.

Der **Besamungsversuch** diente der Untersuchung, ob Unterschiede in der Wirkung homologen und heterologen Seminalplasmas, wie sie für die Spermienmotilität aufgezeigt wurden, auch für das Befruchtungsvermögen existieren. Zur Reduzierung der routinemäßig verwendeten 2,0 Mrd. beweglichen Spermien je Besamungsportion um die Hälfte (1,0 Mrd.) bewegten uns folgende Gedanken: Ein Verdecken möglicher Unterschiede im Befruchtungsvermögen zwischen den eingesetzten Spermaportionsvarianten durch eine hohe Spermienkonzentration sollte verhindert werden. Bei einer Insemination mit einer hohen Zahl verfügbarer Spermien würden genügend Samenzellen in der notwendigen Zeit zum Ort der Fertilisation gelangen, um die dort vorhandenen Eizellen zu befruchten. Einflüsse des Seminalplasmas guter bzw. schlechter Befruchter auf Spermientransport und Befruchtungsvorgang wären somit schlecht zu quantifizieren. Mit derartig herabgesetzten Spermienzahlen arbeiteten schon Peña Alfaro (1988), Rath et al. (1989) und Willmen (1989). Durch die in den Versuchen o.g. Autoren (Peña Alfaro, 1988; Rath et al., 1989; Willmen, 1989) erreichten signifikant höheren Spermienrückgewinnungsraten bei Besamungen mit 0,5 Mrd. Spermien bei zusätzlicher intrazervikaler Applikation von Seminalplasma gegenüber Besamungen mit 2,0 Mrd. Spermien bei Verwendung von Verdünner konnte der Seminalplasmaeffekt auf den Spermientransport im weiblichen Genitale deutlich herausgestellt werden.

In den eigenen Versuchen wurde eine Oulationsrate von 12,3 Follikeln pro Eierstock und 24,6 pro Tier erreicht. Von den in der Spülflüssigkeit wiedergefundenen Stadien waren 97 Eizellen, 385 normal entwickelte (? 3 Blastomeren) und 64 anomale Embryonen. Die durchschnittliche Befruchtungsrate aller Sauengruppen betrug 70,6 (? 29,9) %.

In der Gruppe der Sauen, die mit Sperma des schlechten Befruchters mit homologem Seminalplasmazusatz zum Verdünner besamt wurden, konnte mit 82,9 (? 29,2) % die höchste Befruchtungsrate erreicht werden. Die Befruchtungsrate der Sauengruppe, die Sperma desselben Ebers mit Zusatz des Seminalplasmas des guten Befruchters erhielt, lag mit 77,9 (? 19,6) % darunter. Nach Besamungen mit Sperma des guten Befruchters unter Zusatz des homologen Seminalplasmas konnte eine Befruchtungsrate von 70,1 (? 31,3) % erzielt werden. Im Ver-

gleich mit den anderen Sauengruppen eine deutlich geringere Befruchtungsrate von 53,0 (? 34,7) % erbrachten die Besamungen mit Sperma des guten Befruchters mit Zusatz des Seminalplasmas des schlechten Befruchters zum Verdünner. Zudem wies diese Sauengruppe eine im Vergleich mit den anderen geringere Ovulationsrate (23,7 (? 5,1)) auf.

Das Merkmal Befruchtungsrate ist nicht normalverteilt und weist gerade bei diesem geringen Stichprobenumfang eine hohe Standardabweichung auf. Die Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der Befruchtungsrate konnten daher nicht abgesichert werden.

Besonders viele der wiedergefundenen Embryonen befanden sich im 4-Zellstadium. Bezüglich der normal entwickelten waren 74,0 % in dieser Phase. Bei Cheng (1981) waren am vierten Tag nach Besamung 55 % aller gewonnenen Embryonen 4-Zeller. Die auffallende Häufung der 4-Zellstadien stimmt mit den Beobachtungen von Alanko (1974) überein. Auch Mc Laren (1980) bestätigte eine äußerst lange Verweildauer in dieser Phase mit 24 bis 48 Stunden, wogegen folgende Zellteilungen im Abstand von 12 Stunden erfolgten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Wirkung homologen und heterologen Seminalplasmas auf das Befruchtungsvermögen lassen sich nur unter Betrachtung mehrerer Einflußfaktoren interpretieren.

Voranzustellen wäre, daß der Stichprobenumfang von 23 (24) Sauen für weitergehende Aussagen als zu gering einzuschätzen ist. Pro Variante wurden sechs Sauen besamt, die durch die Ovulationssynchronisation zwar einen einheitlichen Zyklusstand aufwiesen, aber aufgrund anatomischer, histologischer, endokrinologischer und verhaltensbiologischer Eigenheiten unterschiedlich auf die Behandlungen reagieren können. So schlägt sich auch die Tatsache, daß zwei Sauen (Nr. 1 und 2) der Gruppe, die Sperma des guten Befruchters mit homologem Seminalplasmazusatz zum Verdünner erhielt, nur Befruchtungsraten von 30,0 bzw. 32,4 % aufwiesen, gravierend auf das Durchschnittsergebnis der Gruppe (70,1 (? 31,3) % nieder. Die Wiederfindungsrate der Sau Nr. 1 betrug nur 58,8 %. Ein methodischer Fehler beim Spülen und Aufsuchen der Eizellen/Embryonen liegt in diesem Falle nahe. Beide Sauen zeigten; um diese Ergebnisse schon einmal vorwegzunehmen; im P<sub>4</sub>- Progesteronprofil einen deutlichen Anstieg der Werte ab dem Tag 0, eine termingerechte Ovulation scheint demnach stattgefunden zu haben. Der Besamungstermin war demzufolge zeitlich so gelagert, daß eine erfolgreiche Befruchtung einer größeren Anzahl von Eizellen möglich gewesen wäre. Weshalb die Befruchtungsraten der Sauen Nr. 1 und 2 so niedrig waren, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht

mehr im Einzelnen zu rekonstruieren. Dieser Umstand sollte aber bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Eine Sau (Nr. 14) der Gruppe, die Spermaportionen der Variante V/F erhielt, hatte nur unbefruchtete Eizellen. Lediglich acht Corpora lutea konnten an den Eierstöcken gezählt werden. Auch zeigte sich im P<sub>4</sub>- Progesteronprofil schon ab dem Tag -2 ein deutlicher Anstieg der Werte. Es ist also zu vermuten, daß die Ovulation trotz der Synchronisation schon früher als erwartet eintrat. Zudem wurde eine nur geringe Anzahl Eizellen ovuliert. Die Besamung erfolgte somit in diesem Falle zu spät, um eine erfolgreiche Befruchtung zu erzielen. Aufgrund dieser individuellen Besonderheiten der Sau Nr. 14 und der Tatsache, daß eine Reaktion der Probandin auf die Seminalplasmaapplikation unter diesen Umständen nicht zu beurteilen war, wurden deren Ergebnisse nicht mit in die Auswertung einbezogen.

Wir verwendeten in unserem Versuch lediglich Sperma und Seminalplasma zweier Eber. Möglicherweise wirken sich homologes und heterologes Seminalplasma nur unwesentlich verschieden auf Eigenschaften der Spermien dieser beiden Eber und die Vorgänge im weiblichen Genitale aus. Langfristige Laborversuche im Vorfeld mit Ejakulaten dieser Vatertiere waren aus organisatorischen Gründen nicht möglich. Die Eigenmotilität der Samenzellen ist nur ein Bestandteil des Faktorenkomplexes, von dem der Befruchtungserfolg abhängt. Die Beweglichkeit der Spermien spielt lediglich innerhalb des Eileiters und bei der Durchdringung der Eizelle eine entscheidende Rolle in der Kette der Ereignisse, die zur Befruchtung führen. Einflußreicher hinsichtlich des Transportes der Samenzellen im weiblichen Genitale sind passive Mechanismen (Mann et al., 1956; Alanko, 1974; Blandau u. Gaddum-Rosse, 1974; Viring u. Einarsson, 1980a,b; Claus et al., 1987; Houang-Vu, 1987; Andrade Moura, 1988; Peña Alfaro, 1988; Rath et al., 1989; Willmen, 1989; Rabeler, 1990; Waberski, 1994; Guilen Soares, 1995; Stähr u. Nehring, 1997). Für eberspezifische Wirkungen gibt es diesbezüglich noch keine Erkenntnisse.

Unter Mitbeachtung des Vorangestellten lassen sich folgende Aussagen treffen: Die durch Besamungen mit flüssigkonserviertem Sperma, welches einen zusätzlichen Anteil Seminalplasma guter Befruchter im Verdünner enthielt, erreichten hohen Befruchtungs- und Trächtigkeitsraten weisen eine Eignung eines derartigen Verdünnerzusatzes aus. Die natürlichen Inhaltsstoffe des Seminalplasmas beeinflussen das Befruchtungsgeschehen im weiblichen Genitale positiv. So wiesen schon Alanko (1974), Viring u. Einarsson (1980 a,b), Claus et al., (1987), Andrade Moura (1988), Peña Alfaro (1988), Rath et al. (1989), Weitze et al. (1989), Willmen (1989), Rabeler (1990) und Waberski (1994) nach, daß Seminalplasma in der Lage ist, durch Anregung

der Uterusmotorik und Erschlaffung des Eileiteristhmus den passiven Spermientransport zum Ort der Befruchtung zu fördern. Dabei spielen Seminalöstrogene eine besondere Rolle (Hoang-Vu, 1987; Claus et al., 1987; Dierkes, 1991; Wilkes, 1991). Inwieweit andere Inhaltsstoffe wirksam sind, läßt sich mit derzeitigen Erkenntnissen noch nicht eindeutig sagen. Vermutlich sind aber auch Nährstoffe, die nur in der natürlichen Substanz Seminalplasma vorkommen, von Bedeutung. Sie wären durch eine optimalere Ernährung des Spermiums in der Lage, dieses beim Vorgang der Befruchtung der Eizelle zu unterstützen, wo die aktive Bewegung ein entscheidendes Kriterium ist. Damit wirkt das Seminalplasma guter Befruchter regulativ auf den zeitlichen Ablauf des Befruchtungsvorganges und fördert das Zusammentreffen von Ei- und Samenzelle im Stadium ihrer vollen Befruchtungsfähigkeit.

Aber auch Seminalplasma schlechter Befruchter konnte in unserem Versuch als Zusatz zum Eberspermaflüssigverdünner positive Einflüsse auf das Befruchtungsgeschehen erweisen, unter der Voraussetzung, daß nur homologe Spermien damit konserviert wurden. Die hohe Befruchtungsrate von 82,9 ( $\pm$  29,2) %, die durch Besamungen mit Spermien eines im Feld schlechten Befruchters, welche mittels Flüssigverdünner mit Zusatz von eigenem Seminalplasma (V/V) konserviert worden sind, erreicht werden konnten, sind möglicherweise Resultat des Vorhandenseins eines wesentlich höheren Seminalplasmaanteils in der Spermaportion als bei routinemäßiger Verdünnung von Ejakulaten. Es ist denkbar, daß die Ursache der schlechten Befruchtungsleistungen von einigen Ebern in der hohen Ausverdünnung des eigenen Seminalplasmas liegt. Den Spermien dieser Eber könnten bei Konservierung mit industriemäßig hergestellten Medien für ihren Stoffwechsel wichtige Substanzen fehlen. Das daraus entstehende Energiedefizit beeinträchtigt das Befruchtungsvermögen dieser Spermien. Es ist nicht auszuschließen, daß Spermien schlechter Befruchter empfindlicher auf die hohe Ausverdünnung von Seminalplasma reagieren als Spermien guter Befruchter.

Befruchtungsraten von lediglich 53,0 ( $\pm$  34,7) % konnten in unserem Versuch erreicht werden, wenn heterologe Spermien mit einem Verdünner, der einen Zusatz von Seminalplasma schlechter Befruchter (F/V) enthielt, konserviert wurden. Dabei könnten Wechselwirkungen zwischen den Spermien und dem heterologen Seminalplasma eine Rolle spielen, wie sie schon Heydorn u. Pauffler (1976), Heydorn et al. (1977), Conrad u. Zeuner (1978) und Seidl u. Heydorn (1978) in verschiedenen Mischspermakombinationen schilderten. Dabei soll es sich um Reaktionen individualspezifischer Faktoren der Spermien mit korrespondierenden Faktoren des Plasmas handeln. Derartige Vorgänge würden die Eigenmotilität und Stoffwechselprozesse der Spermien und somit eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle hemmen. Die Verwendung von Seminalplasma als Verdünnerzusatz bedarf demnach gezielter Eberkombinationen. Weitere

Untersuchungen müßten folgen, um zu prüfen, ob das Seminalplasma guter Befruchter generell einen positiven Einfluß auf das Befruchtungsgeschehen ausübt oder ob nach weiteren Kriterien gesucht werden muß, die ein als Verdünnerzusatz geeignetes Seminalplasma auszeichnen.

Die in unserem Versuch erreichten Befruchtungsraten sind mit denen anderer Arbeiten (Andrade Moura, 1988; Peña Alfaro, 1988; Willmen, 1989; Rabeler, 1990; Guilen Soares, 1995) nur unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Methoden vergleichbar. Wir verwendeten Seminalplasma als Verdünnerzusatz (mit einem Anteil von 30 %) und inseminierten derartig flüssig-konserviertes Sperma; Andrade Moura (1988), Peña Alfaro (1988), Willmen (1989), Rabeler (1990) und Guilen Soares (1995) infundierten 50 bzw. 60 ml Seminalplasma vor der eigentlichen Insemination. Sie erreichten mit diesem Verfahren, ungeachtet zum Teil unterschiedlicher Spermiosierungen, Befruchtungsraten von 92,1; 90,0; 95,0; 85,2 bzw. 94,5 %, die somit weit über der in eigenen Versuchen erzielten (70,6 %) liegen. Auch die Gruppe mit der höchsten Befruchtungsrate (82,9 %) erlangt nicht die Werte die o.g. Autoren (Andrade Moura, 1988; Peña Alfaro, 1988; Willmen, 1989; Rabeler, 1990; Guilen Soares, 1995) ermittelten.

Dabei hat mit Wahrscheinlichkeit auch die Anwendung der Ovulationssynchronisation zu Unterschieden zwischen den von uns und den von o.g. Autoren (Andrade Moura, 1988; Peña Alfaro, 1988; Willmen, 1989; Rabeler, 1990; Guilen Soares, 1995) erreichten Befruchtungsraten geführt. So erbringen hormonbehandelte Sauen zwar eine höhere Ovulationsrate als spontanrauschende (Jacob u. Elze, 1989), jedoch ist dadurch der Ovulationszeitraum verlängert (Cheng, 1981), was mit einem Anstieg der Anzahl der degenerierten und von der Norm abweichenden Embryonen, insbesondere in den ersten drei Tagen p.ovul. einhergeht (Dziuk u. Polge, 1962; Jacob u. Elze, 1989). Bei Tieren mit mehr als 36 Ovulationen stellte Hunter (1966) am vierten Tag p.c. starke Embryonenverluste fest. Für synchronisierte Jungsauen geben Jacob u. Elze (1989) im Mittel 19,7 Ovulationen an, für spontan rauschende 14,7. Cheng (1981) nennt für hormonbehandelte Jungsauen Durchschnittswerte von 22,6 (? 10,6) Ovulationen. Peña Alfaro (1988), Willmen (1989), Rabeler (1990) und Guilen Soares (1995) besamten Jungsauen in natürlicher Rausche und ermittelten 183 C. l. bei 18 Sauen (entspr. 10,2 Ovul./Sau), 372 C. l. bei 30 Sauen (entspr. 12,4 Ovul./Sau), 231 C. l. bei 18 Sauen (entspr. 12,8 Ovul./Sau) bzw. 13,9 Ovulationen pro Sau, wir hingegen 24,6; wodurch die Einflußgröße „Ovulationssynchronisation“ deutlich gemacht wird. Die geringere Befruchtungsrate, die wir in unserem Versuch erzielten, kann möglicherweise durch den aufgrund der hohen Ovulationsrate hervorgerufenen Anstieg der Anzahl der anomalen Embryonen bedingt sein und wäre dann nur relativ.

Denkbare Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der eigenen und anderer Arbeiten (Andrade Moura, 1988; Peña Alfaro, 1988; Willmen, 1989; Rabeler, 1990; Guilen Soares, 1995) ist auch die Sperma- und Seminalplasmaapplikation. Da wir Seminalplasma als Verdünnerezusatz verwendeten, kamen Spermien und heterologes Seminalplasma unmittelbar in Berührung, was laut Heydorn u. Pauffler (1976) sowie Seidl u. Heydorn (1978) Wechselwirkungen einschließen kann. Durch die zeitlich getrennte Verabreichung von Spermien und Seminalplasma in den Versuchen von Andrade Moura (1988), Peña Alfaro (1988), Willmen (1989), Rabeler (1990) und Guilen Soares (1995) war ein direkter Kontakt zwischen beiden Komponenten verhindert worden.

Ziel der Arbeiten o.g. Autoren (Andrade Moura, 1988; Peña Alfaro, 1988; Willmen, 1989; Rabeler, 1990; Guilen Soares, 1995) und Grund deren methodischen Herangehensweise war die Untersuchung des Einflusses des Seminalplasmas auf die Ovulationsvorverlegung. Eine solche ist lediglich bei intrazervikaler Seminalplasmaapplikation zu Beginn der stehenden Rausche zu erwarten; später laufen die Vorgänge, die zur Ovulation führen, schon automatisiert ab (Weitze et al., 1990; Waberski, 1995). Eine getrennte Verabreichung von Sperma und Seminalplasma besitzt jedoch keine Praxisrelevanz, da ein zu großer Aufwand gefordert wäre. Die Bedeutung von Seminalplasma bzw. Bestandteile dessen als Verdünnerezusatz in der Praxis war hingegen Anliegen unserer Untersuchungen. Es müßten also weiterführende Forschungen getätigt werden, um unsere Ergebnisse zu überprüfen und damit umfassendere Antworten auf die aus der Praxis kommenden Fragen geben zu können.

Desweiteren erfolgte eine rektale Kotprobenentnahme bei den 24 Jungsauen des Besamungsversuches. Ziel war es, mögliche differenzierte Reaktionen der Sauen auf die Applikation von Seminalplasma guter bzw. schlechter Befruchter darstellen zu können, eventuelle Zyklusanomalien zu erfassen und den Verlauf von Progesteronkonzentrationen im Kot von synchronisierten Jungsauen zu charakterisieren. Die Untersuchungen erfolgten durch Bestimmung von P<sub>4</sub>-Progesteron. Bisher gibt es zu Progesteronwerten beim Schwein in erster Linie Angaben, die aus dem Gehalt im Blutplasma ermittelt wurden (Stabenfeldt et al., 1969; Hendricks et al., 1972; Van de Wiel et al., 1981; Elsaesser, 1982; Helmond et al., 1986; Thilander u. Rodriguez-Martinez, 1989; Dierkes, 1991; Wilkes, 1991).

Die Hormonanalyse ließ einen auf die beginnende Gelbkörperaktivität zurückzuführenden Anstieg der mittleren P<sub>4</sub>-Progesteronwerte aller Sauen ab dem Tag 0 (Ovulation) verzeichnen. Im peripheren Blut stellten Van de Wiel et al. (1982) bereits am zweiten Tag nach dem LH-Peak erhöhte Progesteronwerte fest. Stabenfeldt et al. (1969) sprachen von einem Anstieg am drit-

ten und vierten Tag nach Östrusbeginn, welchem ein steiles Anwachsen der Werte am siebenten und achten Tag folgt.

Ein Vergleich der durchschnittlichen P<sub>4</sub>-Progesteron-Konzentrationen der vier Sauengruppen unseres Versuches zeigte, daß die Werte der Sauengruppe, die Sperma der Variante F/V erhielt, stets niedriger waren als die der anderen Gruppen. Erst ab dem Tag 1 wurden in dieser Sauengruppe im Mittel mehr als 100,0 ng P<sub>4</sub>- Progesteron pro g Kot erreicht. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die Sauen, die Sperma der Variante F/V erhielten, zudem die von allen niedrigste Ovulations- und Befruchtungsrate erzielten. Es scheinen zufällig in dieser Gruppe mehrere Tiere mit einem individuell niedrigen Progesteronspiegel zu sein, was auch mit der Erscheinung der geringen Ovulationsrate einhergeht. Ob die zudem geringe Befruchtungsrate unter anderem auch eine Reaktion auf die Applikation des Spermis des guten Befruchters unter Zusatz des Seminalplasmas schlechter Befruchter zum Verdünner sein kann, läßt sich anhand dieser Untersuchungen kaum sagen. Bei einer niedrigen Ovulationsrate wäre eine geringe Anzahl anomaler Embryonen zu vermuten (Dziuk u. Polge, 1962; Jacob u. Elze, 1989), was folglich eine höhere Befruchtungsrate bewirken würde. Die trotzdem geringe Befruchtungsrate könnte eine Antwort auf die Applikation dieser Sperma-Seminalplasma-Kombination sein. Jedoch ist auch daran zu denken, daß die Probandinnen dieser Sauengruppe eine große Anzahl befruchtungsunfähiger Eizellen freigesetzt haben könnten. Die Sauengruppen, die Sperma mit zusätzlichem Seminalplasmaanteil guter Befruchter (F/F, V/F) im Verdünner erhielten, erbrachten mit 629,0 bzw. 519,5 ng/G die höchsten P<sub>4</sub>- Progesteronwerte am Tag 3.

Aus der Literatur ist bekannt, daß eine intrauterine Infusion von Seminalplasma zu einem Anstieg der PGF<sub>2</sub>?-Konzentrationen in der Uterusvene führt (Claus et al., 1987; Zöttl, 1988, Dierkes, 1991; Wilkes, 1991). Dies wurde als spezifischer Effekt der im Seminalplasma enthaltenen Östrogene erklärt. Diese können die Wirkung der intrafollikulär gebildeten Prostaglandine auf die Ovulationsauslösung verstärken (Zöttl, 1988; Claus, 1989), jedoch ist ein derartiger Mechanismus nur bei Seminalplasmaapplikationen zum Zeitpunkt des Beginns der Brunst wirksam (Weitze et al., 1990a; Waberski, 1995). Die Seminalplasmagaben in unserem Versuch hätten, um die Ovulation und damit die Gelbkörperbildung sowie Progesteronsekretion entscheidender beeinflussen zu können, 24 Stunden früher erfolgen müssen. Dabei wäre aber eine Aussage über die Wirkungen des Seminalplasmas als Verdünnerzusatz nicht möglich gewesen. Dabei wäre es vielleicht von Nutzen, wenn der Östrogenanteil im Seminalplasma der eingesetzten Eber bestimmt werden würde, da dieser nach jetzigen Erkenntnissen eine wesentliche Rolle bei den Seminalplasmaeffekten spielt (Houang-Vu, 1987; Claus et al., 1987;



Zöttl, 1988, Claus, 1989; Everwand, 1990; Weitze et al., 1990b; Dierkes, 1991; Niemann, 1991; Wilkes, 1991; Waberski, 1994).

Die zwischen den Einzeltieren sich unterscheidenden Progesteronprofile sind Ergebnis der nicht einheitlichen Ausgangspositionen hinsichtlich des Zyklusstandes. Nach Ovulationssynchronisation der Tiere wurde letzterer auf ein relativ übereinstimmendes Niveau gebracht, wobei jedoch individuelle Einflüsse nicht völlig zu eliminieren sind. Die Sau Nr. 9 zeigte keinen Anstieg der Progesteronwerte um den Tag 0 herum. Die von diesem Tier erreichte Befruchtungsrates liegt mit 57,9 % unter dem Durchschnitt. Von den 19 wiedergefundenen Eizellen/Embryonen waren aber 11 normal entwickelt. Eine entsprechend dem Ovulationsregime zeitgerechte Freisetzung der Eizellen hat somit stattgefunden. Ein gleiches Verhalten der Progesteronwerte um den Tag 0 war bei der Sau Nr. 21 zu beobachten. In deren Progesteronprofil sind jedoch drei ausgesprochen hohe Gipfel zu sehen. Die niedrige Befruchtungsrates von 26,3 % deutet in diesem Fall auf eine im Rahmen der Ovulationssynchronisation nicht termingerechte Freisetzung der Eizellen hin. Ein Ansteigen der Progesteronwerte schon ab dem Tag -2 war bei den Sauen Nr. 13 und 14 zu beobachten. Die Probandin Nr. 13 wies eine Befruchtungsrates von 51,7 % auf. Eine verfrühte Ovulation wäre demnach zu vermuten. Keine der acht ovulierten Eizellen der Sau Nr. 14 war befruchtet. Dies deutet auf eine abweichende Reaktion der Sau auf die Ovulationssynchronisation hin. Individuelle Besonderheiten in physiologischer bzw. endokrinologischer Hinsicht sind wahrscheinlich. Das abweichende Verhalten des Progesteronanstieges um den Ovulationszeitpunkt herum bei den Probanden (Sauen Nr. 9, 13, 14, 21) kann kaum als eine Reaktion auf die Applikation von Seminalplasma guter bzw. schlechter Befruchter gewertet werden. Auch hierfür sind als Ursachen individuelle Faktoren anzunehmen. Die Bestimmung des Kotprogesterongehaltes ist aber als geeignete Methode anzusehen, mit welcher das Zyklusgeschehen der Sau kontrolliert werden kann.

Desweiteren ist aufgrund der zum Teil recht beträchtlichen Schwankungen des Progesteronspiegels einzelner Tiere innerhalb kurzer Zeiträume; auch nur eines Tages; zu vermuten, daß Progesteron mit dem Kot nicht kontinuierlich ausgeschieden wird. Deshalb wäre es für folgende Versuche ratsam, mit größeren Stichprobenumfängen zu arbeiten und die Kotproben in kürzeren Abständen zu entnehmen, um möglicherweise so den Verlauf detaillierter untersuchen zu können.

Ziel des **Vorversuches der Versuchsreihe II** war es zu untersuchen, ob Unterschiede hinsichtlich der Wirkung verschiedener Seminalplasmaanteile im Verdünnermedium (0, 10, 20 bzw. 40 %) auf die Spermienmotilität existieren.

Die Spermienmotilität in den Proben, die mittels Verdünner mit Seminalplasmazusatz (B, C und D) konserviert worden sind, war nach 72-stündiger Spermalagerung im Haltetest signifikant höher als in denen, die Verdünner ohne Seminalplasmaanteil (A) enthielten. Zwischen den Varianten mit Seminalplasmaanteil im Verdünner gab es hinsichtlich des Anteils motiler Spermien keine statistisch gesicherten Unterschiede. Dementsprechende Ergebnisse lieferten auch die Thermoresistenztests nach 24- bzw. 72-stündiger Spermalagerung. Hier zeigte die Variante ohne Seminalplasmazusatz zum Verdünnermedium (A) zu jedem Zeitpunkt der Untersuchungen signifikant geringere Motilitätswerte als die Varianten mit Seminalplasmaanteil, zwischen denen es wiederum keine statistisch gesicherten Unterschiede gibt.

In Anbetracht dieser Ergebnisse scheint ein Seminalplasmazusatz zum Eberspermaverdünner bezüglich der Konservierbarkeit und der Erhaltung der Spermienmotilität über 72 Stunden positiv wirksam zu sein; vorausgesetzt, das Seminalplasma stammt aus Ejakulaten mit hohen Motilitätswerten. Eine weitere Verbesserung durch Erhöhung des Seminalplasmaanteils von 10 auf 20 bzw. 40 % konnte nicht erreicht werden. Bestimmte natürliche Inhaltsstoffe des Seminalplasmas scheinen somit in der Lage zu sein, den Stoffwechsel der Eberspermien über einen längeren Zeitraum zu aktivieren und eine erhöhte Motilität zu induzieren. Dies beweisen auch die hohen Motilitätswerte im Halte- (60 % und mehr) sowie im Thermoresistenztest (Werte um 70 %) nach 72-stündiger Lagerung.

Hinweise auf einen konzentrationsabhängigen Einfluß von Seminalplasma im Verdünner gaben schon Tso u. Lee (1980). Durch Waschen in Tris-HCl immotil gewordene Eberspermien versetzten sie mit Puffern, die unterschiedliche Seminalplasmaanteile enthielten. Der Effekt der Motilitätswiederherstellung setzte bereits bei 0,1 % der originären Seminalplasmakonzentration ein, die ursprüngliche Motilität wurde aber erst bei 10 % erreicht.

Thematisch den eigenen ähnlich gelagerte Versuche gibt es von Ahlemeyer et al. (1991), Braun et al. (1994) und Rommel et al. (1995) mit Sperma vom Hengst. Bei Ahlemeyer et al. (1991) nahm die Auftaumotilität mit zunehmendem Seminalplasmaanteil (5 %, 10 %, 15 %) signifikant ab, aber auch das Absaugen des gesamten Flüssigkeitsüberstandes (98 %, somit 2 % Seminalplasma) wirkte sich ähnlich reduzierend auf die Beweglichkeit der Spermien aus. Bei Braun et al. (1994) zeigte die Variante mit dem höchsten Seminalplasmaanteil (0 %, 5 %, 25 %) über den gesamten Kontrollzeitraum (48 h) hinweg bessere Motilitätswerte als die anderen. Rommel et al. (1995) stellten bei einem Seminalplasmaanteil von 25 % im Verdünner eine Erhöhung der

Geschwindigkeit der Vorwärtsbewegung fest. Vitt (1996) konnte bei Versuchen mit gefrierkonserviertem Bullensperma eine Verbesserung der Spermienmotilität durch Seminalplasmazusatz erreichen.

In Auswertung unserer Versuche läßt sich vermuten, daß ein Anteil von 10 % Seminalplasma im Verdünner schon ausreichend ist, um diesen motilitätsstimulierenden Effekt zu provozieren. Die Ergebnisse der Untersuchungen unterstreichen die Forderung, daß man in der Eberspermproduktion beim Verdünnungsprozeß der Ejakulate dem Seminalplasma mehr Beachtung schenken sollte. Weitere Forschungen zur Konzentrationsabhängigkeit der motilitätsstimulierenden Wirkung wären mit Sicherheit von praktischem Interesse. Ob aber ein direkter Seminalplasmazusatz zum Verdünner praktische Bedeutung erlangen kann, ist fraglich. Dabei spielen mit hoher Wahrscheinlichkeit ökonomische und hygienische Gesichtspunkte eine Rolle.

An dieser Stelle sei aber der Einsatz des Bovinen Serumalbumins in der Ebersamenflüssigkonservierung erwähnt, der den bisher größten Erfolg bei den Bemühungen, die Überlebensrate der Spermien in flüssigkonserviertem Sperma zu verbessern, darstellt (Stähr u. Nehring, 1997). Infolge einer Reihe von Untersuchungen kann dem BSA eine motilitätsstimulierende und -konservierende Wirkung zugeschrieben werden (Lindholmer u. Eliasson, 1974; Baas et al., 1983; Shannon et al., 1983; Schaap, 1987; Waberski, 1988; Dirksen, 1991). Aufgrund des Vergleichs des BSA mit vitalen Seminalplasmakomponenten (Lindholmer, 1974; Harrison et al., 1982; Schaap, 1987) ist am ehesten vorstellbar, daß man nach Identifizierung der motilitätsstimulierenden Faktoren des Seminalplasmas, diese synthetisiert und dem Flüssigverdünner beigibt (Waberski, 1996) und so möglicherweise einen weiteren bedeutsamen Schritt in der Entwicklung der Konservierungsmedien für Ebersperma gehen kann.

Der Besamungsversuch der Versuchsreihe II (**Feldversuch**) diente der Untersuchung der Wirkungen eines bestimmten Seminalplasmaanteils im Verdünnermedium auf die Befruchtungsergebnisse unter Praxisbedingungen. In Anbetracht der Resultate des Vorversuches wurden hierfür als Versuchsverdünnervarianten das BTS-Medium ohne sowie mit 40 % Seminalplasmaanteil ausgewählt. Zwar ergaben sich zwischen den verschiedenen Seminalplasmakonzentrationen (10 %, 20 %, 40 %) *in vitro* keine signifikanten Unterschiede, aufgrund einer Verdeutlichung möglicher *In-vivo*-Unterschiede zwischen dem Verdünner ohne und dem mit Seminalplasma führten wir den Feldversuch mit diesen Varianten durch.

Zudem wurde jeweils eine Probe jeder Spermaportionsvariante im Haltetest und im Thermoresistenztest jeweils nach 24- bzw. 72-stündiger Spermalagerung untersucht, um parallel zu den

Besamungsergebnissen, Hinweise zum Motilitätsverhalten derartig konservierter Spermien unter Praxisbedingungen zu erhalten.

Im **Versuchsteil 1** (Varianten E und F) waren die Motilitätswerte der Variante ohne Seminalplasmazusatz zum Verdünner (E) im Haltetest nach 24-stündiger Spermalagerung geringfügig besser als die der Variante mit 40 %igem Seminalplasmaanteil (F) (Seminalplasma von guten Befruchtern im Feld). Die Unterschiede ( $p = 0,05$ ) waren jedoch nicht statistisch zu sichern. Nach 72-stündiger Spermalagerung waren jedoch in den Proben der Variante ohne Seminalplasmazusatz zum Verdünner (E) signifikant mehr Spermien beweglich als in denen der Variante mit Seminalplasmaanteil (F).

Im Thermoresistenztest nach einer Lagerungsdauer von 24 Stunden hingegen erbrachten die Proben der Versuchsvariante mit Seminalplasmazusatz zum Verdünner (F) zu jedem Untersuchungszeitpunkt höhere Spermienmotilitätswerte als die der Spermaproben, die mit dem seminalplasmafreien Verdünner (E) konserviert worden waren. Die Unterschiede sind statistisch gesichert ( $p = 0,05$ ). Ein anderes Ergebnis wurde nach 72-stündiger Spermalagerung erreicht, wo die Motilitätswerte in der Variante mit seminalplasmafreiem Verdünner (E) signifikant höher waren als die der Vergleichsvariante (F).

Auffallend war der starke Abfall der Motilitätswerte der Spermien in beiden Varianten vom Beginn bis zum Ende des Thermoresistenztests. Lediglich im Thermoresistenztest nach 72-stündiger Spermalagerung war eine relativ lange Überlebensdauer der Spermien bei Konservierung mit BTS ohne zusätzlichen Seminalplasmaanteil ersichtlich. Dabei ist aber zu beachten, daß die Spermienmotilität schon zu Beginn des Thermoresistenztests mit 39,4 % (E) bzw. 26,2 % (F) recht niedrig war.

Möglicherweise waren in dem zugesetzten Seminalplasma dieser Eber nur geringe Mengen der Substanzen enthalten, die die Motilität stimulieren und aufrechterhalten. Nach 72-stündiger Lagerung war gegenüber der Variante ohne zusätzlichen Seminalplasmaanteil im Verdünner kein positiver Effekt mehr erkennbar. Die stimulierenden Stoffe, Nährstoffe oder Katalysatoren, waren zu diesem Zeitpunkt aufgebraucht. Es ist jedoch auch zu erwähnen, daß das Seminalplasma von Ebern stammt, die aufgrund ihrer guten Befruchtungsergebnisse im Feld und nicht ihrer Spermienmotilitätswerte selektiert wurden. Es wäre also denkbar, daß in diesem Seminalplasma spermienmotilitätsstimulierende Stoffe nicht in dem Maße vorhanden waren, um Fremdspermien ausreichend zu aktivieren. Die relativ niedrigen Motilitätswerte der Spermien in beiden Verdünnervarianten sowohl im Halte- als auch in den Thermoresistenztests deutet aber auch auf eine nicht zufriedenstellende Spermaqualität hin. Dies verdeutlicht auch der Vergleich mit Ergebnissen der anderen Laboruntersuchungen dieser Arbeit. Ob dies durch

eine zu hohe Belastung der Besamungseber oder möglicherweise Mängel in der Fütterung begründet ist, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden.

Der Grund für die tendentiell gegensätzlichen Ergebnisse des Halte- und des Thermoresistenztests nach 24-stündiger Spermalagerung ist am ehesten in der unterschiedlichen Methode zu suchen. Im Haltetest werden die Spermien aus der bei 17°C gelagerten Probe entnommen und auf ein bei 40°C vortemperierten Objektträger gegeben; im Thermoresistenztest erfolgt letzteres nach längerer Inkubation der Spermien bei 40°C. Die Reaktionen der Spermien auf diese Einflüsse können demnach unterschiedlich sein. Die Ergebnisse der Thermoresistenztests sollten als aussagekräftiger betrachtet werden als die der Haltetests, da sie unter dem Milieu im weiblichen Genitale mehr entsprechenderen Bedingungen ermittelt worden sind.

Etwas anders stellten sich die Ergebnisse im **Versuchsteil 2** (Varianten E und G) dar. Hier wies die Variante mit Seminalplasmazusatz zum Verdünner (G) (Seminalplasma aus Ejakulaten eines Ebers mit hohen Spermienmotilitätswerten) sowohl im Haltetest nach 24- als auch nach 72-stündiger Spermalagerung höhere Motilitätswerte auf als die ohne Seminalplasmaanteil (E). Die Differenzen sind aber statistisch nicht abzusichern ( $\alpha = 0,05$ ). Im Thermoresistenztest ist der Anteil motiler Spermien in den Proben der Variante mit Seminalplasmaanteil im Verdünner (G) sowohl nach 24- als auch nach 72-stündiger Spermalagerung signifikant höher als in denen der Variante E. Die Spermienmotilitätswerte in diesem Versuchsteil waren relativ hoch. Zwar fielen die Werte in beiden Thermoresistenztests vom Beginn bis zum Ende ab, die Überlebensdauer ist aber dennoch als gut zu beurteilen.

Das Seminalplasma für diesen Versuchsteil stammt von einem Eber, der Ejakulate mit Spermienmotilitätswerten zwischen 80 und 90 % lieferte. Dieses Seminalplasma erwies sich in der Lage eine starke motilitätsinitierende Wirkung auf Spermien in Fremdejakulaten auszuüben. Die bislang diskutierten spezifisch motilitätsstimulierenden Substanzen (Nehring et al., 1994) scheinen somit in diesem Seminalplasma in ausreichenden Mengen enthalten zu sein, um über längere Zeit einen positiven Effekt auf die Spermienmotilität auszuüben.

Betrachtet man die Gesamtheit der Laborergebnisse dieser Versuchsreihe, so läßt sich sagen, daß auch unter Praxisbedingungen durch eine Konservierung des Spermas mit einem seminalplasmahaltigen Verdünner die Spermienmotilität über einen Lagerungszeitraum von mindestens 24 Stunden verbessert werden kann. Ein darüber hinaus anhaltender Effekt ( bis zu 72 Stunden) war aber nur mittels Seminalplasma bestimmter Eber zu erreichen. Dies deutet auf eberspezifische Wirkungen hin.

Die Befruchtungsergebnisse des **Feldversuches** lassen sich aufgrund der einheitlichen Voraussetzungen hinsichtlich Besamungstermin und Besamer ohne Einschränkung miteinander vergleichen. Durch die Anwendung der Ovulationssynchronisation wurde die Freisetzung der Eizellen zeitlich gleichgeschaltet und die Besamung damit terminisiert. Dadurch entstanden gute Voraussetzungen für eine erfolgreiche Befruchtung, was durch den Umstand, daß sämtliche Inseminationen von einem erfahrenen Besamer durchgeführt worden waren, begünstigt wurden.

Von den 77 Altsauen des **Versuchsteils 1** (Varianten E und F), die Sperma, welches mit dem seminalplasmafreien Verdünner (E) konserviert wurde, erhielten, ferkelten 88,3 % ab. Die Besamungen mit Spermaportionen, welche den seminalplasmahaltigen Verdünner (F) enthielten, erbrachten eine etwas geringere Abferkelrate von 85,7 %. Auch die Zahl der insgesamt geborenen Ferkel je Wurf war in der Sauengruppe, die Sperma ohne Seminalplasmazusatz bekam, etwas höher als in der anderen Versuchsgruppe (9,7 (? 4,6) gegenüber 9,3 (? 4,7)). Bezogen auf 100 Erstbesamungen wurden nach Besamungen mit Sperma, das mit seminalplasmafreiem Verdünner konserviert worden war, in diesem Versuchsteil 1 59,5 Ferkel mehr geboren als nach Besamungen mit Sperma mit seminalplasmahaltigem Verdünner. Etwas anders verhielten sich die Ergebnisse im **Versuchsteil 2**, wo zwar auch die Abferkelrate in der Sauengruppe, die Sperma mit seminalplasmahaltigem Verdünner (G) erhielt, mit 85,7 % gegenüber 90,5 % geringfügig niedriger ist, aber die Wurfgröße in dieser Gruppe (G) mit 9,5 (? 4,8) gegenüber 8,4 (? 4,0) um 1,1 Ferkel höher ist. Dadurch wurden, bezogen auf 100 Erstbesamungen, im Versuchsteil 2 nach Besamungen mit Sperma, welches mittels seminalplasmahaltigem Verdünner konserviert wurde, 54,0 Ferkel mehr geboren als nach Besamungen mit Sperma mit seminalplasmafreiem Verdünner. Es liegen jedoch in beiden Versuchsteilen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen der jeweiligen Sauengruppen vor.

Letzteres liegt auch darin begründet, daß der Feldversuch in einem Bestand mit sehr stabilen und hohen Fruchtbarkeitsergebnissen durchgeführt wurde. Die Kontroll-Tiere, die Sperma ohne Seminalplasmazusatz erhielten, erbrachten mit Abferkelraten von 88,3 bzw. 90,5 % und Ferkelindices von 838,6 bzw. 760,2 schon ausgesprochen gute Ergebnisse, die nicht mehr deutlich verbessert werden können. Zukünftige ähnliche Versuche sollten daher vielleicht an Problembeständen oder in Zeiten verringerter Fruchtbarkeit (Sommermonate) durchgeführt werden, um eventuelle Unterschiede deutlicher darstellen zu können.

Bemerkenswert bleibt aber, daß hinsichtlich der Wurfgröße (IGF/W) im Versuchsteil 2 durch den erhöhten Seminalplasmaanteil im Verdünner positive Tendenzen erkennbar sind. So wurden je Wurf 1,1 Ferkel mehr geboren, wenn mit Sperma besamt wurde, welches mit einem

Verdünner konserviert war, der einen Seminalplasmaanteil von 40 % enthielt. Dieses Seminalplasma war durch einen starken motilitätsfördernden Effekt auf Spermien in Fremdejakulaten charakterisiert. Die höhere Eigenbeweglichkeit der Spermien und möglicherweise auch die zusätzliche Bereitstellung natürlicher Nährstoffe aus dem Seminalplasma tragen im positiven Sinne zu einer erfolgreichen Befruchtung bei. Die dazu additiv wirkenden stimulierenden Einflüsse von Seminalplasma auf das weibliche Genitale (Viring u. Einarsson, 1980a; Claus et al., 1987; Houang-Vu, 1987; Zöttl, 1988) erzielen in der Summe günstige Voraussetzungen beim Zusammentreffen von Ei- und Samenzelle im Zustand der vollen Befruchtungsfähigkeit. Daraus resultiert die Möglichkeit, daß mehr ovulierte Eizellen erfolgreich befruchtet werden.

Hingegen hatte ein Zusatz von Seminalplasma von Ebern, die zwar gute Befruchtungsergebnisse im Feld gezeigt hatten, aber deren Seminalplasma nur kurzweilig (24 h) einen motilitätsfördernden Effekt auf Spermien in anderen Ejakulaten aufwies, keinen positiven Einfluß auf die Wurfgröße. Die Ergebnisse sind durch weitere Untersuchungen zu überprüfen.

Einen Seminalplasmaeinfluß auf die Trächtigkeitsrate und die Anzahl der Feten vermutet Stampa (1989), schlußfolgert jedoch aus ihren Ergebnissen, daß eine Seminalplasmaanwendung weniger die Eigenschaften aufgetauter Spermien direkt als vielmehr den passiven Spermientransport im weiblichen Genitale und das Ovulationsgeschehen beeinflusst.

In unseren Versuchen konnte ein Effekt von Seminalplasma auf Spermieeigenschaften nachgewiesen werden. Wir führten die Untersuchungen jedoch an flüssigkonserviertem Sperma durch. So könnte die Konservierungsform ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Hinweise darauf erbrachte auch die Gegenüberstellung von Ergebnissen der Versuche, die Ahlemeyer et al. (1991), Braun et al. (1994) und Rommel et al. (1995) mit gefrier- bzw. flüssigkonserviertem Hengstsperma durchführten.

Die generelle intrazervikale Seminalplasmaapplikation kann die Befruchtungsergebnisse bei Stampa (1989) aber auch schon soweit positiv beeinflusst haben, daß ein Effekt des seminalplasmahaltigen Resuspensionsmediums nicht mehr deutlich werden konnte. Letzteres zeigte sich bei Untersuchungen von Romeney et al. (1974) seminalplasmafreien Medien hinsichtlich des Anteils motiler und morphologisch normaler Spermien überlegen. Auch Einarsson u. Viring (1973b) schrieben dem Seminalplasma eine Schutzfunktion durch Anlagerung von Proteinen an die Spermienoberfläche zu.

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit in ihrer Gesamtheit, so zeigt sich, daß Seminalplasma aus Ejakulaten mit hohen Motilitätswerten eine steigernde Wirkung auf die Motilität

von Spermien aus Fremdejakulaten hat. Als Verdünnerzusatz hatte derartige Seminalplasma bezüglich der Spermakonservierung und Erhaltung der Spermienmotilität über 72 Stunden einen positiven Einfluß. Dabei scheint ein Seminalplasmaanteil von 10 % im industriemäßig hergestellten Verdünner ausreichend zu sein. Seminalplasma aus Ejakulaten guter Befruchter konnte als Verdünnerzusatz eine positive Wirkung auf die Spermienmotilität nur über 24 Stunden aufrechterhalten. Soweit die Ergebnisse die Aussage zulassen, ist ein Seminalplasmazusatz zum industriemäßig hergestellten Verdünner als positiv zu beurteilen. Inwieweit eine praktische Relevanz vorliegt, oder welche spezifisch wirksamen Substanzen synthetisiert und zugesetzt werden könnten, müßten weitere Untersuchungen ergeben.

In der Gesamtbetrachtung der Ergebnisse sollte aber auch bemerkt werden, daß die Werte der Halte- und Thermoresistenztests zwischen den verschiedenen Versuchen teilweise stark schwanken. Gründe dafür sind mit Wahrscheinlichkeit die Unterschiede im verwendeten Tiermaterial.

Seminalplasma guter Befruchter als Zusatz zum Verdünner scheint die Befruchtungsrate positiv zu beeinflussen. Aber auch Seminalplasma schlechter Befruchter zeigte sich in unseren Versuchen als geeignet, jedoch konnte mit letzterem nur in homologer Verdünnungsvariante eine hohe Befruchtungsrate erreicht werden. Es ist zu vermuten, daß Wechselwirkungen zwischen Spermien und Seminalplasma existieren, die sich negativ auf den Befruchtungsvorgang auswirken. Gleiches wurde bei Mischspermaeinsatz beobachtet, woraus die Forderung nach gezielten Eberkombinationen entstand. Seminalplasma aus Ejakulaten mit hoher Spermienmotilität zeigte als Verdünnerzusatz positive Effekte auf die Wurfgröße.

Die P<sub>4</sub>- Progesteronbestimmung im Kot erwies sich als geeignet, versuchsbegleitend die Zyklus- und Gelbkörperaktivität der Sauen zu kontrollieren. Weitere Untersuchungen müßten zeigen, ob es Zusammenhänge zwischen der Seminalplasmaapplikation und der Progesteronausscheidung mit dem Kot gibt, was sich in unseren Versuchen möglicherweise bereits andeutete.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen folgende Schlußfolgerungen für die weitere Forschung bezüglich der Wirkungen des Eberseminalplasmas zu. Es müssen auch künftig Untersuchungen zum motilitätsinitiiierenden Effekt und dessen Eberspezifität durchgeführt werden, um noch vorhandene Wissenslücken zu schließen. Zudem sollte man versuchen, die Komponenten im Seminalplasma zu finden, die die eberspezifischen Wirkungen im Motilitätsverhalten bedingen. Desweiteren wäre zu prüfen, inwieweit diese vermeintlichen Faktoren in der Lage sind, die Befruchtungsfähigkeit von Sperma zu beeinflussen.



## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, weitere Hinweise zu Einflüssen des Seminalplasmas auf die Spermienmotilität und das weibliche Genitale unter besonderer Berücksichtigung der Eberspezifität zu geben. Dabei wurde das Seminalplasma mit Hinblick auf praktische Anwendungsmöglichkeiten als Zusatz zum Eberspermaflüssigverdünner getestet. Die Versuchsreihe I diente der Untersuchung des Einflusses von Seminalplasmaaustausch zwischen den Ejakulaten jeweils zweier Eber auf die Spermienmotilität *in vitro* und das Befruchtungsvermögen *in vivo*. Die Wirkungen auf das Spermienmotilitätsverhalten wurden in einem Thermoresistenztest überprüft. Desweiteren wurden Jungsauen mit Sperma eines guten bzw. schlechten Befruchters mit Zusatz homo- oder heterologen Seminalplasmas zum Verdünnermedium besamt und anhand der wiedergefundenen Eizellen und Embryonen der Befruchtungserfolg ermittelt. Im Verlaufe des Versuches sind den weiblichen Tieren Kotproben zur Ermittlung des P<sub>4</sub>-Progesterongehaltes entnommen worden, um Reaktionen der Sauen auf die Applikation von Seminalplasma guter bzw. schlechter Befruchter und die Ovulationssynchronisation beobachten zu können. Ziel der Versuchsreihe II war es, die Wirkungen eines bestimmten Anteils Seminalplasma im flüssigkonservierten Ebersperma auf die Motilität der Spermien und die Befruchtungsergebnisse näher zu charakterisieren, wobei auch die Eberspezifität Berücksichtigung fand. Dazu dienten im Vorversuch Ejakulate von fünf Ebern, die mit Verdünnern versetzt wurden, welche 0 %, 10 %, 20 % bzw. 40 % Seminalplasma enthielten. Im Feldversuch sind 196 Altsauen mit Sperma besamt worden, welches mittels seminalplasmafreien bzw. -haltigen (SP-Anteil 40 %) Verdünnermedien konserviert war. Im ersten Versuchsteil des Feldversuches kam als Zusatz Seminalplasma von neun Vatertieren, die gute Befruchter im Feld waren, zur Anwendung; im zweiten Versuchsteil Seminalplasma nur eines Ebers, welcher in vorhergehenden Untersuchungen einen konstanten motilitätsstimulierenden Effekt seines Seminalplasmas auf Fremdspermien aufwies.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Heterologes Seminalplasma kann im Vergleich zu homologem den Anteil motiler Spermien unterschiedlich beeinflussen. Dabei hatte Seminalplasma aus Ejakulaten mit guten Motilitätswerten motilitätssteigernde Effekte und war hinsichtlich der Wirkung auf die Bewegungsaktivität von Samenzellen seminalplasmafreien Medien deutlich überlegen.

- Besamungen von Jungsauen mit Spermien von guten bzw. schlechten Befruchtern, die mit einem Verdünner konserviert wurden, der einen 30 %igen Anteil Seminalplasma eines guten Befruchters enthielt, erbrachten hohe Befruchtungsraten (70,1 ( $\pm$  31,3) % bzw. 77,7 ( $\pm$  19,6) %). Wurde als Verdünnerzusatz Seminalplasma eines schlechten Befruchters verwendet, so erzielten nur die Besamungen mit derartig konserviertem homologen Spermien ähnlich hohe Befruchtungsraten (82,9 ( $\pm$  29,2) %). Die Befruchtungsrate der Sauen, die mit letztgenanntem Seminalplasma-Verdünner-Gemisch konservierte heterologe Spermien erhielten, lag bei nur 53,0 ( $\pm$  34,7) %. Die Unterschiede sind statistisch nicht gesichert ( $\alpha = 0,05$ ).
- Im Rahmen dieses Besamungsversuches konnte gezeigt werden, daß die Methode der P<sub>4</sub>-Progesteronbestimmung im Kot geeignet ist, Kenntnisse über die Zyklusaktivität der Sau zu liefern und die Gelbkörperaktivität zu kontrollieren. Ein Zusammenhang zwischen der Seminalplasmaapplikation guter bzw. schlechter Befruchter und der Progesteronausscheidung mit dem Kot ließ sich nicht auffinden.
- In Laborversuchen wirkte sich ein Seminalplasmazusatz zum Verdünner bezüglich der Spermienmotilität über eine Lagerungsdauer von 72 Stunden positiv aus. Dabei gab es zwischen den verschiedenen Seminalplasmaanteilen (10 %, 20 % und 40 %) keine signifikanten Unterschiede. Bei Verwendung von Ejakulaten aus der routinemäßigen Spermaproduktion konnten generelle motilitätsstimulierende Effekte eines Seminalplasmazusatzes zum Verdünner (SP-Anteil 40 %) nur während eines Lagerungszeitraumes von 24 Stunden registriert werden. Einen signifikant positiven Einfluß über 72 Stunden hinweg hatte nur Seminalplasma eines bestimmten Ebers, der beständig deutlich spermienmotilitätsstimulierendes Seminalplasma lieferte.
- Die Besamung von Altsauen mit Sperma, welches mittels seminalplasmafreien bzw. -haltigen Verdünnermedien konserviert wurde, erbrachte hinsichtlich der Abferkelraten (Versuchsteil 1: 88,3 % bzw. 85,7 %; Versuchsteil 2: 90,5 % bzw. 85,7 %), der Ferkelindices (Versuchsteil 1: 838,6 bzw. 762,7; Versuchsteil 2: 760,2 bzw. 771,3), dem Produkt aus AFR und IGF/W (Versuchsteil 1: 856,5 bzw. 797,0; Versuchsteil 2: 760,2 bzw. 814,2) gute Ergebnisse. Signifikante Unterschiede existieren nicht. Tendenziell positive Einflüsse eines Seminalplasmazusatzes zum Verdünnermedium sind nur bei der Wurfgröße (+ 1,1 Ferkel) im zweiten Versuchsteil zu erkennen.

## 6 Summary

### **Effects of boars' seminal plasma as an additive to semen diluents on sperm motility in vitro and mating ability in vivo, while paying particular attention to boars' characteristics**

The aim of this dissertation is to present further information on the effects of boars' seminal plasma on sperm motility and female genitals, while paying particular attention to the boars' characteristics.

On this occasion the seminal plasma was tested with regard to practical applicability as an additive to boar semen diluents in liquid form.

The first series of tests served to analyse the effect of seminal plasma exchange among ejaculates of two boars on the sperm motility in vitro and mating ability in vivo. The effects on sperm motility were examined in a thermostability test.

Furthermore, gilts were inseminated with sperm of either a good or a bad service boar with an additive of homologous or heterologous seminal plasma in the diluent. Success of fertility was determined by the number of recovered ova and embryos.

In the course of the test, faeces were taken from the gilts to determine the  $P_4$ -progesterone-content. That was carried out to observe reactions of gilts to the application of seminal plasma from good or bad service boars and of ovulation synchronisation.

The objective of the second series of tests was to characterize the effect of a determinate part of seminal plasma in the fluid-preserved semen of boars on sperm motility and fertilisation results, whereby boar specificity was also considered. Ejaculates from five boars were used in the preliminary test for this, having first been treated with diluents containing 0 %, 10 %, 20 % or 40 % seminal plasma.

In field trials 196 sows were inseminated with semen, which had been preserved with diluents containing either some 40 % or no seminal plasma. In the first part of the trial we additionally used seminal plasma from nine sires, which were good service boars in practice. In the second part we used seminal plasma from only one boar, whose seminal plasma in previous experiments had shown a constant stimulating effect on the motility of foreign sperm.

We subsequently obtained the following results:

- Homologous and heterologous seminal plasma can have different effects on the portion of movable sperms. Seminal plasma from ejaculates with a high sperm motility enhanced the motility of foreign sperms and was superior to diluents containing no seminal plasma with regard to the effect on activity of movement by sperm cells.
- Inseminations of gilts with the sperm of both good and poor service boars, which had been preserved with diluents, which contained 30 % seminal plasma of a good service boar, resulted in high conception rates (70,1 (? 31,3) % or rather 77,7 (?19,6) %). When seminal plasma from a poor service boar was used as an additive for diluents, only inseminations with such preserved homologous sperms obtained similar high conception rates (82,9 (? 29,2) %). The conception rate of sows, which were inseminated with preserved homologous sperms through the above mentioned mix of seminal plasma and diluent, was only 53,0 (? 34,7) %. Differences have not been proved by statistics (? = 0,05).
- These insemination attempts shared that with P<sub>4</sub>- progesterone-determination in faeces, it is possible to obtain information about the cycle activity of sows and to check the activity of corpus luteum. No connexion was found between the application of seminal plasma from good and poor service boars and the excretion of progesterone through faeces.
- In laboratory experiments the additive of seminal plasma to diluent showed a positive effect on sperm motility when stored for 72 hours. In these studies no significant differences were found between the various seminal plasma portions in diluent (10 %, 20 %, 40 %). When ejaculates from routine sperm production were used, a generally stimulating effect of seminal plasma additives to diluent (seminal plasma 40 %) on sperm motility could only be shown during a storage period of about 24 hours. Only the seminal plasma of a determinate boar which clearly and constantly stimulated sperm motility had a significantly positive effect after 72 hours.
- The insemination of adult sows with semen, which had been preserved with diluents containing either some or no seminal plasma achieved good results as regards farrowing rates (experimental ratio 1: 88,3 % or rather 85,7 %; experimental ratio 2: 90,5 % or rather 85,7 %), piglet indices (experimental ratio 1: 838,6 or rather 762,7; experimental ratio 2: 760,2 or rather 771,3) and product of the farrowing rate and the size of the litter (experimental ratio 1: 856,5 or rather 797,0; experimental ratio 2: 760,2 or rather 814,2). There are no significant differences. Tendentiously positive effect of a seminal plasma additive to diluent were only seen in the size of litter (+ 1,1) in the experimental ratio 2.

## 6 Literaturverzeichnis

ABDEL-GHAFFAR, A. E.; K. M. EL-BAYOMI; H. A. ABDEL-RAHMAN (1996):  
Some alterations in seminal plasma composition of two breeds of rabbits in relation to sequence of ejaculation  
Fertilität 12, 165-171

ACOSTA, A. A.; M. MORSHEDI; G. F. DONCEL (1995):  
Semen evaluation  
in: Wallach, E. E., H. A. Zacur (Hrsg.): Reproductive medicine and surgery  
Mosby Verlag, S. 526-549

ACOTT, T. S.; D. D. HOSKINS (1978):  
Bovine sperm forward motility protein  
J. biol. Chem. 253, 6744-6750

AHLEMEYER, B.; E. KLUG; J. F. STRAGIOTTI SILVA (1991):  
Einfluß des Seminalplasmas auf Motilität und Akrosomenintegrität der Spermatozoen in der Gefrierung von Pferdesamen  
Reprod. Dom. Anim. 26, 161

ALANKO, M. (1974):  
Fertilization and early development of ova in AI-gilts. With special reference to the role of tubal sperm concentration. A clinical and experimental study.  
Helsinki, College of Vet. Med., Diss.

ANDRADE MOURA, J. C. (1988):  
Einfluß einer intrazervikalen Applikation von Seminalplasma und Östrogenen auf Spermientransport und Befruchtungsergebnisse nach Besamung mit tiefgefrorenem Ebersperma  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

AONUMA, S.; M. OKABE; Y. KISHI; M. KAWAGUCHI; H. YAMADA (1982):  
Capacitation inducing activity of serum albumin in fertilization of mouse ova in vitro  
J. Pharm. Dyn. 5, 980-987

BAAS, J. W.; P. C. MOLAN; P. SHANNON (1983):  
Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa  
J. Reprod. Fert. 68, 275-280

BACH, S.; P. NEUNDORF; K. H. STEMMLER; K. MUDRA; H. UECKERT (1982):  
Höhe und Bewertung des Anteils anomaler Spermien beim Eber  
Mh. Vet.-Med. 37, 463-467

BAVISTER, B. D. (1975):  
Properties of the sperm motility-stimulating component derived from human serum  
J. Reprod. Fert. 43, 363-366

- BEDFORD, J. M.; M. C. CHANG (1962):  
Removal of decapacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation  
Am. J. Physiol. 202(I), 179-181
- BETTENDORF, G. (1995)  
Geschichte der Endokrinologie und Reproduktionsmedizin  
Springer Verlag, Heidelberg
- BLANDAUI, R. J.; P. GADDUM-ROSSE (1974):  
Mechanism of sperm transport in pig oviducts  
Fert. Steril. 25, 61-67
- BLASE, N.; A. R. FAZILI; B. COLENBRANDER; E. TÖPFER-PETERSEN (1995):  
Inhibition of porcine sperm binding to homologous zona pellucida using HZA and antibodies  
against zona pellucida proteins  
3th International Conference on Boar Semen Preservation, August 6-9, 1995, Mariensee
- BOLLWAHN, W. (1978):  
Fortpflanzung  
in: Comberg, G. (Hrsg.): Schweinezucht, 8. Auflage  
Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, S. 65-87
- BORTOLOZZO, F. P. (1992):  
Besamung mit flüssigkonserviertem Mischsperma beim Schwein unter Berücksichtigung von  
Ovulationszeitpunkt und Spermaalter  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- BRAUN, J.; F. TORRES-BOGGINO; S. HOCHI; N. OGURI (1994):  
Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion sper-  
matozoa during storage at 5°C  
Dtsch. tierärztl. Wschr. 101, 319-322
- BROWN, J. R. (1977):  
Serum albumin: amino acid sequence  
in: Rosenoer, Oratz and Rothschild: Albumin Structure, Function and Uses  
Pergamonn Press, New York, S. 27-51
- BRUTGANS, Y. P. (1983):  
The role of boar seminal plasma in fertilization  
Pig News and Inf. 4, 250
- CALVETE, J. J.; L. SANZ; E. TÖPFER-PETERSEN (1992):  
Carbohydrate binding proteins involved in gamete interaction in the pig  
zit. nach Nieschlag, E.; H. M. Behre (Hrsg.): Andrologie  
Springer Verlag, Berlin (u.a.), S. 74
- CALVETE, J. J.; D. SOLÍS; L. SANZ; T. DÍAZ-MAURIÑO; W. SCHÄFER; K. MANN; E.  
TÖPFER-PETERSEN (1993):  
Characterization of two glycosylated boar spermadhesins  
Eur. J. Biochem. 218, 719-725

CALVETE, J. J.; D. SOLIS; L. SANZ; T. DIAZ-MAURIÑO; E. TÖPFER-PETERSEN (1994a):

Glycosylated Boar Spermadhesin AWN-1 Isoforms. Biological Origin, Structural Characterization by Lectin Mapping, Localization of O-Glycosylation Sites, and Effect of Glycosylation on Ligand Binding

Biol. Chem. Hoppe-Seyler 375, 667-673

CALVETE J. J.; L. SANZ; E. TÖPFER-PETERSEN (1994b):

Spermadhesins: Structure-Function Relationships

ARTA 6, 316-330

CALVETE, J. J.; L. SANZ; Z. DOSTÁLOVÁ; E. TÖPFER-PETERSEN (1995a):

Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding

Fertilität 11, 35-40

CALVETE; J. J.; K. MANN; W. SCHÄFER; M. RAIDA; L. SANZ; E. TÖPFER-PETERSEN (1995b):

Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effect of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits

FEBS Lett. 365, 179-182

CALVETE, J. J.; E. TÖPFER-PETERSEN (1995):

Sperm surface proteins

3th International Conference on Boar Semen Preservation, August 6-9, 1995, Mariensee

CALVETE, J. J.; Z. DOSTÁLOVÁ; L. SANZ; K. ADERMANN; H. H. THOLE; E. TÖPFER-PETERSEN (1996):

Mapping the heparin-binding domain of boar spermadhesins

FEBS Lett. 379, 207-211

CARBO, B. G.; S. EINARRSON (1971):

Fertility of deep frozen boar spermatozoa

Acta vet. scand. 12, 125-127

CHANG, M. C. (1957):

A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm

Nature, Lond., 179, 258-259

CHENG, S. P. (1981):

Auswirkungen der Superovulation von Jungsauen auf Wachstum, Morphologie und Proteinsekretion des Uterus und auf die Embryonalentwicklung in der Präimplantationsphase

Göttingen, Univ., Diss.

CLAUS, R.; D. SCHOPPER; H. G. WAGNER (1983):

Seasonal effect on steroids in bloodplasma and seminal plasma of boars

J. Steroid Biochem. 19, 725-729

CLAUS, R.; D. SCHOPPER, C. HOUANG-VU (1985a):  
Contribution of individual compartments of the genital tract to oestrogen and testosterone concentrations in ejaculates of the boar  
Acta endocrinol. 109, 281-288

CLAUS, R.; D. SCHOPPER; D. WEILER (1985b):  
Photoperiodic influence on reproduction of domestic boars  
I. Light influence on testicular steroids in peripheral blood plasma and seminal plasma  
J. Vet. Med. (A) 32, 86-98

CLAUS, R.; C. HOUANG-VU; F. ELLENDORFF, H. D. MEYER; D. SCHOPPER; U. WEILER (1987):  
Seminal oestrogens in the boar: Origin and functions in the sow  
J. Steroid Biochem. 27, 331-335

CLAUS, R. (1989):  
Oestrogens of the boar: Effects on male and female reproductive functions  
in: A. F. Hostein; K. D. Voigt; D. Grässlin (Hrsg.): Reproductive Biology and Medicine  
Proc. Symposium at Steinhorst, Deutschland  
Diesbach Verlag, Berlin, S. 136-147

CONRAD, F.; A. ZEUNER (1978):  
Untersuchungen zur Verlängerung der Lagerungsdauer flüssigkonservierten Eberspermas bei reduzierten Spermienzahlen je Besamungsdosis  
Forschungsteilbericht, Schönöw

DAVIS, B. K. (1976):  
Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing ability of rabbit  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152, 240-243

DIERKES, A. (1991):  
Plasmakonzentration von PGFM, Östradiol und Progesteron nach intracervicaler Infusion spermienfreier und spermienhaltiger Medien zur Ovulationsbeeinflussung bei der Jungsau  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

DIRKSEN, G. (1991):  
Langzeiteinsatz von Eberflüssigsperma unter besonderer Berücksichtigung von Lagerungsdauer, Verdünnermedium und Samenspende  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

DOSTÁLOVÁ, Z.; J. J. CALVETE; L. SANZ; C. HETTEL; D. RIEDEL; C. SCHÖNECK; R. EINSPANIER; E. TÖPFER-PETERSEN (1994a):  
Immunolocalization and quantitation of acidic Seminal Fluid Protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa  
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 375, 457-461

DOSTÁLOVÁ, Z.; J. J. CALVETE; L. SANZ; E. TÖPFER-PETERSEN (1994b):  
Quantitation of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa  
Bioch. Biophys. Acta 1200, 48-54



- DOSTÁLOVÁ, Z.; J. J. CALVETE; L. SANZ; E. TÖPFER-PETERSEN (1995a):  
Boar spermadhesin AWN-1  
Eur. J. Biochem. 230, 329-336
- DOSTÁLOVÁ, Z.; J. J. CALVETE; E. TÖPFER-PETERSEN (1995b):  
Interaction of non-aggregated boar AWN-1 and AQN-3 with phospholipid matrices. A model  
for coating of spermadhesins to the sperm surface  
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376, 237-242
- DUKELOW, W. R.; H. N. CHERNOFF; W. L. WILLIAMS (1967):  
Properties of decapacitation factor and presence in various species  
J. Reprod. Fert. 14, 393-399
- DZIUK, T. G.; C. POLGE (1962):  
Fertility in swine after induced ovulation  
J. Reprod. Fert. 4, S. 207-208
- EINARSSON, S. (1971):  
Studies on the composition of epididymal content and semen in the boar  
Acta vet. scand. 12, Suppl. 36, S. 1-96  
zit. nach Fazano, F. A. T. (1986)
- EINARSSON, S.; S. VIRING (1973a):  
Effect of boar seminal plasma on the porcine uterus and the isthmus part of oviducts in vitro  
Acta vet. scand. 14, 639-641
- EINARSSON, S.; S. VIRING (1973b):  
Distribution of frozen-thawed spermatozoa in the reproductive tract of gilts at different time  
intervals after insemination  
J. Reprod. Fert. 32, 117-120
- EINSPANIER, R. (1995):  
Influence of semen proteins on the route of fertilization  
3th Int. Conf. on Boar Semen Preservation, August 6-9, 1995, Mariensee
- ELSAESSER; F. (1982):  
Endokrinologie des Zyklus, der Ovulation und des Laktationsanöstrus beim Schwein  
Züchtungskunde 54, (5), 333-338
- ENG, L. A.; G. OLIPHANT (1978):  
Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glyco-  
protein from seminal plasma  
Biol. Reprod. 19, 1083-1094
- ESPEY, L. L.; P. J. COONS (1976):  
Factors which influence ovulatory degradation of rabbit ovarian follicle  
Biol. Reprod. 14, 223-245
- ESPEY, L. L. (1980):  
Ovulation as an inflammatory reaction—A hypothesis  
Biol. Reprod. 22, 73-106

- EVERWAND, A. (1990):  
Beeinflussung des Ovulationszeitpunktes durch verschiedene spermienfreie Inseminate bei der Sau in Abhängigkeit vom Stimulationszeitpunkt  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- FAZANO, F. A. T. (1986):  
Zur Kryokonservierung von Ebersperma; verschiedene Verfahren zur Samenbehandlung und unterschiedliche Konfektionierungsmethoden unter besonderer Berücksichtigung der Einfrier-  
geschwindigkeit  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- FOOTE, R. H. (1980):  
Artificial insemination  
in: Hafez, E. S. E. (Hrsg.): Reproduction in farm animals, 4th edition  
Lea & Febiger, S. 521-545
- GADALLA, B. M.; B. COLENBRANDER, L. M. G. GOLDE, M. LOPES-CARDOZO  
(1993):  
Boar seminal vesicles secrete arylsulfatases into seminal plasma: Evidence that desulfation of  
seminolipid occurs only after ejaculation  
Biol. Reprod. 48, 483-489
- GILES, J. R.; L. H. THOMPSON; S. ARKINS; T. CAMACHO; P. A. EICHEN (1990):  
Effects of uterine infusion of nonviable semen, seminal plasma or egg albumen prior to breed-  
ing on the reproductive efficiency of gilts or sows  
Can. J. Anim. Sci. 70, 129-133
- GO, K. J.; D. P. WOLF (1985):  
Albumin-mediated changes in sterol content during capacitation  
Biol. Reprod. 32, 145-153
- GROOTEN, H. (1988):  
Einsatz von Mischsperma in der Mastferkelerzeugung  
Der Tierzüchter 8, 344-345
- GUILEN SOARES, J. A. (1995):  
Befruchtungsergebnisse beim Schwein nach transzervikaler Applikation von Seminalplasma  
unmittelbar vor der Insemination  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- HABECK, O. J. M. (1989):  
Die Anwendung des Real-Time-Sektorscanners (5 MHz) zur Ovarkontrolle bei der Sau  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- HANCOCK, J. L. (1961):  
Fertilization in the pig  
J. Reprod. Fert. 2, 307-331  
zit. nach: Andrade Moura, J. C. (1988)

- HARRISON, R. A. P.; H. M. DOTT; G. C. FOSTER (1982):  
Bovine serum albumin, sperm motility and the „dilution effect“  
J. Exp. Zool. 222, 81-88
- HELMOND, D. M.; A. AARNINK; D.L. HANDLIN (1972):  
Periovalutary hormone profiles in relation to embryonic development and mortality in pigs  
in: Sreenan, J.; M. G. Diskin (Hrsg.): Embryonic mortality in farm animals  
Martinus Nijhoff Publishers, S. 119-125
- HENDRICKS, D. M.; H. D. GUTHRIE; D. L. HANDLIN (1972):  
Plasma Estrogen, Progesterone and Luteinizing Hormone Levels During the Estrous Cycle in  
Pigs  
Biol. Reprod. 6, 210-218
- HEYDORN, K. P.; S. PAUFLER (1976):  
Besamungsergebnisse nach Mischspermaeinsatz beim Schwein  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 83, 449-451
- HEYDORN, K. P.; F. HOBEIN (1977):  
Verwendung von Mischsperma in der künstlichen Besamung beim Schwein  
Der Tierzüchter 12, 521-522
- HEYDORN, K. P.; N. J. MEYER; E. BRUNS; S. PAUFLER (1977):  
Unerwartete Befruchtungsergebnisse nach Schweinebesamung mit Disperma  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 84, 268-270
- HOANG-VU, C. (1987):  
Elektrische Aktivität des Myometriums beim Schwein während des Zyklus und ihre Beeinflussung durch Infusion von Östrogenen in das Uteruslumen am Tag der Rausche  
Hohenheim, Univ., Diss.
- HOPPE, P. C.; W. K. WHITTEN (1974):  
An albumin requirement for fertilization of mouse eggs in vitro  
J. Reprod. Fert. 39, 433-436
- HUNTER, R. F. H. (1966):  
Lutealphase, ovulation and fertility in the pig  
J. Anim. Sci. 25, 925
- HUNTER, R. H. F. (1973):  
Transport, Migration and Survival of Spermatozoa in the Female Genital Tract: Species with Intra-Uterine Deposition of Semen  
in: Hafez, E. S. E.; Thibault, C. G. (Hrsg.): The biology of spermatozoa, transport, survival and fertilizing ability  
Proceedings of the INSERM International Symposium, Nouzilly, November 4-7, 1973  
S. Karger, Basel (u.a.), S. 145-155
- HUNTER, R. F. H. (1974):  
Cronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, *sus scrofa*  
Anat. Rec. 178, 169-186

- HUNTER, R. H. F.; COOK, B.; POYSER, N. L. (1983):  
Regulation of oviduct function in pigs with local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport  
Europ. Obstet. Gynec. Reprod. Biol. 14, 225-232
- HUNTER, R. H. F. (1984):  
Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct  
J. Reprod. Fert. 72, 203-211
- JACOB, D.; ELZE, K. (1989):  
Ovulationsverlauf, Embryonenentwicklung und Auftreten von Eizelldegenerationen beim Schwein bei spontanem Östrus sowie nach Brunst- und Ovulationssynchronisation  
Mh. Vet.- Med. 44; 422-424
- JANSEN, S.; I. JENNECKENS; B. BRENIG (1995):  
Spatial structure of the zona pellucida binding groove in boar proacrosin  
Reprod. Dom. Anim. 30, 359
- JENG, H.; K. M. LIU; W. C. CHANG (1993):  
Purification and characterization of reversible sperm motility inhibitors from porcine seminal plasma  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 435-440
- JENNECKENS, I.; B. BRENIG; S. JANSEN (1995):  
Experimental point mutations in the zona pellucida binding site of proacrosin by in vitro mutagenesis  
Reprod. Dom. Anim. 30, 382
- JONÁKOVÁ, V.; L. SANZ; J. J. CALVETE; A. HENSCHEN; D. CECHOVA; E. TÖPFER-PETERSEN (1991):  
Isolation and biochemical characterization of a zona pellucida-binding glycoprotein of boar spermatozoa  
FEBS Lett. 280, 183-186
- JONÁKOVÁ, V.; J. J. CALVETE; K. MANN; W. SCHÄFER; E. R. SCHMID; E. TÖPFER-PETERSEN (1992):  
The complete primary structure of three isoforms of a boar sperm-associated acrosin inhibitor  
FEBS Lett. 297, 147-150
- KOCH, T.; R. BERG (1990):  
Lehrbuch der Veterinäranatomie  
Gustav Fischer Verlag, Jena
- KOLB, E. (1984):  
Biochemie und Pathobiochemie der Fortpflanzung, 1. Auflage  
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- KOLB, E. (1989):  
Lehrbuch der Physiologie der Haustiere, Teil 2  
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

- KOTWICA, J. (1980):  
Mechanism of prostaglandin F-2→ penetration from the horn of the uterus to the ovaries in pigs  
J. Reprod. Fert. 59, 237-241
- LARSSON, K.; S. EINARSSON (1976a):  
Fertility of deep frozen boar spermatozoa: Influence of thawing diluents and of boars  
Acta vet. scand. 17, 43-62
- LAVON, U. (1972):  
Characterization of boar, bull, ram and rabbit seminal plasma proteins by gel disc electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide  
J. Reprod. Fert. 31, 29-37
- LAVON, U.; P. A. BRIGGS; J. C. BOURSNEILL (1973):  
Electrophoresis of protein fractions from boar seminal plasma, vesicular secretion and epididymal plasma  
J. Reprod. Fert. 33, 39-51
- LEIDL, W. (1983):  
Gestörte Fruchtbarkeit beim Eber  
in: Küst, D.; F. Schaetz (Hrsg.): Fortpflanzungsstörungen bei den Haustieren, 6. Auflage  
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 290-300
- LINDHOLMER, CH. (1974):  
The importance of seminal plasma for human sperm motility  
Biol. Reprod. 10, 533-542
- LINDHOLMER, C.; R. ELIASSON (1974)  
The effects of albumin, magnesium, and zinc on human sperm survival in different fractions of split ejaculates  
Fert. Steril. 25, 424-431
- LOTZ, J. H. (1990):  
Zur Ovulationsbeeinflussung bei der Sau mittels intrazervikaler Infusion spermienfreier Medien  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- LUTERMAN, M.; T. IWAMOTO; C. GAGNON (1991):  
Origin of the human seminal plasma motility inhibitor within the reproductive tract  
Int. J. Androl. 14, 91-98
- MAHNAZ, E.; E. TÖPFER-PETERSEN (1995):  
Expression of spermadhesins in different mammalian species  
Reprod. Dom. Anim. 30, 380
- MANN, T.; C. POLGE; L. E. A. ROWSON (1956):  
Participation of seminal plasma during the passage of spermatozoa in the female reproductive tract of the pig and horse  
J. Endocrinol. 13, 133-140

MANN, T.; C. LUTWAK-MANN (1981):  
Male reproductive function and semen  
Springer Verlag, Berlin (u.a.)

MC LAREN, A. (1980):  
Fertilization, Cleavage and Implantation  
in: Hafez, E. S. E. (Hrsg.): Reproduction in farm animals, 4th edition  
Lea & Febiger, Philadelphia, S. 226-246

MOORE, H. D. M.; G. A. HALL; K. G. HIBBIT (1976):  
Seminal plasma proteins and the reaction of spermatozoa from intact boars and from boars  
without seminal vesicles to cooling  
J. Reprod. Fert. 47, 39-45

MUDRA, K.; W. BUSCH (1991):  
Spermaproduktion (Schwein)  
in: Busch, W.; K. Löhle; W. Peter (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Nutztieren, 2. Auflage  
Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart, S. 465-474

MÜLLER, E.; BRANDL, G. (1975):  
Untersuchungen über die Motilität und Morphologie von Eberspermatozoen  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82, S. 153-155

NEHRING, H.; I. WICKE; B. STÄHR (1994):  
Beeinflussung des Motilitätsverhaltens von Eberspermien durch heterologes Eberseminalplasma  
Reprod. Dom. Anim. 29, 182

NIEMANN, H. (1987)  
Embryotransfer und assoziierte Biotechniken beim Schwein  
Tierärztliche Umsch. 12, S. 946-956  
zit. nach: Andrade Moura, J. C. (1988)

NIEMANN, A. (1991):  
Ovulationsbeeinflussung durch intrazervikale Infusion spermienfreier oder spermienhaltiger  
Medien bei der Jungsau in Abhängigkeit vom Stimulationszeitpunkt  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

NIESCHLAG, E.; H. M. BEHRE (1996)  
Andrologie  
Springer Verlag, Berlin (u.a.)

PAQUIGNON, M. (1985):  
Freezing and thawing extenders for boar spermatozoa  
1st Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala 1985, Ber., 129-145

PAVELKO, M. K.; B. G. CARBO (1976):  
Possible importance of some sperm coating proteins and their behaviour during preservation of  
boar spermatozoa  
8th Int. Congr. on Anim. Reprod. and A. I., Cracow 1976, Vol. 4, 1045-1048

- PEÑA ALFARO, C. E. (1988):  
Einfluß des Seminalplasmas im Inseminat auf Spermientransport und Befruchtungserfolg bei Jungsaunen unter besonderer Berücksichtigung unterschiedlicher Spermiodosierungen in der flüssigen Samenportion  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- PETERS, T. (jr) (1975):  
Serum albumins  
in: Putnam, F.W. (Hrsg.): The plasma proteins: structure, function and genetic control, 2. Auflage  
Academic Press, New York, S. 133-181
- PETTERSSON, A.; S. EINARSSON; H. KINDAHL (1993):  
Intraluminal pressure variations in the isthmus of the porcine oviduct after intrauterine insemination with saline, oestrogen solution or boar seminal plasma  
Acta vet. scand. 34, 109-116
- PIERUCCI, P.; R. ALLEVA; M. CANTARINI; G. ARNALDI; A. SCARAMUCCI; C. FRANCUCCI; G. BALERCIA; G. P. LITTARRU; F. MANTERO (1996):  
Protective role of Ubiquinol-10 against peroxidation in human seminal plasma fluid and plasma  
2nd nat. Congress of the Italian Society of medical Andrology, Florence, 26-27 February 1996  
Int. J. Androl. 19, Suppl. 1, S. 17
- POLGE, C. (1982):  
Embryo transplantation and preservation  
in: Cole, D. J. A.; G. R. Foxcroft (Hrsg.): Control of pig reproduction  
Butterworths Verlag, London, S. 277-291
- PÜSCHEL-DAUSEND, C. H. (1974):  
Vorkommen und fertilitätsdiagnostische Bedeutung von morphologisch abweichenden Samenzellen im Ebersperma unter besonderer Berücksichtigung der sogenannten anhängenden Protoplasmatropfen  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- PURSEL, V. G.; L. A. JOHNSON; G. B. RAMPACEK (1972):  
Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock  
J. Anim. Sci. 34, 278-283
- PURSEL, V. G.; L. A. JOHNSON; L. L. SCHULMAN (1973):  
Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa  
J. Anim. Sci. 37, 528-531
- PURSEL, V. G. (1983):  
Effect of processing semen on capacitation time of fresh and frozen-thawed boar spermatozoa  
J. Anim. Sci. 56, 1161-1166
- RABELER, H. J. (1990):  
Einfluß von Seminalplasmahaltsstoffen auf Befruchtungsraten, Spermientransport und Ovulation bei der Sau  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

RATH, D.; K. F. WEITZE; C. E. PEÑA ALFARO; J. C. ANDRADE MOURA (1989):  
Effects of seminal plasma on the number of accessory sperm cells and fertilization in gilts  
*Zuchthyg.* 24, 123-127

ROBERT, M.; C. GAGNON (1994):  
Sperm motility inhibitor from human seminal plasma: presence of a precursor molecule in seminal vesicle fluid and its molecular processing after ejaculation  
*Int. J. Androl.* 17, 232-240

ROMMEL, B.; J. BRAUN; R. STOLLA (1995):  
The effect of homologous and heterologous seminal plasma on equine sperm motility during semen storage at low temperatures  
*Reprod. Dom. Anim.* 30, 396

RUBINSTEIN, S.; H. BREITBART (1991):  
Role of spermine in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction  
*Biochem. J.* 278, 25-28

RUFO, G. A. J.; J. P. SINGH; D. F. BABCOCK; H. A. LARDY (1982):  
Purification and characterization of a calcium transport inhibitor from bovine seminal plasma  
*J. Biol. Chem.* 257, 4627-4632

SANDER-RICHTER, H. (1986):  
Untersuchungen zur Oxytocin-Sekretion beim männlichen Schwein  
Göttingen, Univ., Diss.

SANZ, L.; J. J. CALVETE; V. JONÁKOVÁ; E. TÖPFER-PETERSEN (1992a):  
Boar spermadhesins AQN-1 and AWN are sperm-associated acrosin inhibitor acceptor proteins  
*FEBS Lett.* 300, 63-66

SANZ, L.; J. J. CALVETE; K. MANN; W. SCHÄFER; E. R. SCHMID; W. AMSELGRUBER; F. SINOWATZ; M. EHRHARD; E. TÖPFER-PETERSEN (1992b):  
The complete primary structure of the spermadhesin AWN, a zona pellucida binding protein isolated from boar spermatozoa  
*FEBS Lett.* 300, 213-218

SANZ, L.; J. J. CALVETE; K. MANN; H. J. GABIUS; E. TÖPFER-PETERSEN (1993):  
Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: A dual role of spermadhesins in fertilization  
*Mol. Reprod. Dev.* 35, 37-43

SCHAAP, P. (1987):  
Über die Verlängerung der Haltbarkeit frischverdünnten Eberspermas unter besonderer Berücksichtigung des Bovinen Serumalbumins  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

SCHEUNERT, A.; TRAUTMANN, A. (1987)  
Lehrbuch der Veterinärphysiologie, 7. Auflage  
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg



SCHIEFERSTEIN, G.; H. SEEGER; W. VOELTER; B. PIETSCH-BREITFELD; T.H. LIPPERT (1993):

Ubiquitin im menschlichen Seminalplasma  
Fertilität 9, 199-202

SCHMIDT, D.; C. KUNZE; K. MUDRA; W. PETER (1982):

Untersuchungen zur Gefrierkonservierung von Ebersperma, 6. Mitteilung: Die Konservierung in Tubetten  
Arch. Tierzucht, Berlin 25, 209-220

SCHRÖDER, P. C.; P. TALBOT (1982):

Intrafollicular pressure decreases in hamster preovulatory follicles during smooth muscle cell contraction in vitro  
J. exp. Zool. 24, 417-426

SCHROOYEN, J. A. M. (1985):

Erfahrungen und Ergebnisse mit mehrere Tage altem Schweinesperma  
Tierärztl. Umschau 40, 620-621

SCHÜLKE, B. (1991):

Grundstruktur der Spermienzelle und Biochemie des Spermas  
in: Busch, W.; K. Löhle; W. Peter (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Nutztieren, 2. Auflage  
Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart, S. 209-234

SEIDL, W.; K. P. HEYDORN (1978)

Gegenseitige Beeinflussung der Komponenten von Ebermischsperma  
Zbl. Vet. Med. A, 25, 41-47

SHANNON, P.; B. CURSON; C. J. PITT; K. C. LAI; J. W. BAAS (1983):

Effects of various fractions of egg yolk, BSA and ovalbumin on sperm motility, and effect of storage on restoration of motility  
New Zealand J. Agric. Res. Vol. 26, 297-302

SINGER, R.; M. SAGIV; H. LEVINSKY; R. MAAYAN; E. SEGENREICH; D. ALLALOUF (1989):

The influence of seminal plasma and polyaminic substances on the motility of isolated human sperm  
Int. J. Fert. 34, 224-230

SINOWATZ, F. (1991):

Befruchtung  
in: Rüsse, I.; F. Sinowatz (Hrsg.): Lehrbuch der Embryologie der Haustiere  
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, S. 117-137

SINOWATZ, F.; W. AMSELGRUBER; E. TÖPFER-PETERSEN; J. J. CALVETE; L. SANZ; J. PLENDL (1995).

Immunohistochemical localization of spermadhesin AWN in the porcine male genital tract  
Tiss. Cell Res. 282, 175-179

SMOLLICH, A.; J. DORST (1985):

Geschlechtssystem

in: Smollich, A.; G. Michel (Hrsg.): Mikroskopische Anatomie der Haustiere, 1. Auflage  
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 193-271

STABENFELDT, G. H.; AKINS, E. L.; EWING, L. L.; MORRISSETTE, M. C. (1969):

Peripheral plasma progesterone levels in pigs during the oestrous cycle

J. Reprod. Fert. 20, 443-449

STÄHR, B. (1995):

Persönliche Mitteilung

STÄHR, B.; H. NEHRING (1997):

Empfehlungen zur Gewinnung, Aufbereitung, Lagerung und Transport von Ebersperma  
IFN Schönow

STAMPA, E. (1989):

Befruchtungsfähigkeit von tiefgefrorenem Ebersperma; Einfluß von Konfektionierung, Besamungshäufigkeit und Seminalplasma

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

STEFFENS, M. (1984):

Untersuchungen zur Fruchtbarkeitsverbesserung bei Jung- und Altsauen durch Ovulationsinduktion und Insemination nach Östrus- und Duldungsverhalten der Herde sowie Ermittlung der Ursachen der Infertilität der Sau

Leipzig, Univ., Sekt. Tierprod., Diss.

STEMMLER, K. H.; S. BACH; P. NEUNDORF; K. MUDRA; H. UECKERT (1982):

Der Einfluß der Sermienanomalien auf die Befruchtungsleistung beim Eber

Mh. Vet. Med. 37, 467- 470

SÜDHOFF, H. (1994):

Ovulationsinduktion durch Seminalplasmakomponenten bei Jungsauen

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

THILANDER, G.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1989):

Fine Structure of the porcine myometrium during the oestrous cycle

Acta Anat 134, 160-170

THÜRING, P. (1987):

Ovulations- und Eizelldiagnostik in biotechnisch behandelten Jung- und Altsauengruppen

Rostock, Univ., Diss.

TÖPFER-PETERSEN, E.; D. CECHOVÁ (1990):

Zona pellucida induces conversion of proacrosin to acrosin

J. Androl. 13, 190-196

TÖPFER-PETERSEN, E.; A. E. FRIES; A. HENSCHEN; D. CECHOVA; M. STEINBERGER (1990):

Sperm acrosin and binding to zona pellucida

Gamete interaction: Prospects for immunocontraception, Wiley-Liss., Inc., 197-212

- TÖPFER-PETERSEN, E.; K. MANN; J. J. CALVETE (1993):  
Identification of porcine oocyte 55 kDa → und ↑ proteins within the zona pellucida glyco-  
protein families indicates that oocyte sperm rezeptor activity is associated with different zona  
pellucida proteins in different mammalian species  
Biol. Chem Hoppe-Seyler 374, 411-417
- TÖPFER-PETERSEN, E.; J. J. CALVETE; L. SANZ (1994):  
Spermadhesin: A multifunctional carbohydrate-binding protein family involved in boar sperm  
capacitation/zona pellucida binding  
ARTA 6, 53-63
- TÖPFER-PETERSEN, E.; J. J. CALVETE; Z. DOSTÁLOVÁ; M. REINERT; D. WABER-  
SKI; L. SANZ; T. HÜBNER (1995a):  
One year in the life of the spermadhesin family  
Fertilität 11, 233-241
- TÖPFER-PETERSEN, E.; M. REINERT; Z. DOSTÁLOVÁ; L. SANZ; J. J. CALVETE  
(1995b):  
Molecular mechanisms of sperm-oocyte interactions in the pig  
3th International Conference on Boar Semen Preservation, August 6-9, 1995, Mariensee
- TSO, W. W.; W. M. LEE (1980):  
Seminal plasma and progressive motility of boar spermatozoa  
Int. J. Androl. 3, 243-250
- TSO, W. W.; W. N. LEUNG; M. W. TSO (1987):  
The structural specificity of carbohydrate in the initiation of rat sperm motility  
Int. J. Fertil. 32, 77-80
- VAN DE WIEL, D. F. M.; J. ERKENS; W. KOOPS; E. VOS; A. A. J. VAN LANDEGHEM  
(1981):  
Periostrous and midluteal time courses of circulating LH, FSH, Prolactin, Estradiol-17 ↑ and  
Progesterone in the domestic pig  
Biol. Reprod. 24, 223-233
- VIRING, S.; S. EINARSSON (1980a):  
Influence of boar seminal plasma on the distribution of spermatozoa in the genital tract of gilts  
Acta vet. scand. 21, 598-606
- VIRING, S.; S. EINARSSON (1980b):  
Effect of boar seminal plasma on uterine and oviductal motility in oestrus gilts  
Acta vet. scand. 21, 607-616
- VITT, U. (1996):  
Fruchtbarkeitskriterien aufgetauter Bullenspermien in vitro und die Beeinflussung dieser durch  
Seminalplasmaaustausch vor der Gefrierkonservierung  
Berlin, Freie Univ., Vet. med. Fak., Diss.

WABERSKI, D. (1988):

In vitro- und Besamungsversuche unter Praxisbedingungen mit langzeitkonserviertem Eberflüssigspenna unter besonderer Berücksichtigung von BSA und Puffer im Verdünnermedium Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

WABERSKI, D. (1994):

Einfluß von Seminalplasma auf das Befruchtungsgeschehen beim Schwein  
in: Forschungsbericht 1994 der Arbeitsgruppe Prof. Weitze zur Tagung des Zentralverbandes der Deutschen Schweineproduktion (ZDS), Karsdorf/Unstrut, 28.-29. September 1994

WABERSKI, D.; H. SÜDHOFF; T. HAHN; P. W. JUNGBLUT; E. KALLWEIT; J. J. CALVETE; M. ENSSLIN; H. O. HOPPEN; N. WINTERGALEN; K. F. WEITZE; E. TÖPFER-PETERSEN (1995a):

Advanced ovulation in gilts by the intrauterine application of a low molecular mass pronase-sensitive fraction of boar seminal plasma  
J. Reprod. Fert. 105, 247-252

WABERSKI, D.; R. CLAASSEN; P. W. JUNGBLUT; N. PARVIZI; E. KALLWEIT; K. F. WEITZE (1995b):

The induction of ovulation by transcervical infusions of seminal plasma in gilts: Evidence for a locally active mechanism  
Reprod. Dom. Anim. 30, 337

WABERSKI, D.; J. A. GUILLEN SOARES; E. BANDEIRA DE ARRUDA; K. F. WEITZE (1995c):

Fertilizing capacity of boar spermatozoa related to the application of seminal plasma, the interval AI–Ovulation and sperm number  
3th International Conference on Boar Semen Preservation, August 6-9, 1995, Mariensee

WABERSKI, D. (1995d):

Einfluß von Seminalplasma auf das Befruchtungsgeschehen beim Schwein  
in: Forschungsbericht 1995 der Arbeitsgruppe Prof. Weitze zur Tagung des Zentralverbandes der Deutschen Schweineproduktion (ZDS), Bogensee, 19.-20. September 1995

WABERSKI, D. (1996):

Einfluß von Seminalplasma auf die Befruchtung beim Schwein–Charakterisierung von ovulationsauslösenden Inhaltsstoffen  
in: Forschungsbericht 1996 der Arbeitsgruppe Prof. Weitze zur Tagung des Zentralverbandes der Deutschen Schweineproduktion (ZDS), Weimar, 30.-31. Oktober 1996

WAGNER-RIETSCHER, H. (1991):

Untersuchungen zur Brunst und Ovulation bei Altsauen mittels transkutaner Sonographie Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

WASSARMAN, P. M. (1992):

Regulation of mammalian fertilization by gamete adhesion molecules  
zit. nach Nieschlag, E.; H. M. Behre (Hrsg.): Andrologie  
Springer Verlag, Berlin (u.a.), S. 75

- WEGMANN, S. (1990):  
Kryokonservierung von Ebersperma; Zusammenhänge zwischen Konzentration und Anpassungszeit von Glycerin sowie Einfluß von Mischsperma  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- WEITZE, K. F. (1989):  
Schweinebesamung unter Verwendung von „Langzeitverdünner“–eine internationale Situationsanalyse  
Schweinezucht u. Schweinemast 37, 36-40
- WEITZE, K. F.; D. RATH; J. C. ANDRADE MOURA (1989):  
Spermientransport und Befruchtungsergebnisse nach Besamung mit Gefriersperma beim Schwein  
Zuchthyg. 24, 223-228
- WEITZE, K. F.; D. RATH; T. WILLMEN; D. WABERSKI; J. LOTZ (1990a):  
Advancement of ovulation in the sow related to seminal plasma application before insemination  
Reprod. Dom. Anim. 25, 61-67
- WEITZE, K. F.; J. H. LOTZ; A. EVERWAND; T. WILLMEN; D. WABERSKI (1990b):  
Interaction between inseminate, uterine and ovarial function in the sow  
Reprod. Dom. Anim. 25, 197-204
- WEITZE, K. F.; . MÜLLER (1991):  
Prinzipien der Spermauntersuchung  
in: Busch, W.; K. Löhle; W. Peter (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Nutztieren, 2. Auflage  
Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart, S. 269-309
- WESTENDORF, P.; L. RICHTER; H. TREU (1975):  
Zur Tiefgefrierung von Ebersperma  
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 82, 261-267
- WICKE, I.; B. STÄHR (1992):  
Unveröffentlichte Ergebnisse
- WICKE, I.; B. STÄHR (1993):  
Unveröffentlichte Ergebnisse
- WICKE, I. (1995)  
Unveröffentlichte Ergebnisse
- WHITE, I. G. (1980):  
Secretions of the Male Reproductive Tract and Seminal Plasma  
in: Hafez, E. S. E.: Reproduction in farm animals, 4th edition  
Lea & Febiger, Philadelphia, S. 189-202
- WILKES, H. (1991):  
Verlauf und Bedeutung von Prostaglandin-F-Metaboliten-, Östradiol- und Progesteronkonzentrationen im peripheren Blutplasma nach intrazervikaler Infusion spermienfreier Medien mit dem Ziel einer Beeinflussung des Ovulationszeitpunktes bei der Sau  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

WILLMEN, T. (1989):

Einfluß von Spermadosierung und Seminalplasma im Inseminat auf Befruchtungsraten, Spermientransport und Ovulation beim Schwein

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

ZÖTTL, B. (1988):

Wirkung von intrauterin verabreichten Östrogenen auf die Prostaglandin F<sub>2</sub>→-Freisetzung durch das Endometrium und Konsequenzen für die Ovulation des Schweines

München, Univ., Tierärztl. Fak., Diss.

## 8 Anhang

### 8.1 Anhang A

#### **Selektion der Versuchseber für den Besamungsversuch (Versuchsreihe I)**

Für jeden der 60 Pietraineber des Bestandes wurden die Befruchtungsergebnisse (FI, AFR, IGF/W) über einen einjährigen Besamungszeitraum (6/1994 bis 6/1995) hinweg ermittelt. Danach erfolgte die Selektion von 12 Ebern mit guten und vier Ebern mit auffallend schlechten Ergebnissen. Dem Zwecke der weiteren Auswahl dienten je vier Ejakulaten dieser Eber aus dem routinemäßigen Absamprozeß, denen 10 ml Sperma entnommen und zur Seminalplasmagewinnung für eine Laboruntersuchung verwendet wurden. Das Sperma wurde 10 Minuten lang bei 770 g zentrifugiert. Der Überstand ist anschließend nochmals für 10 Minuten bei 3100 g zentrifugiert worden. Zweimal zwei Milliliter des überstehenden Seminalplasmas lagerten dann bis zum Zeitpunkt der Untersuchung bei -20°C in kleinen Plastikampullen.

Die Laboruntersuchungen umfaßten Thermoresistenztests (TRT) über 300 min bei 40°C und Tests mit Hilfe der computerassistierten Motilitätsanalyse (CASA). Dabei war die Wirkung der jeweiligen Seminalplasmacharge auf die Spermienmotilität nach Zugabe zu Referenzejakulaten von Interesse. Dazu wurden die Seminalplasmachargen im Wasserbad bei 40°C aufgetaut.

Für die Untersuchungen mittels Thermoresistenztest wurden zwei Referenzejakulat von einem Eber (TRT I und II) gewonnen. Eine Hälfte dessen wurde zentrifugiert (Ejakulat 10 min bei 770 g, Überstand 10 min bei 3100 g). Der andere Teil ist originär belassen worden. Jeweils ein Milliliter des originären Teils des Referenzejakulates wurde mit einem Milliliter des zu testenden Seminalplasmas vermischt. Die Kontrolle stellte die Kombination aus Referenzejakulat und homologem Seminalplasma dar. Nach einminütiger Inkubationszeit bei 40°C erfolgte eine Nachverdünnung mit acht Millilitern BTS. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 120, 180, 240 und 300 min unter einem Phasenkontrastmikroskop hinsichtlich ihres Motilitätsverhaltens beurteilt.

Für die Messungen an der CASA kam zwei Ejakulate eines weiteren Referenzebers (CASA I und II) zur Anwendung. Eine Hälfte dessen war zweimal zehn Minuten bei 770 g bzw. 3100 g zentrifugiert und anschließend ein Volumenanteil des homologen Seminalplasmas mit einem des originären Spermias vermischt worden. 0,1 ml dieser Suspension und 1,0 ml des zu testenden Seminalplasmas wurden jeweils bei 37°C für eine Minute im Wasserbad inkubiert. Zur Kontrolle diente die Kombination von 0,1 ml o.g. Suspension und 1,0 ml homologem Seminalplasma. 5 µl der jeweiligen Probe kamen in eine vortemperierte Meßkammer. Bei Bedarf wur-

de die Charge mit dem entsprechenden Seminalplasma soweit nachverdünnt, daß sich 160 bis 220 Zellen auf dem Bildschirm befanden, da sich diese Konzentration als günstig für die Messungen erwiesen hatte. Aufeinanderfolgend wurden sechs Gesichtsfelder eingestellt und durch den Computer analysiert. Von primärem Interesse war der Anteil motiler Spermien.

Die Ermittlung der Wirkungen des Seminalplasmas auf das Motilitätsverhalten von Fremdspermien ließ anschließend die Auswahl zweier Eber zu, deren Befruchtungsleistungen im Feld im Zeitraum 6/1994 bis 6/1995 sowie deren Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen weitgehend übereinstimmten. Die Tabellen 21, 22 und 23 weisen die in das Auswahlverfahren einbezogenen Ergebnisse aus.

In Abstimmung mit einigen organisatorischen Belangen der Besamungseberstation M. wurden als Besamungseber und Seminalplasmaspender für den Besamungsversuch die Eber Fussel = Eber F (gute Befruchtungsleistung im Feld, spermienmotilitätsstimulierende Wirkung des Seminalplasmas in vitro) und Volluto = Eber V (schlechte Befruchtungsleistung im Feld, keine spermienmotilitätsstimulierende Wirkung des Seminalplasmas in vitro) ausgewählt.

Tabelle 21: Auswertung der Befruchtungsergebnisse zur Eberselektion (Besamungsversuch/Versuchsreihe I)

Eber	FI	AFR	IGF/W
		[%]	
Caron	1060	90,0	13,8
Charmeur	731	76,9	10,3
Clodas	705	63,2	11,8
Fackel	693	68,1	11,0
Fanin	780	74,3	10,8
Fussel	756	77,8	10,7
Reinak	675	75,0	9,2
Romulus	777	76,9	0,3
Stochit	600	66,7	9,5
Stocker	647	68,4	11,3
Vokal	761	73,9	11,3
Vokus	650	77,8	11,4
Kayn	489	46,8	11,4
Indio	483	45,7	11,4
Volluto	280	30,0	10,2
Walross	385	35,0	12,2



Tabelle 22: Anteile motiler Spermien [%] im TRT zur Eberselektion (Besamungsver-such/Versuchsreihe I)

Eber	Thermoresistenztest I							Thermoresistenztest II						
	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
Caron	60	55	60	50	55	40	30	65	55	60	50	40	20	10
Charmeur	70	50	60	50	30	20	15	70	50	60	45	35	25	20
Clodas	60	55	50	35	20	15	5	60	60	50	35	35	20	5
Fackel	65	50	60	50	30	20	10	65	65	50	45	35	30	15
Fanin	50	55	55	50	40	20	5	70	60	55	45	30	15	15
Fussel	70	60	55	60	55	50	40	70	70	60	55	45	30	20
Reinak	60	65	55	40	35	25	5	65	55	50	40	35	25	15
Romulus	60	60	50	50	50	35	35	65	70	60	55	45	30	25
Stochit	65	50	50	50	35	20	10	60	50	50	40	25	20	10
Stocker	55	60	50	35	30	20	5	60	55	55	40	25	10	5
Vokal	60	65	60	50	35	20	10	70	60	60	50	40	15	10
Vokus	55	60	55	35	25	15	10	60	60	55	45	45	20	10
Kayn	50	50	50	40	25	10	5	55	50	60	45	35	15	10
Indio	50	45	45	50	30	10	10	60	50	45	40	35	35	10
Volluto	45	50	50	30	15	10	5	55	60	45	35	25	20	5
Walross	50	50	40	25	20	10	5	50	55	40	30	20	10	5
Referenzeber	50	50	40	35	30	15	10	60	60	50	40	35	15	10

Tabelle 23: Ergebnisse der CASA zur Eberselektion (Besamungsversuch/Versuchsreihe I)

Eber	CASA I		CASA II	
	% motile	% lineare	% motile	% lineare
Caron	58	9	53	22
Charmeur	54	15	61	19
Clodas	60	10	54	20
Fackel	54	13	54	17
Fanin	45	7	38	7
Fussel	65	9	61	4
Reinak	59	15	55	2
Romulus	60	5	54	10
Stochit	51	17	64	32
Stocker	48	15	47	11
Vokal	51	20	43	22
Vokus	47	15	63	27
Kayn	53	29	48	17
Indio	60	7	55	8
Volluto	48	14	46	17
Walross	53	24	33	19
Referenzeber	60	27	57	36

## 8.2 Anhang B

Tabelle 24: Einfluß des Seminalplasmaaustausches bei flüssigkonservierten Besamungsportionen auf die Befruchtungsergebnisse (Ergebnisse der Einzeltiere)

Variante	Sau	C. l. li. n	C. l. re. n	C. l. ges. n	Eiz. n	anom. Emb. n	norm. Emb. n	Eiz./Emb ges. n	WR ???	BR ???
F/F	1	11	6	17	7	0	3	10	58,8	30,0
F/F	2	23	14	37	10	15	12	37	100,0	32,4
F/F	3	8	8	16	0	0	12	12	75,0	100,0
F/F	4	9	10	19	3	0	16	19	100,0	84,2
F/F	5	14	22	36	1	0	35	36	100,0	97,2
F/F	6	11	17	26	1	5	20	26	100,0	76,9
F/V	7	11	11	22	17	1	4	22	100,0	18,2
F/V	8	11	12	23	0	1	21	22	97,0	95,5
F/V	9	12	8	20	3	5	11	19	95,0	57,9
F/V	10	11	16	27	14	0	13	27	100,0	48,1
F/V	11	9	9	18	16	0	2	18	100,0	11,1
F/V	12	20	12	32	2	2	28	32	100,0	87,5
V/F	13	15	15	30	1	13	15	29	93,0	51,7
V/F	14	5	3	8	3	0	0	3	37,5	0
V/F	15	12	6	18	0	1	17	18	100,0	94,4
V/F	16	9	11	20	0	0	20	20	100,0	100,0
V/F	17	13	19	32	2	7	23	32	100,0	71,9
V/F	18	14	13	27	6	2	19	27	100,0	70,4
V/V	19	17	17	34	0	0	34	34	100,0	100,0
V/V	20	22	17	39	7	1	26	34	87,0	76,5
V/V	21	11	8	19	3	11	5	19	100,0	26,3
V/V	22	7	11	18	1	0	17	18	100,0	94,4
V/V	23	7	2	9	0	0	4	4	44,0	100,0
V/V	24	13	15	28	0	0	28	28	100,0	100,0

Tabelle 25: Auswertung der Befruchtungsergebnisse zur Eberselektion (Feldversuch/Versuchsreihe II)

Eber	FI	AFR [%]	IGF/W
Aljoscha (Hy)	1000	88,9	9,8
Charlan (Pi)	797	77,1	10,4
Clemens (Pi)	833	77,8	10,4
Coburg (Pi)	790	79,6	10,1
Hapie 41 (Hy)	764	66,7	11,0
Hapie 43 (Hy)	783	69,9	11,2
Stons (Hy)	839	82,6	11,6
Unstock (Hy)	875	84,3	10,3
Windol (Pi)	861	72,2	11,9

## P<sub>4</sub>-Progesteronwerte\* der Jungsaugen der Versuchsreihe I

\* Werte in den graphischen Darstellungen sind dekadisch logarithmiert

Tabelle 26: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt (ng/g) der ovulationssynchronisierten Jungsaugen  
(Tag 24 vor bis Tag 3 nach der induzierten Ovulation)

Tag	Mittelwert 10 <sup>y</sup>	Untergrenze 10 <sup>y-s</sup>	Obergrenze 10 <sup>y+s</sup>	Minimalwert y <sub>min</sub>	Maximalwert y <sub>max</sub>
-24	80,6	23,0	282,8	24,8	1319,5
-20	102,2	28,7	363,6	26,0	2343,7
-16	74,2	29,8	185,2	27,0	590,7
-11	118,5	35,6	394,5	29,4	1697,5
-8	73,9	21,6	252,6	3,0	1742,2
-6	62,4 b	24,2	160,8	21,8	740,1
-5	64,7	36,1	115,9	29,3	221,6
-4	41,5 b	22,7	75,8	22,1	156,6
-3	80,5	29,5	219,5	26,7	1399,9
-2	46,9 b	19,4	113,3	3,0	158,0
-1	50,1 b	19,0	132,2	20,7	1655,7
0	60,3 b	22,7	159,9	19,5	1711,2
1	80,2	32,3	199,0	19,9	1087,9
2	156,4	56,3	434,7	28,7	1405,4
3	321,8 a	137,5	753,2	84,3	1263,0

a, b: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant (? = 0,05)

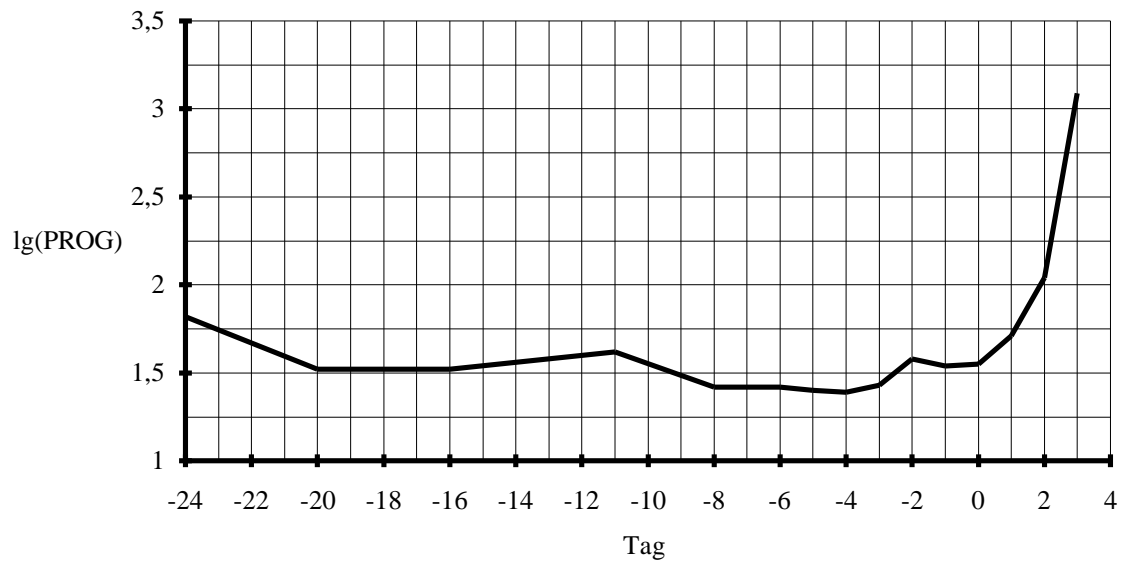


Abbildung 14: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 1

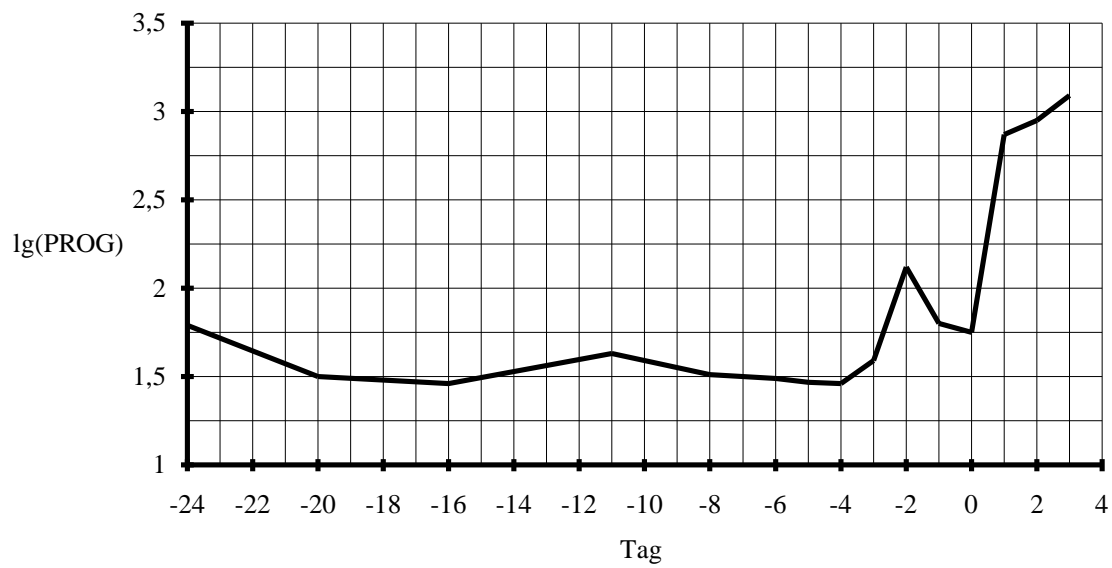


Abbildung 15: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 2

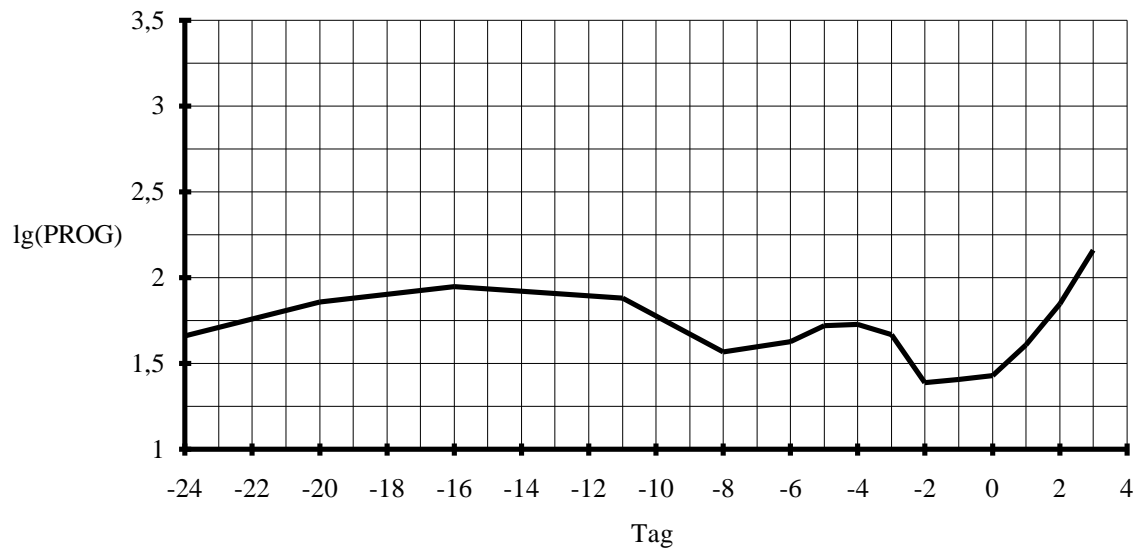


Abbildung 16: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 3

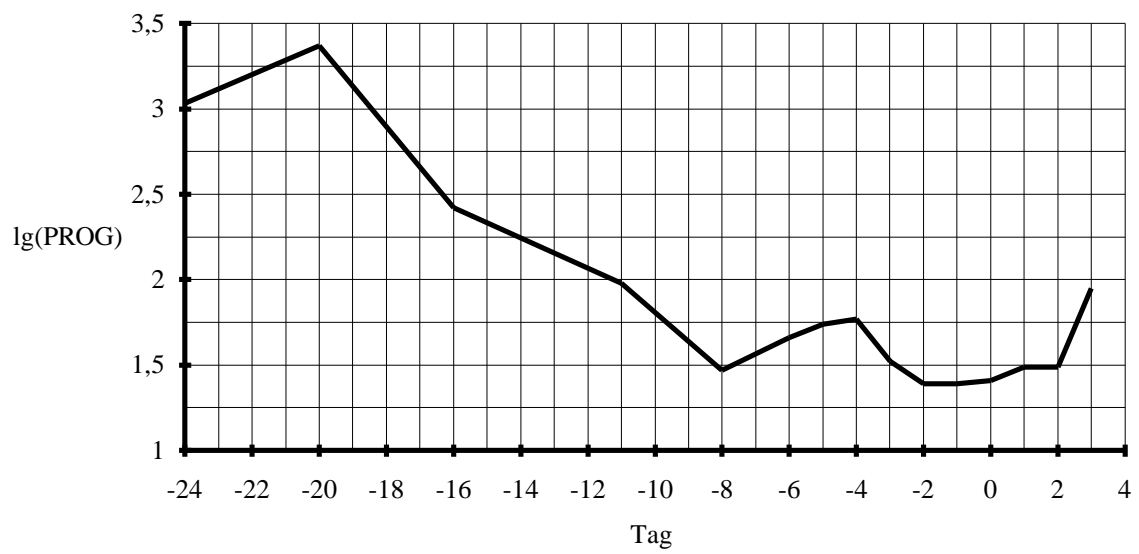


Abbildung 17: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 4

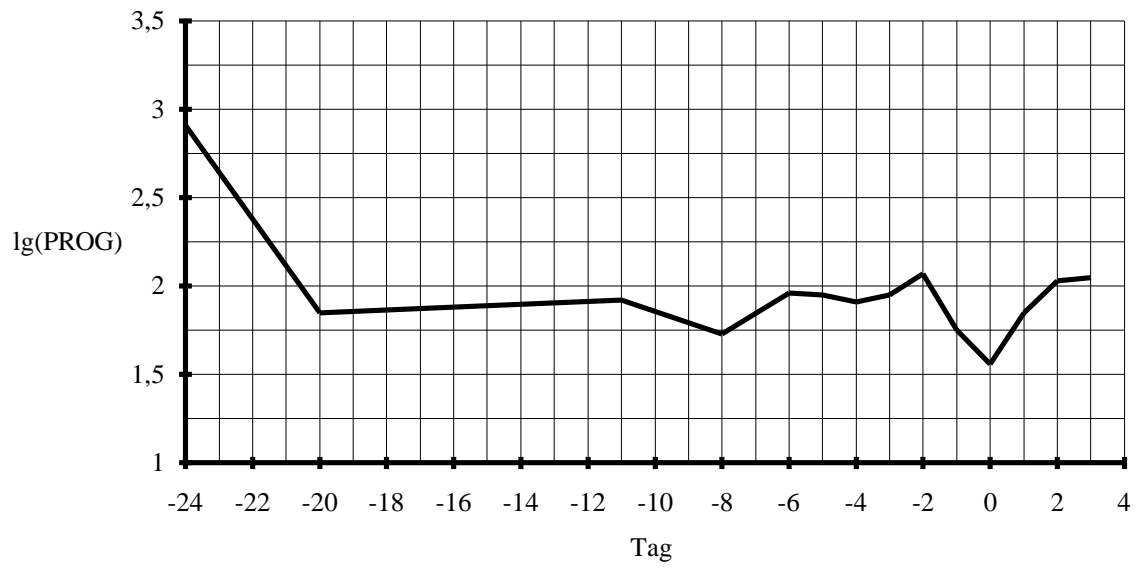


Abbildung 18: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 5

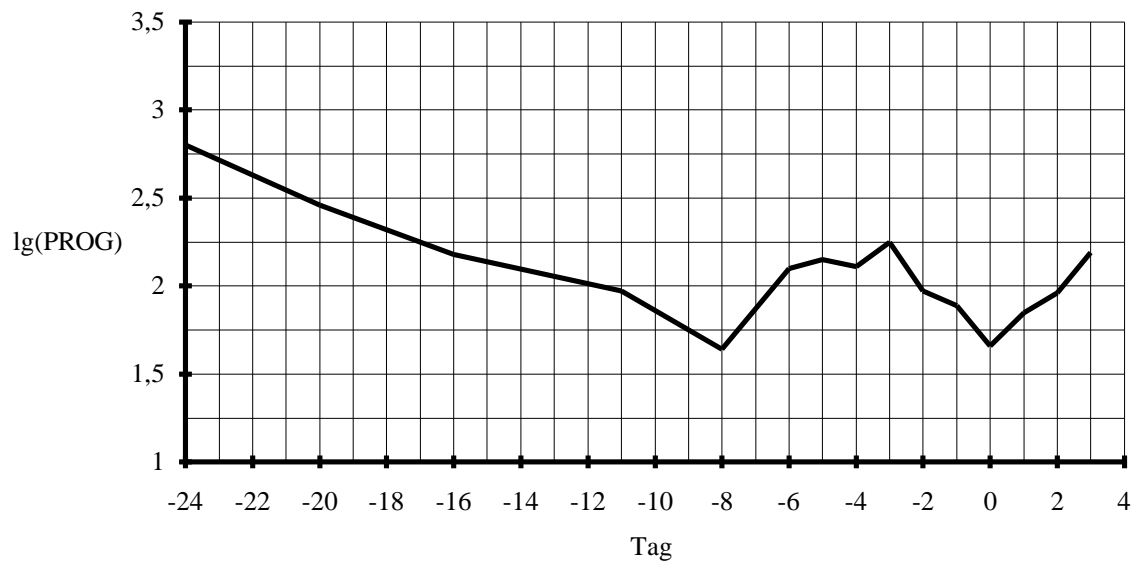


Abbildung 19: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 6



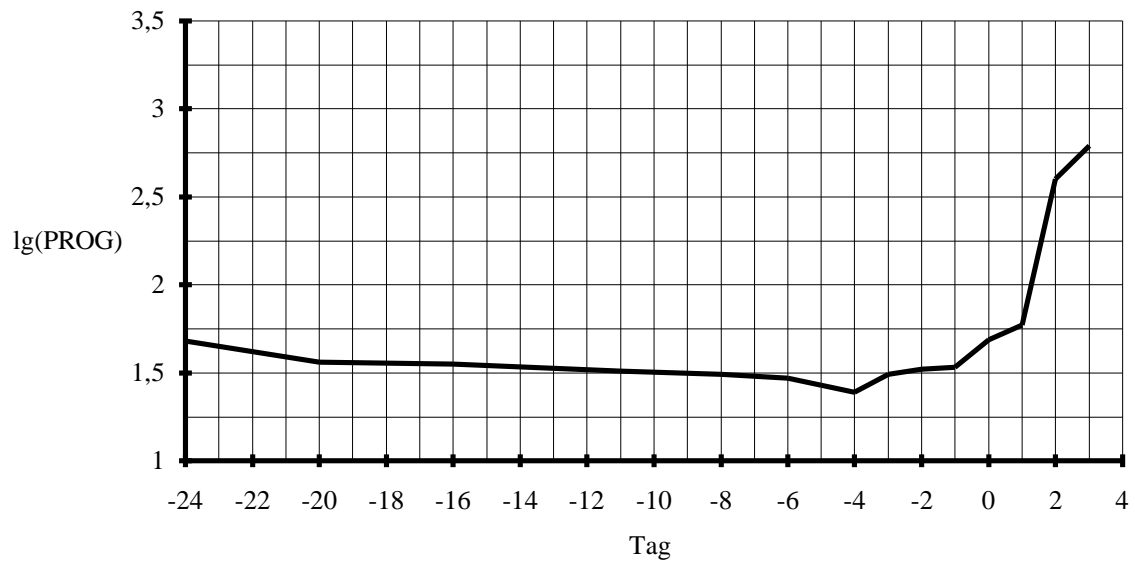


Abbildung 20: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 7

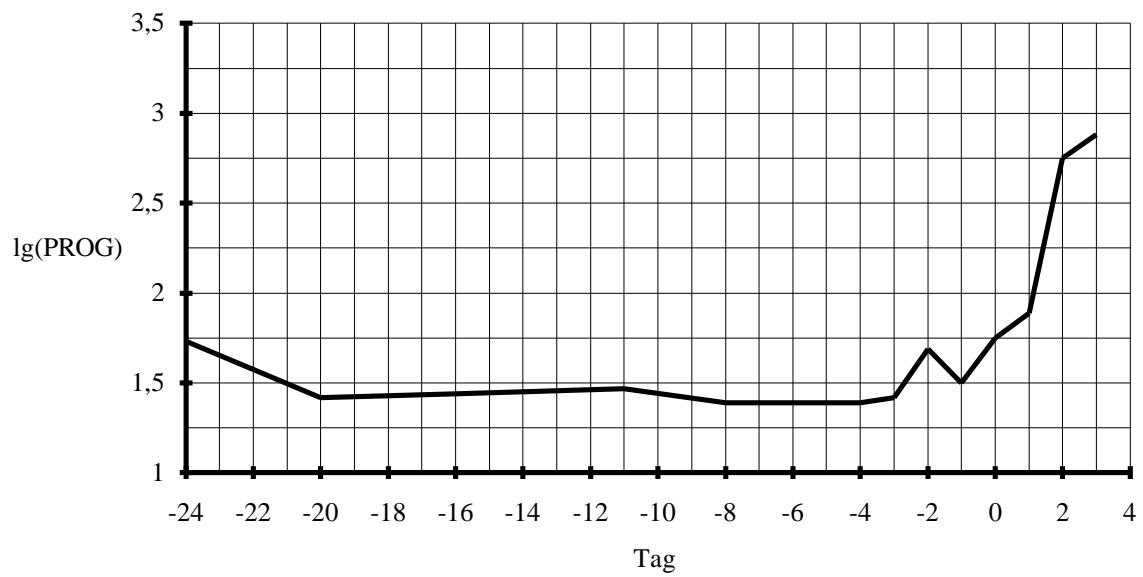


Abbildung 21: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 8

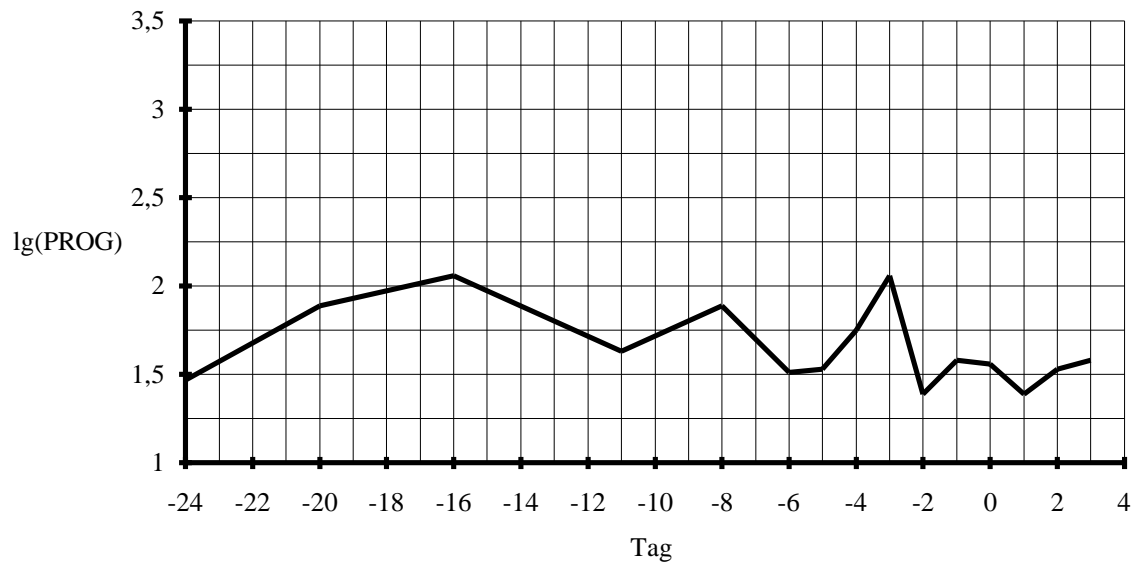


Abbildung 22: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 9

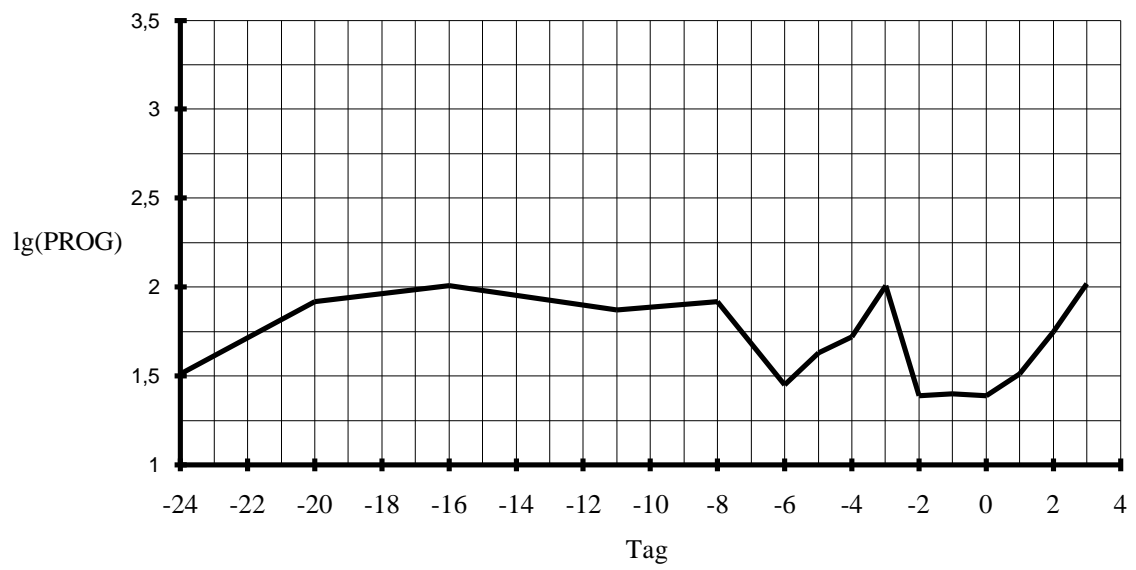


Abbildung 23: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 10

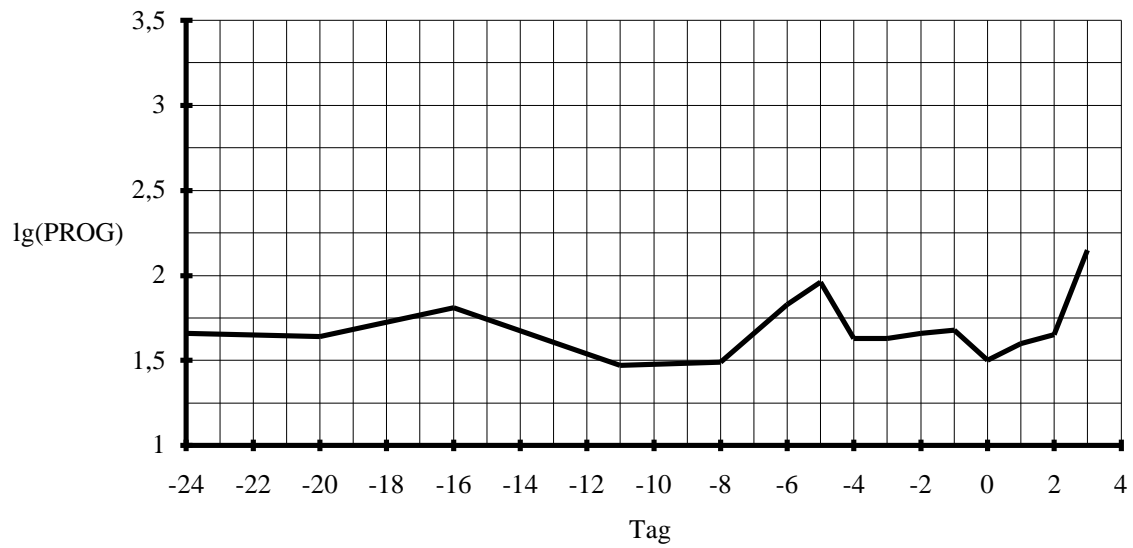


Abbildung 24: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 11

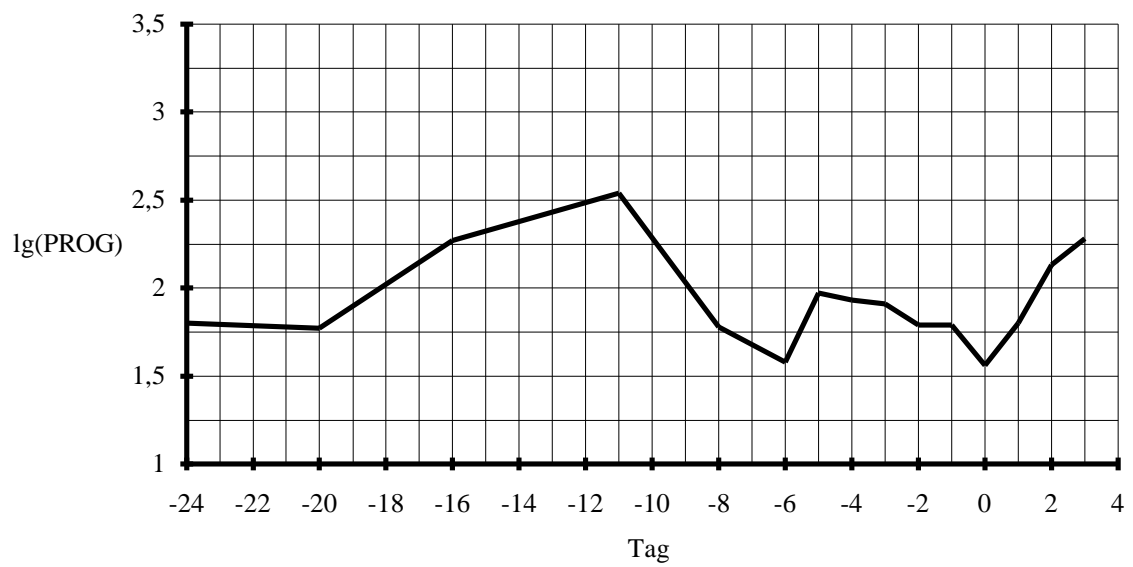


Abbildung 25: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 12

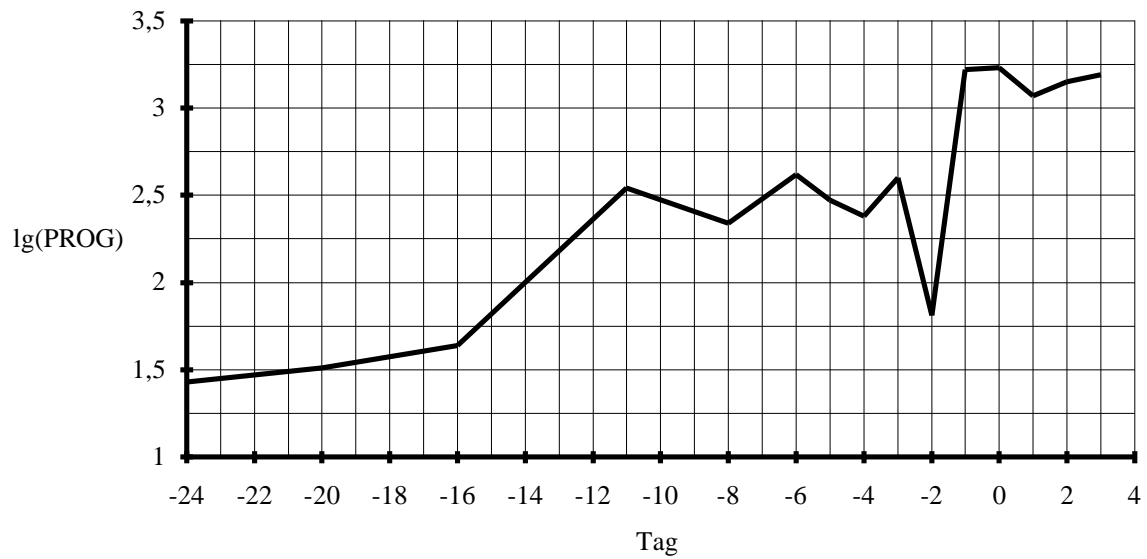


Abbildung 26: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 13

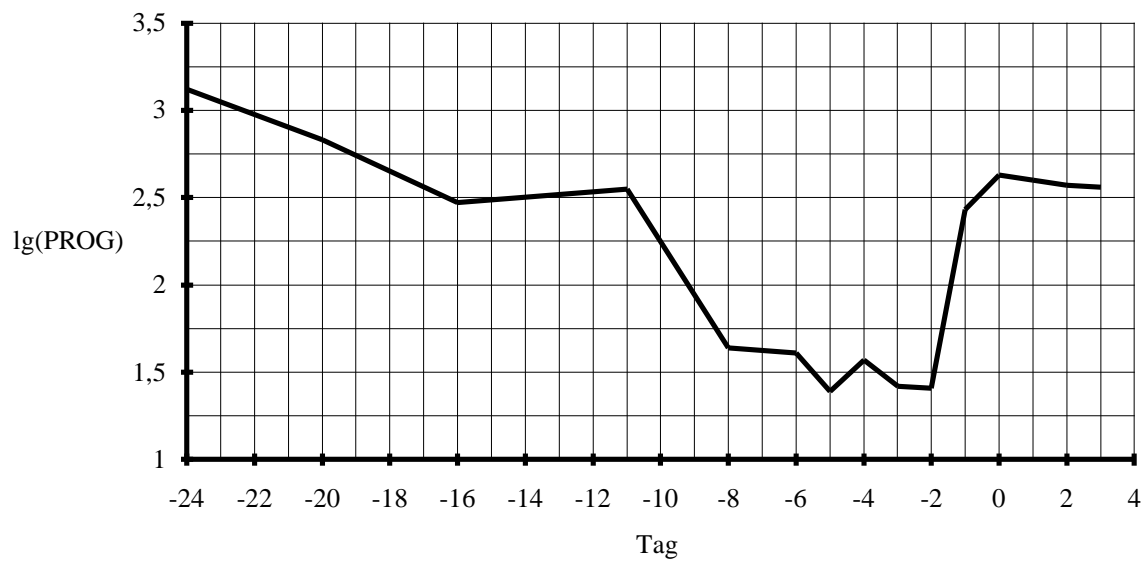


Abbildung 27: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 14

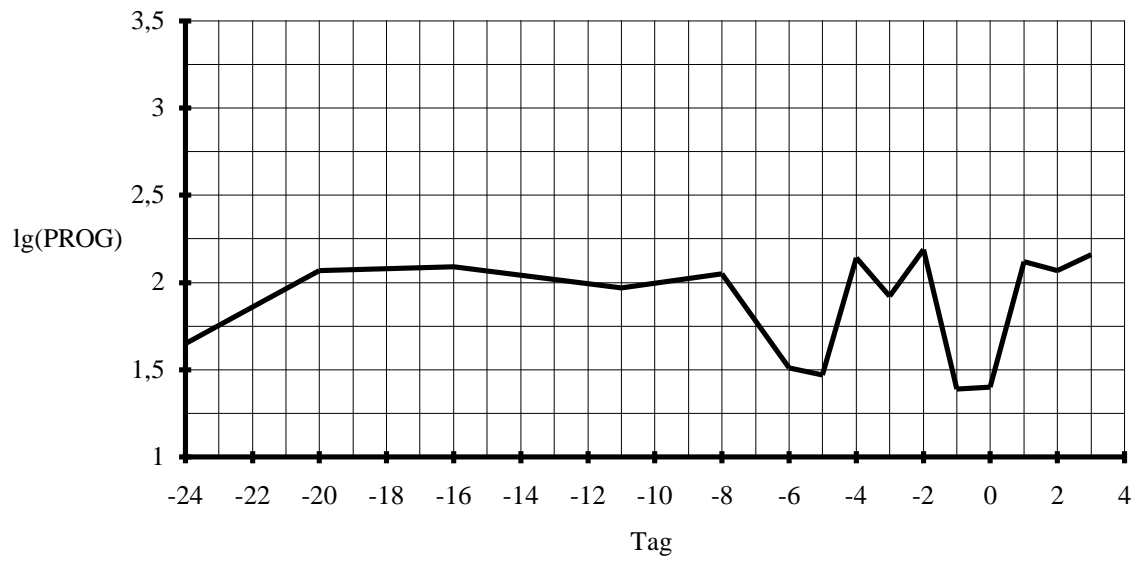


Abbildung 28: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 15

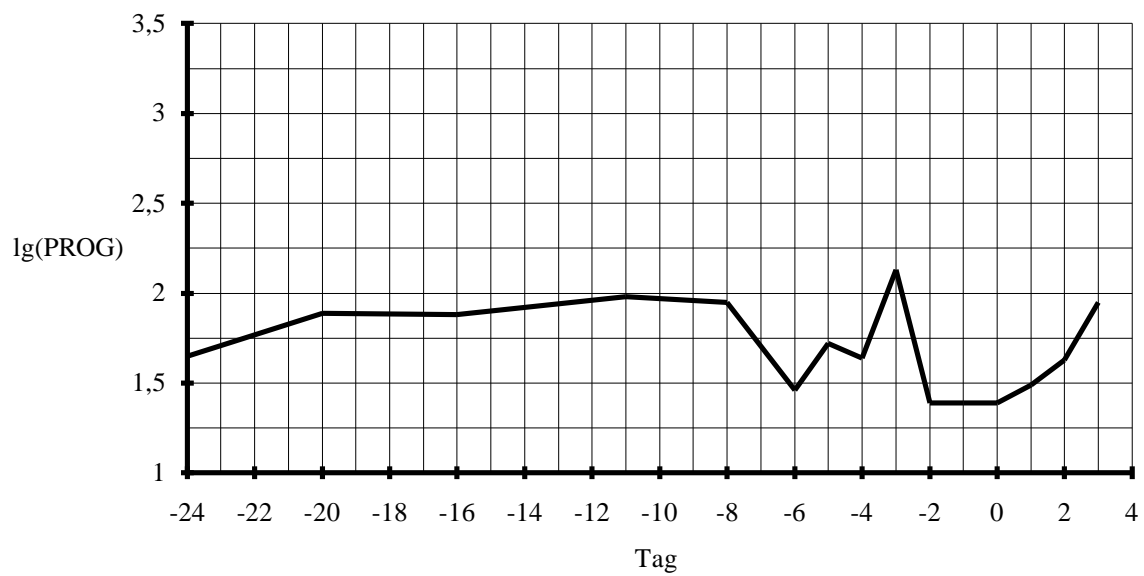


Abbildung 29: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 16

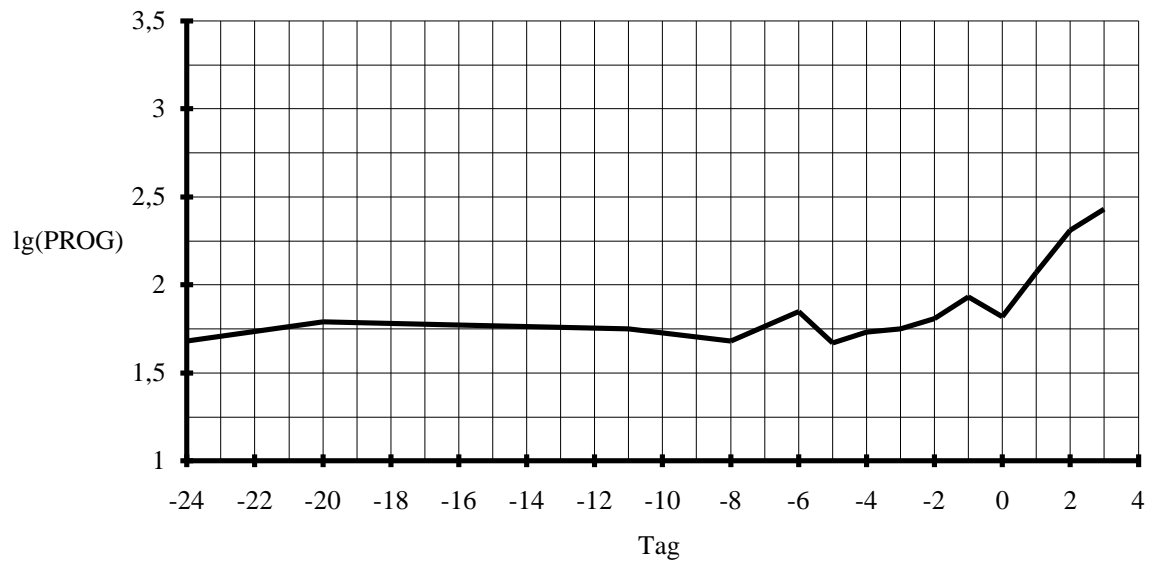


Abbildung 30: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 17

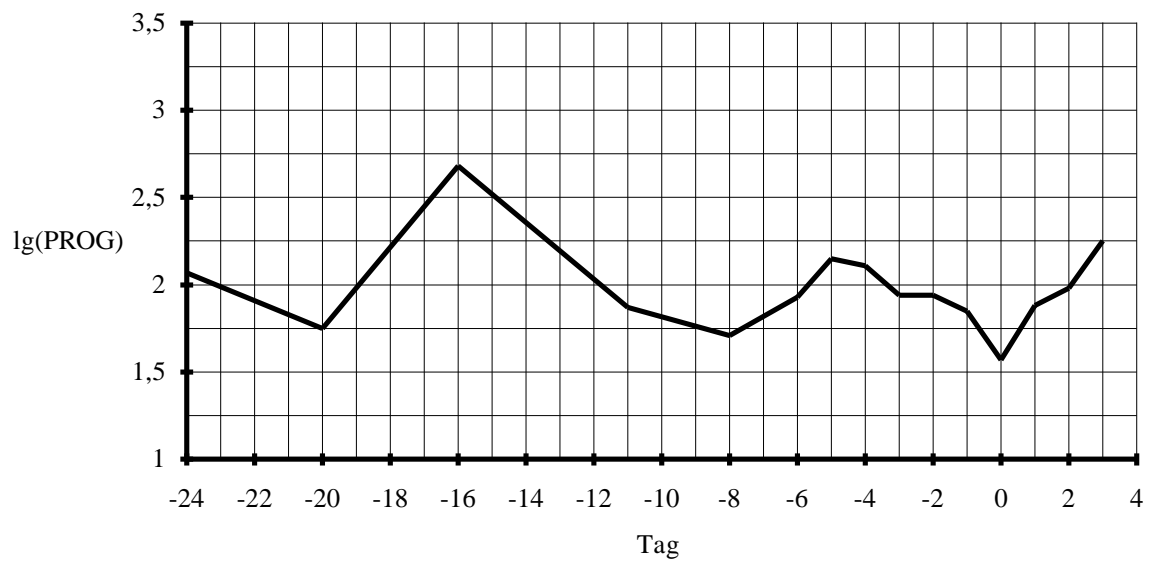


Abbildung 31: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 18

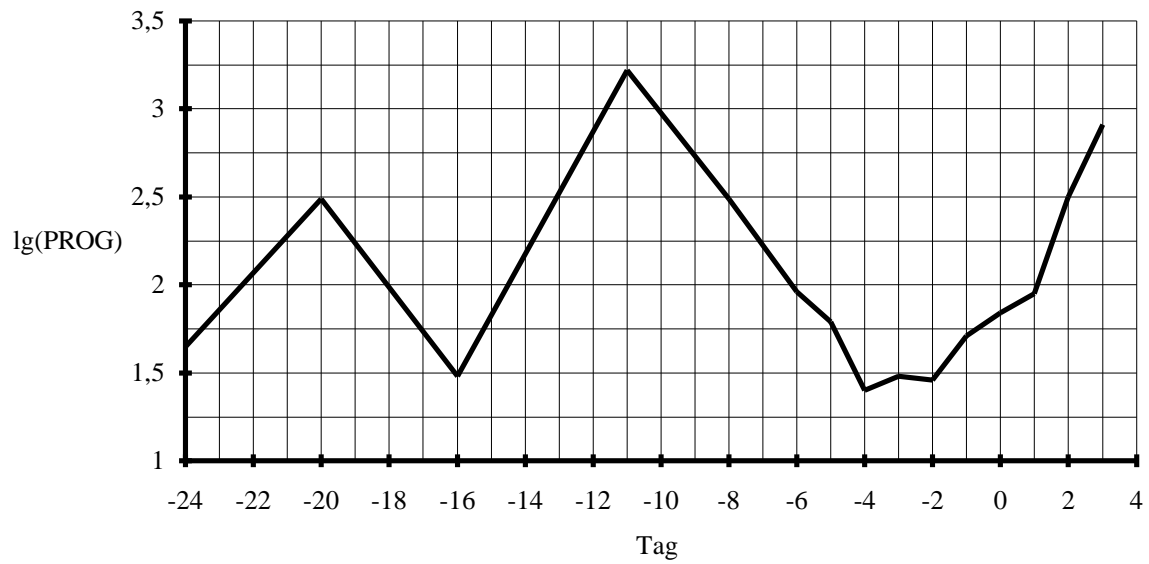


Abbildung 32: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 19

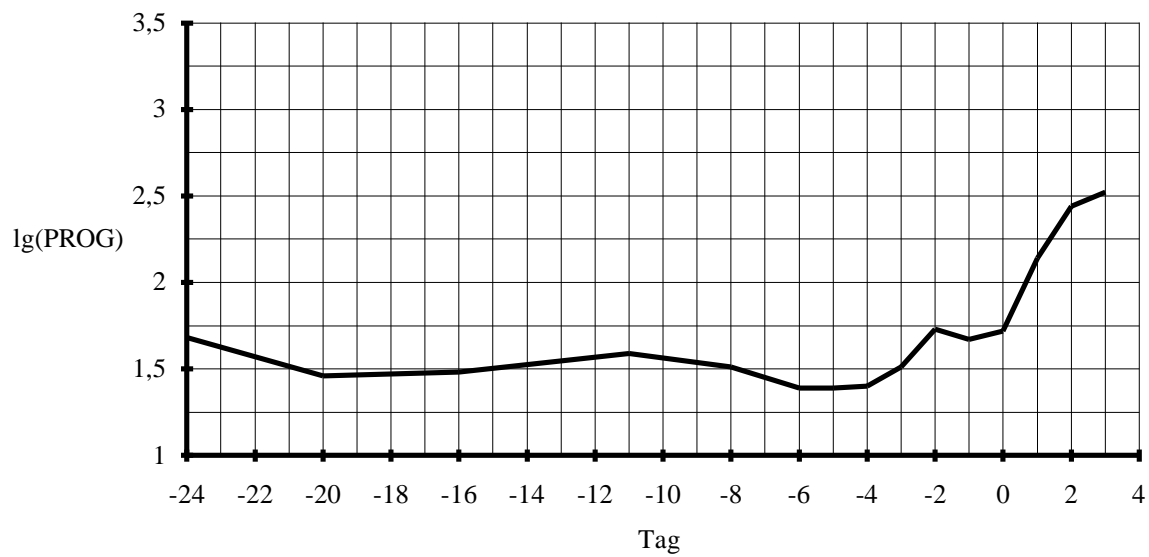


Abbildung 33: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 20

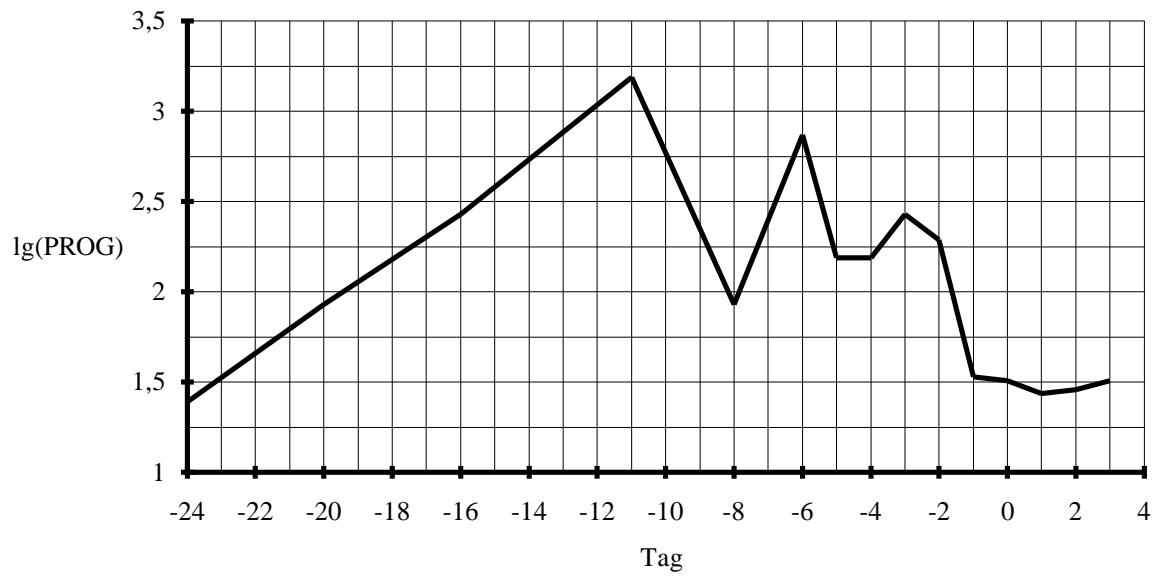


Abbildung 34: P<sub>4</sub>-Progesteron Gehalt\* im Kot der Sau Nr. 21

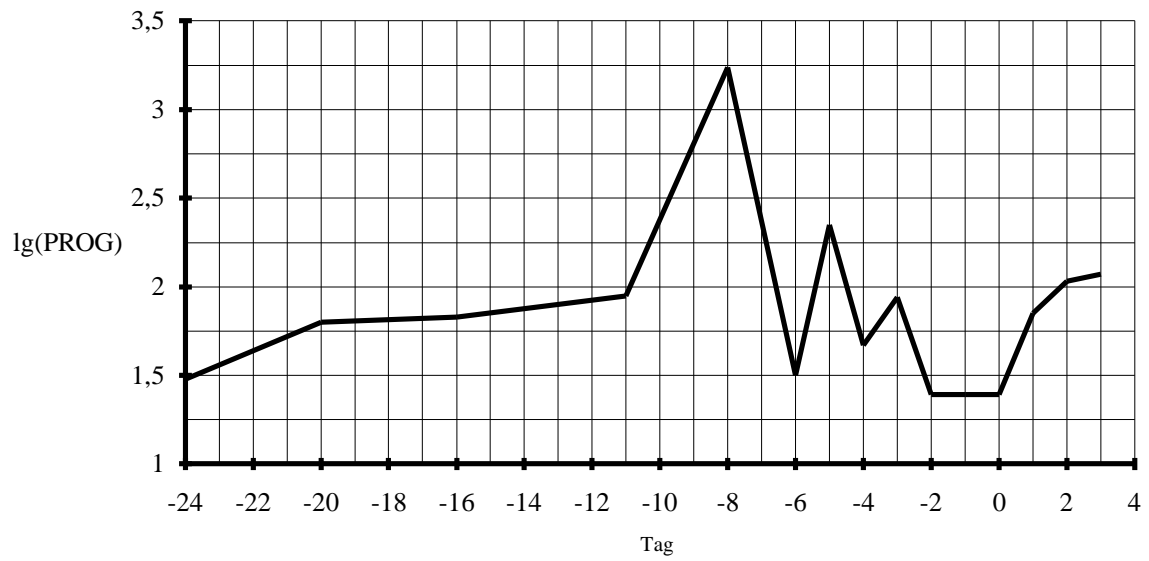


Abbildung 35: P<sub>4</sub>-Progesteron Gehalt\* im Kot der Sau Nr. 22



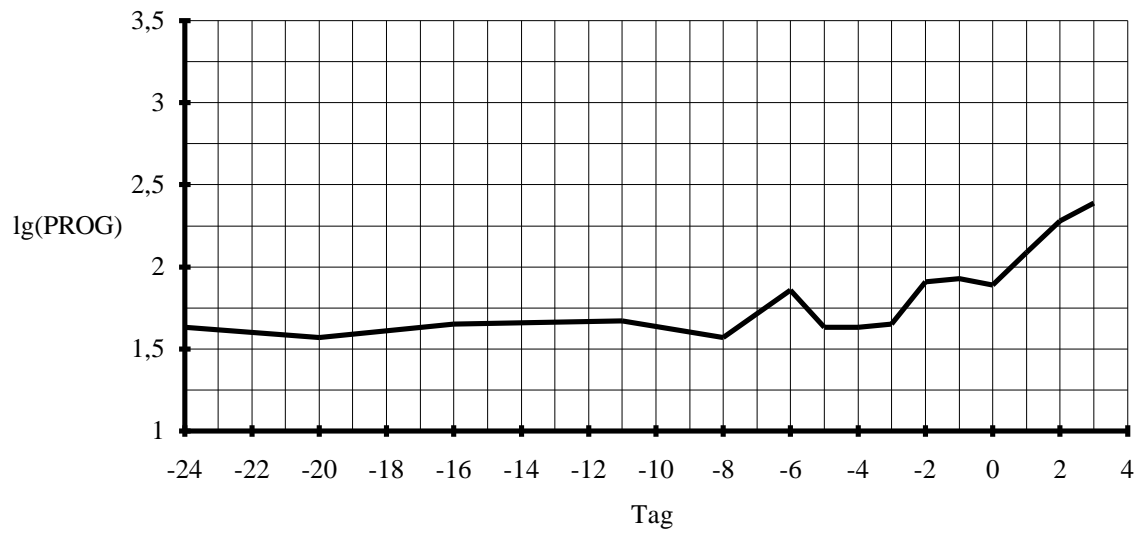


Abbildung 36: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 23

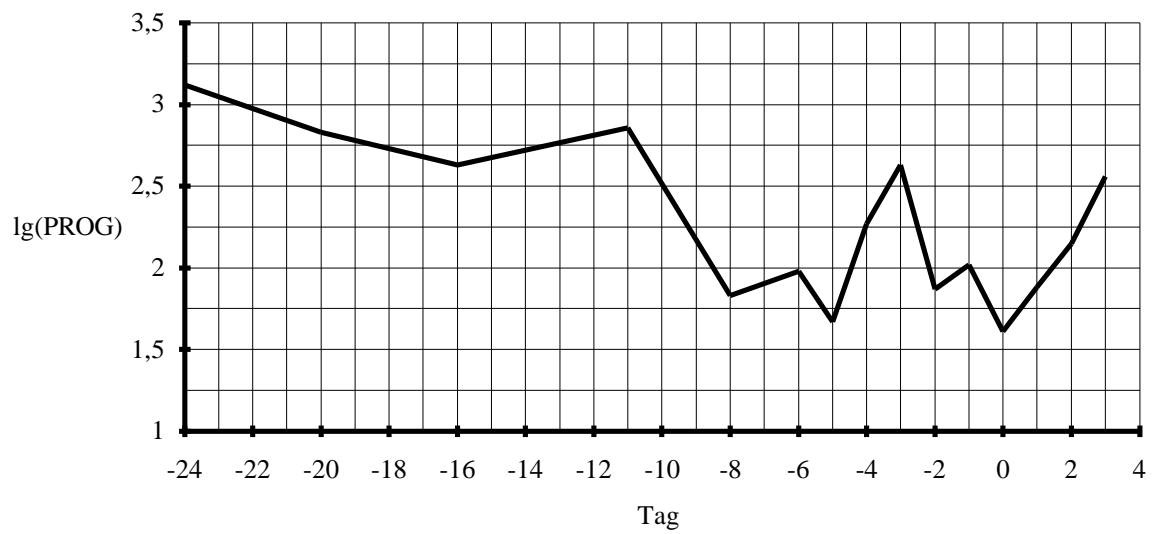


Abbildung 37: P<sub>4</sub>-Progesterongehalt\* im Kot der Sau Nr. 24

## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt meinem Lehrer und Mentor, Herrn Prof. Dr. W. Busch, für die Überlassung des Themas und die allzeit gewährte Förderung und Unterstützung.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Hybridschweinezuchtverbandes Nord/Ost, insbesondere bei Herrn H. Schewe; sowie bei Herrn Dr. B. Stähr, Frau Dr. I. Wicke und A. Retzlaff vom Institut für Fortpflanzung Landwirtschaftlicher Nutztiere Schönnow e.V., gleichzeitig bei allen Mitarbeitern der Tierklinik für Fortpflanzung und Geburtshilfe der Freien Universität Berlin (Standort Mitte), namentlich bei Dr. E. Sohst, Dr. T. Grübel, Dr. A. Münnich, Frau A. Forkmann und Frau Birkelbach für die weitreichende Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Versuche.

Frau Dr. G. Arndt und Herrn Dr. Th. Leopold danke ich für die Beratung hinsichtlich der statistischen Bearbeitung und Auswertung des Datenmaterials.

Ein besonderer Dank gilt meinem Lebenspartner Dr. R. Hinrichs für seine Unterstützung und Geduld sowie meinen Eltern und Frau M.- L. Hinrichs.

## Lebenslauf

Name: Anke Ottensmeier

Geburtsdatum: 22. 08. 1970

Geburtsort: Stralsund

Eltern: Ursula Ottensmeier, geb. Schewe  
Kurt Ottensmeier

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung: 1977 - 1987: Polytechnische Oberschule in Stralsund  
Abschluß: 10. Klasse  
1987 - 1990: Berufsausbildung mit Abitur  
im VEG(Z) Velgast, Krs. Stralsund  
Abschluß: Abitur

Berufsausbildung: 1987 - 1990: Ausbildung zum Facharbeiter für Tierproduktion,  
Spez. Rinderproduktion

Hochschul-/Univer-  
sitätsausbildung: 1990 -1996: Studium der Veterinärmedizin an der Humboldt-  
Universität zu Berlin bzw. der Freien Universität Berlin  
(Standort Mitte)

Berufstätigkeit: Juli 1996 :Erteilung der Approbation als Tierarzt  
Juli 1996 - Juli 1997: Doktorandin  
August 1997 - Januar 1998: Assistentin in der Praxis von  
Dr. K. Jedicke in Kassel  
seit Januar 1998: Assistentin in der Praxis von Dr. R. Hinrichs  
in Wismar