

4 Ergebnisse

4.1 Vorversuch

4.1.1 Beurteilung der Vorwärtsbeweglichkeit vor und nach der Kryokonservierung

Im Nativsperma betrug die mittlere Vorwärtsbeweglichkeit des Spermias der drei Hengste des Vorversuchs zwischen 26,3 und 40,0%, nach dem Tiefgefrieren nur noch 6,7 bis 34,0%. Mit Ausnahme des Hengstes 2 war die Vorwärtsbeweglichkeit des nativen Spermias deutlich und statistisch signifikant höher als die des tiefgekühlten Spermias (Abbildung 1, S. 41).

Alle drei Hengste wiesen einen direkten Zusammenhang zwischen der Vorwärtsbeweglichkeit des nativen und des tiefgekühlten Spermias auf. Sämtliche Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten R waren positiv (Tabelle 1), d.h. dass mit zunehmender Vorwärtsbeweglichkeit des nativen Spermias auch die Vorwärtsbeweglichkeit des tiefgekühlten Spermias zunahm. Allerdings erreichte dieser Zusammenhang nur für Hengst 3 die Schwelle zur statistischen Signifikanz.

Tabelle 1: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien vor und nach dem Tiefgefrieren bei den drei Hengsten des Vorversuches

	Nativ-sperma	Tiefgefrier-sperma	Wilcoxon-Test p	Spearman´scher Rangkorrelationskoeffizient	
				R	p
Hengst 1 (n = 9)	28,9 ± 12,7	6,7 ± 5,0	< 0,01	0,36	n. s.
Hengst 2 (n = 8)	40,0 ± 5,3	34,0 ± 7,4	n. s.	0,24	n. s.
Hengst 3 (n = 8)	26,3 ± 7,4	20,0 ± 10,3	< 0,05	0,79	< 0,05

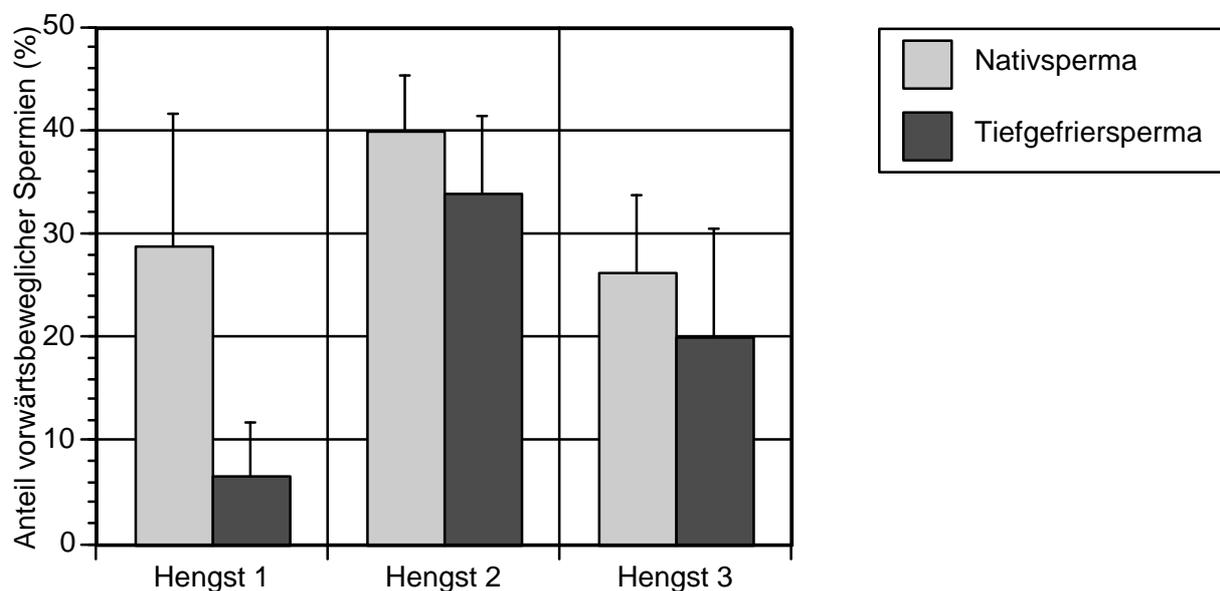


Abbildung 1: Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien in Nativ- und Tiefgefriersperma bei den drei Hengsten des Vorversuchs

4.1.2 Mukuspenetrationstest

Im Vorversuch wurden die Ergebnisse des Mukuspenetrationstests an Nativ- und verdünntem Sperma denjenigen an Tiefgefriersperma gegenübergestellt.

Im Nativsperma legten die Spermien durchschnittlich zwischen $24,5 \pm 7,0$ (Hengst 1) und $67,1 \pm 2,6$ mm (Hengst 3) zurück. Im verdünnten Sperma waren die zurückgelegten Strecken geringfügig länger (Tabelle 2). Im Tiefgefriersperma war bei den Hengsten 1 und 3, jedoch nicht bei Hengst 2, eine signifikante Abnahme der Penetrationsstrecken gegenüber dem Nativsperma zu verzeichnen. Gegenüber dem verdünnten Sperma fielen die Penetrationsstrecken im tiefgefrorenen Sperma bei Hengst 1 signifikant kürzer, bei Hengst 2 signifikant länger aus (Abbildung 2).

Bei Anwendung des Wilcoxon-Tests zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Nativ- und verdünntem Sperma ($p > 0,05$).

Tabelle 2: Penetrationsstrecken (mm) im Mukuspenetrationstest bei den drei Hengsten des Vorversuchs

	Nativ-sperma	verdünntes Sperma	Tiefgefrier-sperma
Hengst 1 (n = 9)	24,5 ± 7,0 ^a	34,2 ± 17,2 ^b	4,2 ± 11,1 ^c
Hengst 2 (n = 8)	56,3 ± 14,1	65,6 ± 4,4 ^d	67,1 ± 5,2 ^e
Hengst 3 (n = 8)	67,1 ± 2,6 ^f	69,4 ± 1,8	39,1 ± 30,3 ^g

Wilcoxon-Test: a : c: p < 0,01
b : c, d : e, f : g: p < 0,05

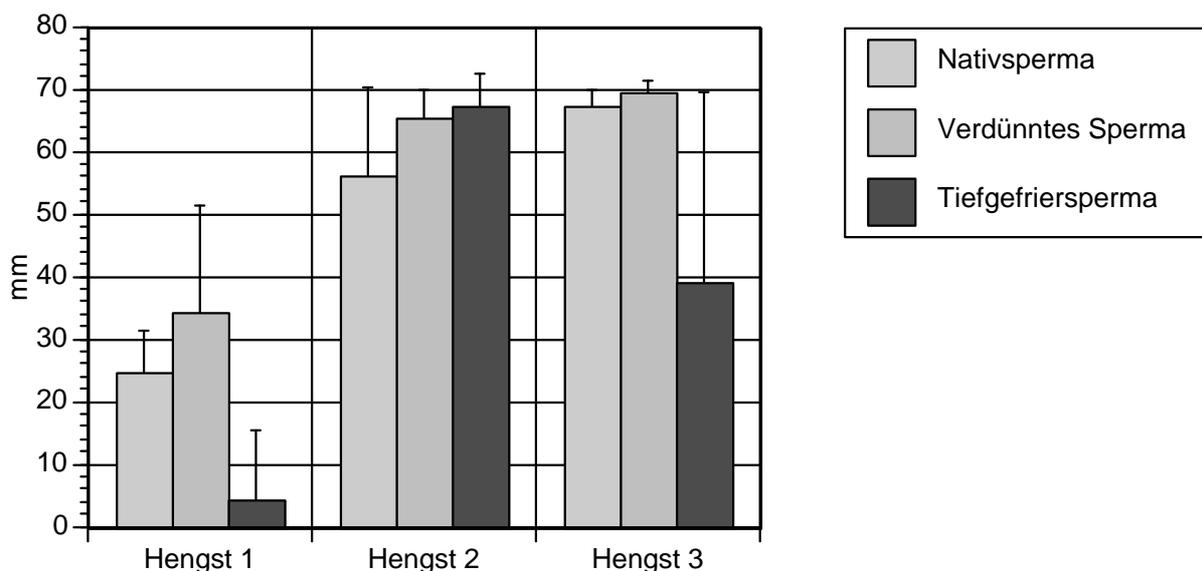


Abbildung 2: Zurückgelegte Strecken im Mukuspenetrationsversuch bei den drei Hengsten des Vorversuchs

Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den unterschiedlich aufbereiteten Spermaproben mittels Spearman'schem Rangkorrelationskoeffizienten R gibt die folgende Tabelle 3 wieder. Alle drei Hengste wiesen einen indirekten Zusammenhang zwischen der Penetrationsstrecke des nativen und des tiefgekühlten Spermas auf. Mit zunehmender Penetrationsstrecke im Nativsperma nahm die Strecke im tiefgekühlten Sperma ab. Allerdings war dieser Zusammenhang nur für Hengst 3 statistisch signifikant (Abbildung 3).

Tabelle 3: Mukuspenetrationstest: Zusammenhänge zwischen unterschiedlich aufbereitetem Sperma bei 3 Hengsten des Vorversuches, Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient

	Nativsperma/ Tiefgefriersperma	Nativsperma/ verdünntes Sperma	Tiefgefriersperma/ verdünntes Sperma
Hengst 1 (n = 9)	R = -0,16 n.s.	R = 0,05 p < 0,05	R = - 0,09 n.s.
Hengst 2 (n = 8)	R = -0,58 n.s.	R = 0,73 p < 0,05	R = -0,51 n.s.
Hengst 3 (n = 8)	R = -0,78 p < 0,05	R = -0,42 n.s.	R = 0,51 n.s.

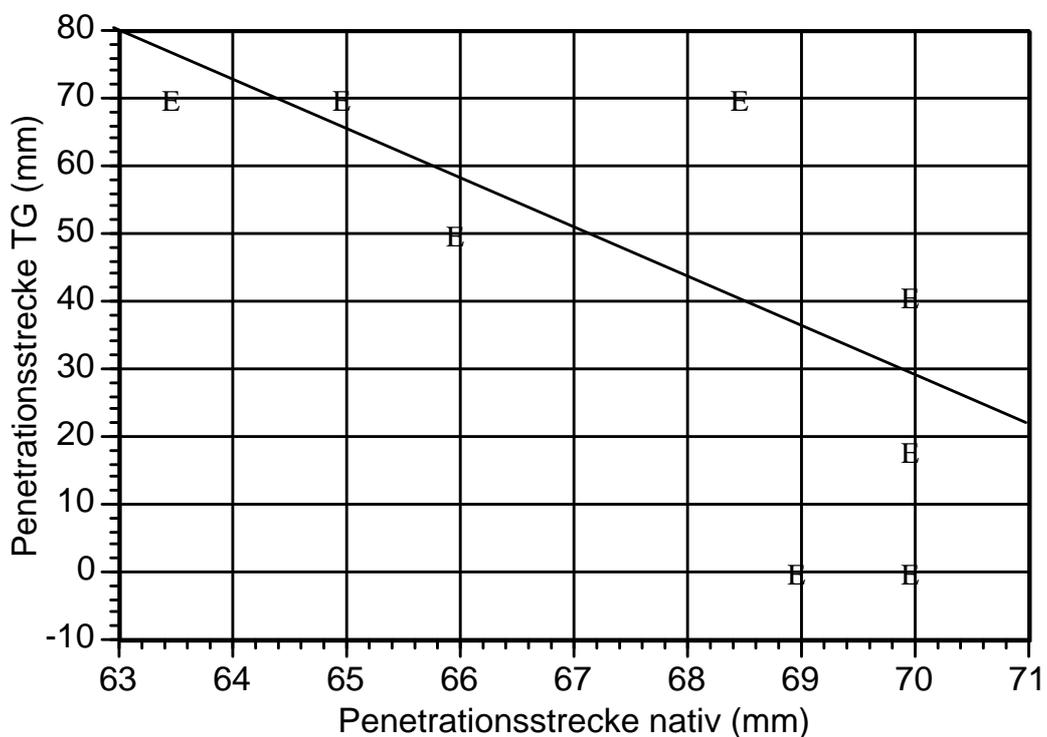


Abbildung 3: Zusammenhang zwischen Penetrationsstrecke in Nativsperma (=nativ) und Tiefgefriersperma (= TG) bei Hengst 3

4.1.3 Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse

4.1.3.1 *Prozentualer Anteil der Spermien mit Halobildung*

Auch bei der Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse wurden die Ergebnisse bei Nativ- und verdünntem Sperma denjenigen von Tiefgefriersperma gegenübergestellt (Abbildung 4). Im Nativsperma zeigten zwischen $40,2 \pm 4,4\%$ (Hengst 3) und $83,2 \pm 1,2\%$ (Hengst 2) der Spermien eine Halobildung. Die Werte im verdünnten Sperma wichen nur geringfügig hiervon ab. Bei allen drei Hengsten war im Tiefgefriersperma der Anteil der Spermien mit Halo deutlich geringer. Mittels Wilcoxon-Test waren diese Unterschiede bei Hengst 1 und 2 statistisch signifikant (Tabelle 4). Bei keinem der drei Hengste bestanden zwischen Nativ- und verdünntem Sperma signifikante Unterschiede.

Tabelle 4: Prozentualer Anteil der Spermien mit einer Halobildung bei den drei Hengsten des Vorversuchs

	Nativ-sperma	verdünntes Sperma	Tiefgefrier-sperma
Hengst 1 (n = 9)	67,0 ± 11,7 ^a	62,3 ± 12,0 ^b	30,4 ± 18,3 ^c
Hengst 2 (n = 8)	83,2 ± 1,2 ^d	81,6 ± 3,8 ^e	72,7 ± 1,6 ^f
Hengst 3 (n = 8)	40,2 ± 4,4	42,2 ± 5,7	37,5 ± 3,5

Wilcoxon-Test: a : c, b : c, d : f, e : f p < 0,05

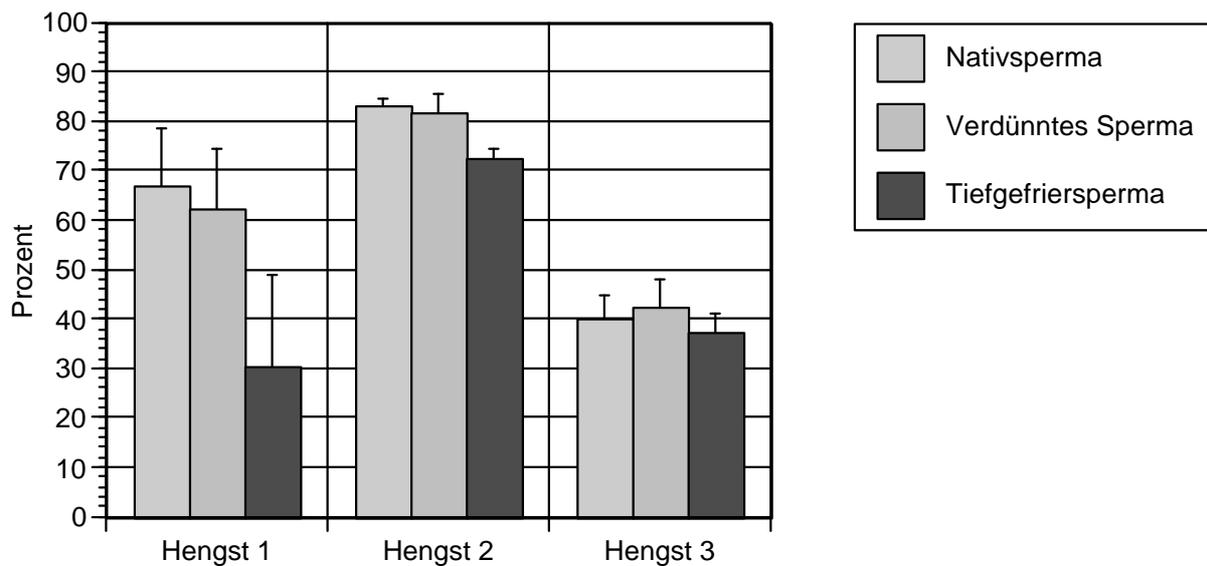


Abbildung 4: Anteil der Spermien mit Halobildung bei der Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse bei den drei Hengsten des Vorversuchs

Zur Aufdeckung der Zusammenhänge zwischen Halobildung und Art des verwendeten Spermias wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient R eingesetzt (Tabelle 5). Bei keinem der drei Hengste bestand ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen nativem und tiefgekühltem Sperma. Die Richtung des Zusammenhangs war zudem nicht einheitlich: bei Hengst 1 und 2 war der Korrelationskoeffizient positiv, bei Hengst 3 negativ, so dass aufgrund der vorliegenden Daten keine Aussagen hinsichtlich eines Zusammenhangs möglich sind.

Tabelle 5: Anteil der Spermien mit Halobildung bei der Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse. Zusammenhänge zwischen unterschiedlich aufbereitetem Sperma bei 3 Hengsten des Vorversuches, Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient

	Nativsperma/ Tiefgefriersperma	Nativsperma/ verdünntes Sperma	Tiefgefriersperma/ verdünntes Sperma
Hengst 1 (n = 9)	R = 0,21 n. s.	R = 0,75 p < 0,05	R = 0,32 n. s.
Hengst 2 (n = 8)	R = 0,31 n. s.	R = 0,51 n. s.	R = 0,06 n. s.
Hengst 3 (n = 8)	R = -0,20 n. s.	R = 0,24 n. s.	R = -0,14 n. s.

4.1.3.2 Messfehleranalyse des Halodurchmessers

Die folgenden Abbildungen zeigen den Verlauf der Fehlerperzentilen für die Bestimmung des Halodurchmessers der drei Hengste für unterschiedlich aufbereitetes bzw. Nativ-Sperma.

Für das native Sperma des Hengstes 1 (Abbildung 5) ist bei der Bestimmung des Halodurchmessers aus nur einer Messung mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% (obere Linie) ein Fehler von höchstens 11,5 µm zu erwarten. Mit 50%iger Wahrscheinlichkeit liegt der Fehler unter 2,2 µm (Linie mit ausgefüllten Quadraten) und

ein Fehler kleiner als 5 μm kann in etwa 80 von 100 Messungen erwartet werden (Interpolation zwischen den Punkten 75% und 95%).

Bestimmt man den Halodurchmesser als Mittelwert aus allen 10 Messungen eines Objektträgers, dann wird der Fehler kleiner. So ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% ein Fehler kleiner als etwa 9,5 μm und mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% ein Fehler kleiner als etwa 1,4 μm zu erwarten, und ein Fehler von 5 μm wird mit rund 90 %iger Wahrscheinlichkeit nicht überschritten.

Mit zunehmender Anzahl der einbezogenen Messungen gehen die Messfehler weiter zurück.

Der Vergleich zwischen den verschiedenen Spermakonditionen des Hengstes 1 zeigt, dass sich die Größenordnungen der Fehler für natives (Abbildung 5), verdünntes (Abbildung 6) und tiefgefrorenes Sperma (Abbildung 7) nur geringfügig unterscheiden.

Auch die Größenordnungen der Messfehler des Nativspermas für die Hengste 2 (Abbildung 8) und 3 (Abbildung 9) unterscheiden sich nur geringfügig. Für den Hengst 1 sind dagegen – insbesondere im Bereich der 95%- und der 99%-Perzentile – höhere Fehler festzustellen.

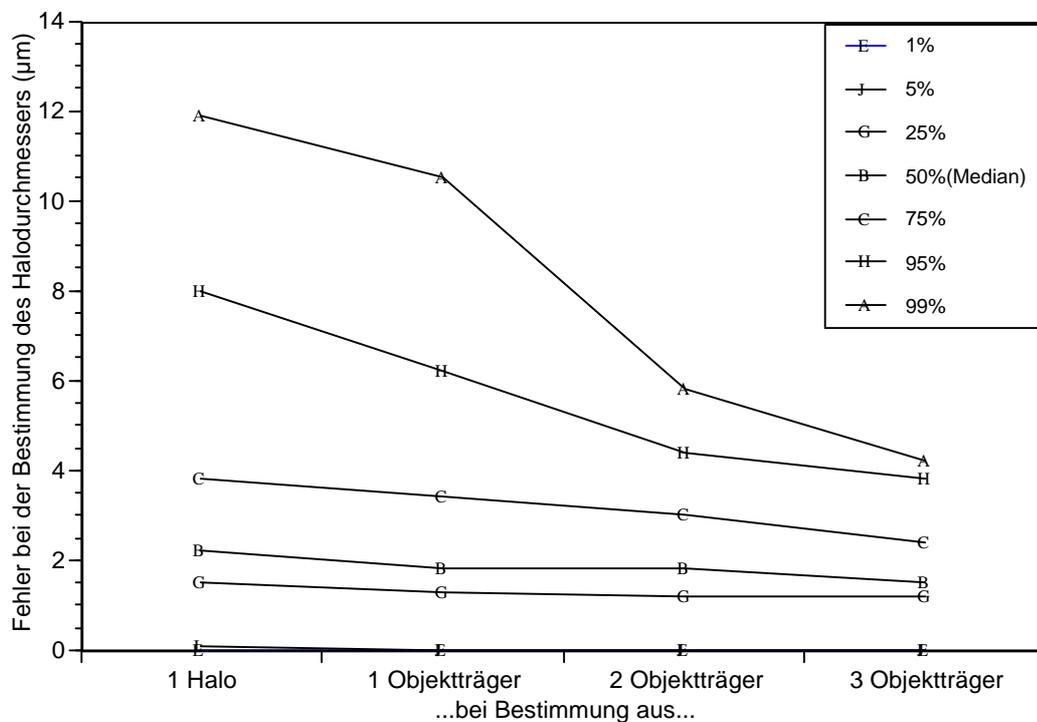


Abbildung 5: Hengst 1, Nativsperma. Entwicklung der Messfehler-Perzentilen in Abhängigkeit von der Anzahl der Messungen

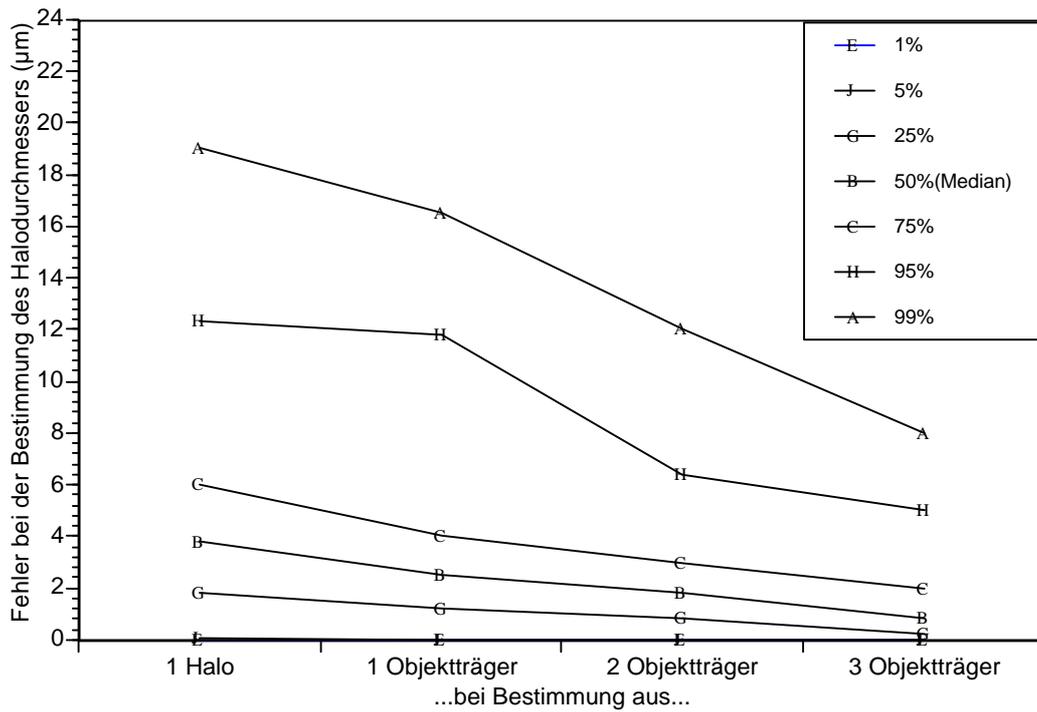


Abbildung 6: Hengst 1, verdünntes Sperma. Entwicklung der Messfehler-Perzentilen in Abhängigkeit von der Anzahl der Messungen

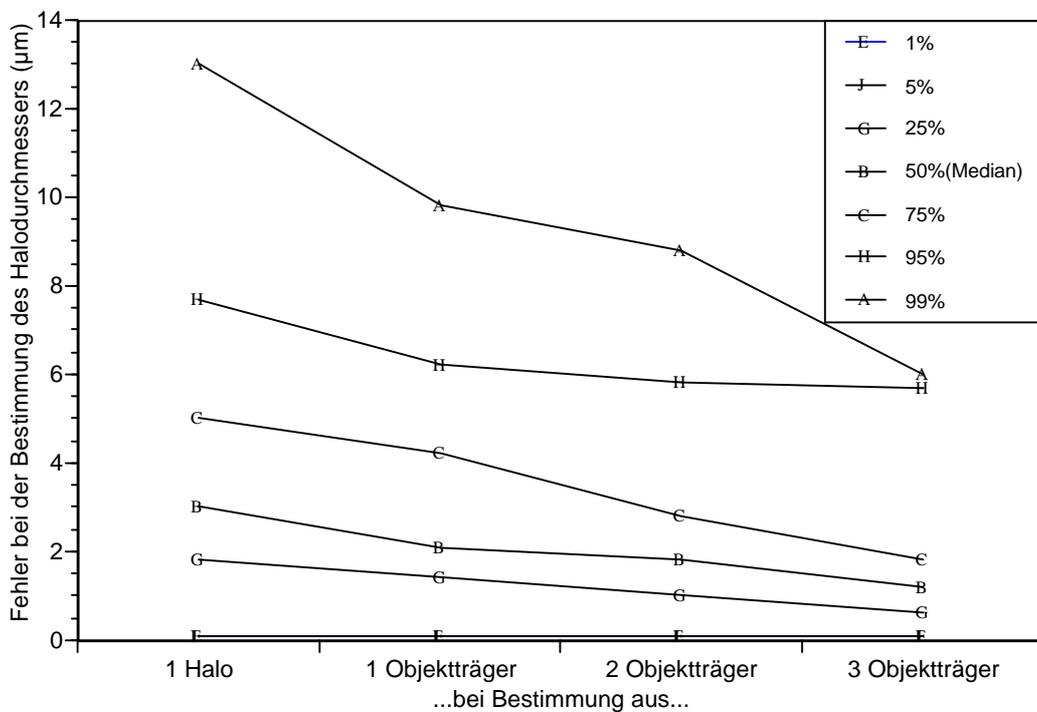


Abbildung 7: Hengst 1, Tiefgefriersperma. Entwicklung der Messfehler-Perzentilen in Abhängigkeit von der Anzahl der Messungen

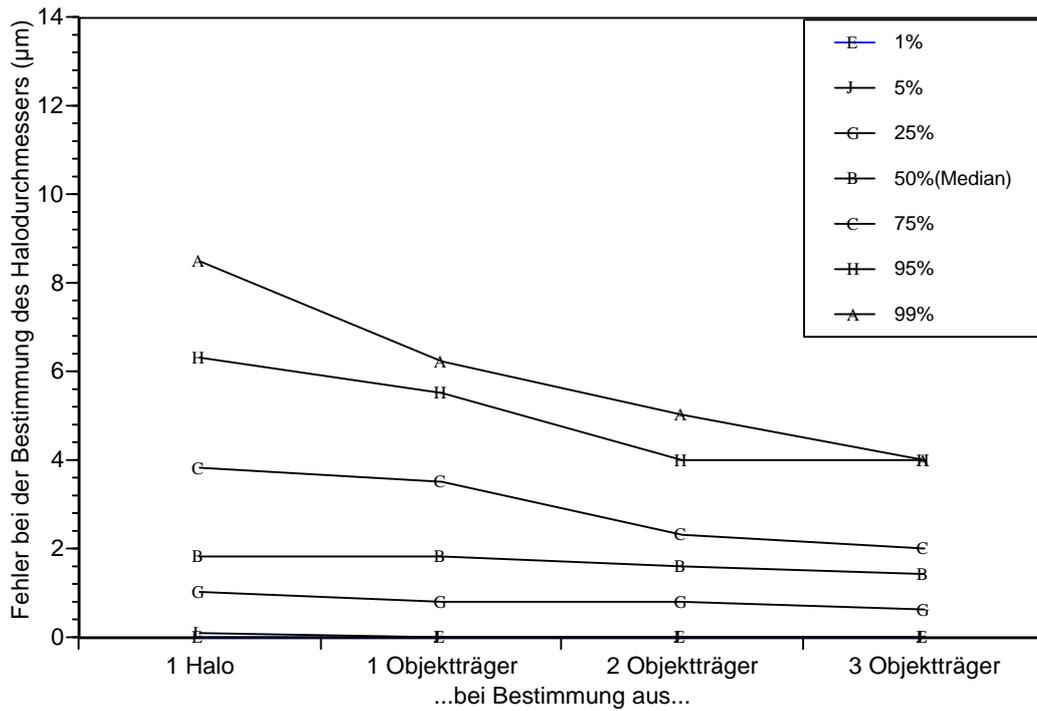


Abbildung 8: Hengst 2, Nativsperma. Entwicklung der Messfehler-Perzentilen in Abhängigkeit von der Anzahl der Messungen

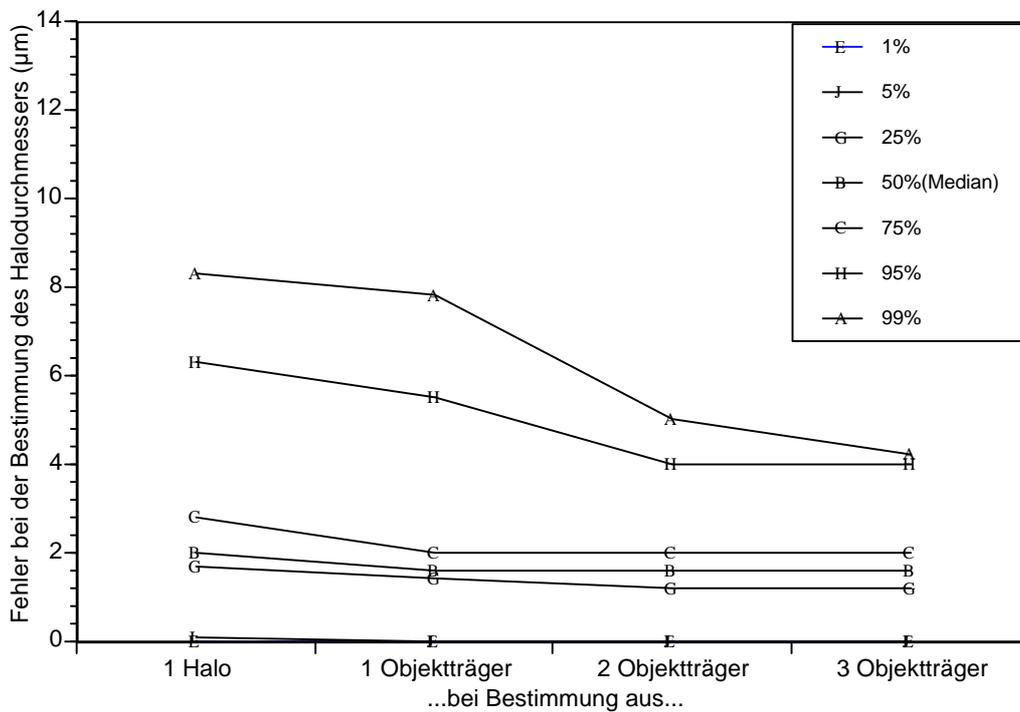


Abbildung 9: Hengst 3, Nativsperma. Entwicklung der Messfehler-Perzentilen in Abhängigkeit von der Anzahl der Messungen

4.1.3.3 Halodurchmesser

Der Halodurchmesser bei der Bestimmung der Akrosinaktivität durch Gelatinolyse betrug zwischen $24,6 \pm 3,9 \mu\text{m}$ (Hengst 1) und $31,3 \pm 3,9 \mu\text{m}$ (Hengst 2). Bei allen drei Hengsten fiel der mittlere Durchmesser im verdünnten Sperma geringfügig grösser aus (Tabelle 6). Nach dem Tiefgefrieren waren bei den drei Hengsten grössere Durchmesser als im Nativsperma zu verzeichnen. Gegenüber dem verdünnten Sperma waren die Durchmesser bei Hengst 2 ($p < 0,05$) und Hengst 3 im Tiefgefrieresperma grösser, während bei Hengst 1 eine leichte Abnahme auftrat (Abbildung 10).

Tabelle 6: Halodurchmesser (μm) bei den drei Hengsten des Vorversuchs

	Nativ-sperma	verdünntes Sperma	Tiefgefrier-sperma
Hengst 1 (n = 9)	$24,6 \pm 3,9$	$31,6 \pm 11,0$	$26,0 \pm 6,5$
Hengst 2 (n = 8)	$31,3 \pm 3,9$	$31,4 \pm 3,8^a$	$40,3 \pm 7,2^b$
Hengst 3 (n = 8)	$27,3 \pm 3,8$	$28,4 \pm 5,1$	$31,4 \pm 4,4$

Wilcoxon-Test: a : b: $p < 0,05$

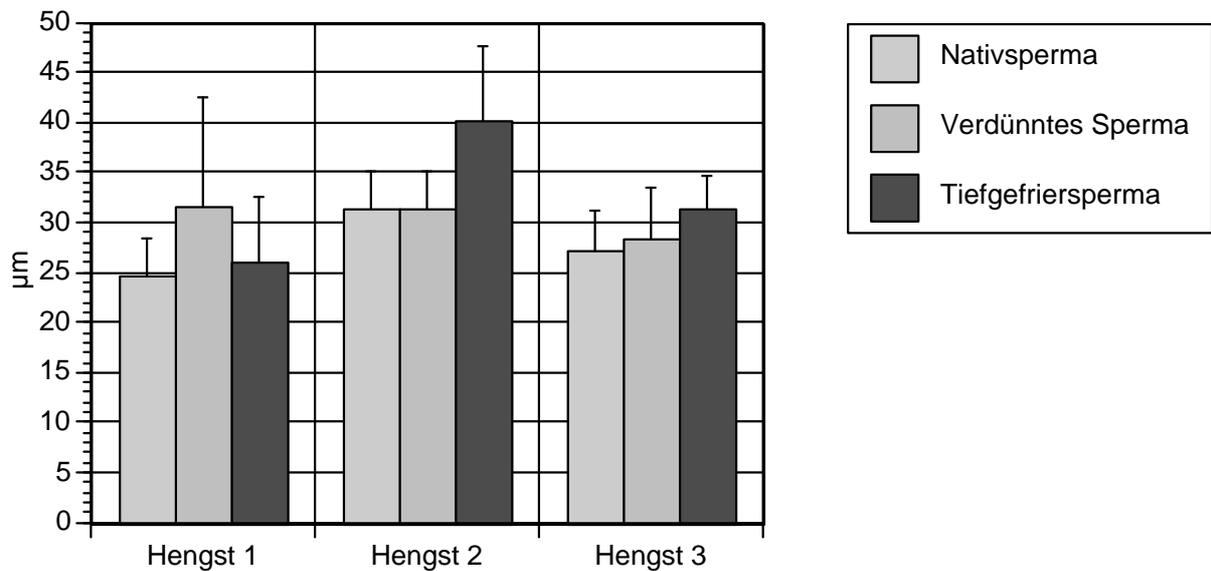


Abbildung 10: Halodurchmesser bei den drei Hengsten des Vorversuchs

Mittels Spearman'schem Rangkorrelationskoeffizienten R konnten keine Zusammenhänge zwischen dem Halodurchmesser und der Art des verwendeten Spermias nachgewiesen werden, zudem traten Wechsel zwischen positiven und negativen Rangkorrelationskoeffizienten auf (Tabelle 7).

Tabelle 7: Halodurchmesser bei der Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse. Zusammenhänge zwischen unterschiedlich aufbereitetem Sperma bei 3 Hengsten des Vorversuches, Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient

	Nativsperma/ Tiefgefriersperma	Nativsperma/ verdünntes Sperma	Tiefgefriersperma/ verdünntes Sperma
Hengst 1 (n = 9)	R = -0,37 n. s.	R = 0,41 n. s.	R = 0,29 n. s.
Hengst 2 (n = 8)	R = 0,03 n. s.	R = 0,43 n. s.	R = 0,43 n. s.
Hengst 3 (n = 8)	R = - 0,14 n. s.	R = 0,55 n. s.	R = -0,09 n. s.

4.2 Hauptversuch

4.2.1 Vorwärtsbeweglichkeit vor und nach der Kryokonservierung

Im Hauptversuch wurden 25 Ejakulate von 13 Hengsten ausgewertet. Hier betrug der mittlere Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im Nativsperma $31,6 \pm 10,7\%$. Nach dem Tiefkühlen zeigten nur noch $19,6 \pm 13,6\%$ der Spermien eine Vorwärtsbewegung (Wilcoxon-Test, $p < 0,01$).

Es bestand jedoch kein Zusammenhang zwischen der Vorwärtsbeweglichkeit vor und nach dem Tiefgefrieren (Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient $R = 0,26$, $p > 0,05$).

Tabelle 8: Prozentualer Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien vor und nach dem Tiefgefrieren bei 25 Ejakulaten von 13 Hengsten des Hauptversuchs

	Nativsperma	Tiefgefriersperma
Hauptversuch (n = 25)	$28,9 \pm 12,7^a$	$6,7 \pm 5,0^b$

Wilcoxon-Test: a : b $p < 0,01$

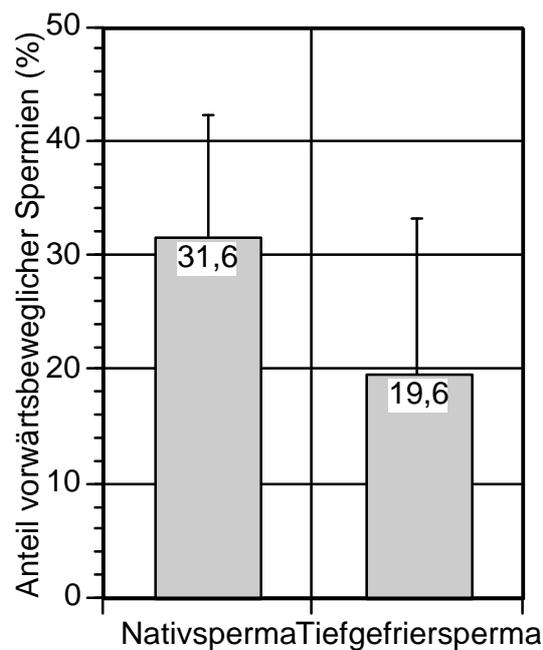


Abbildung 11: Prozentualer Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien vor und nach dem Tiefgefrieren bei 25 Ejakulaten von 13 Hengsten des Hauptversuchs

4.2.2 Mukuspenetrationstest

Im Nativsperma betrug die durchschnittliche Penetrationsstrecke $48,5 \pm 20,9$ mm, im verdünnten Sperma $55,5 \pm 19,3$ mm (Abbildung 12). Durch das Tiefgefrieren kam es gegenüber diesen beiden Werten zu einer statistisch signifikanten Reduzierung auf $35,5 \pm 31,9$ mm (Wilcoxon-Test, $p < 0,001$).

Tabelle 9: Penetrationsstrecken (mm) im Mukuspenetrationstest bei 25 Ejakulaten von 13 Hengsten des Hauptversuchs

	Nativsperma	Verdünntes Sperma	Tiefgefriersperma
Hauptversuch (n = 25)	$48,5 \pm 20,9^a$	$55,5 \pm 19,3^b$	$35,5 \pm 31,9^c$

Wilcoxon-Test: a : c, b : c $p < 0,001$

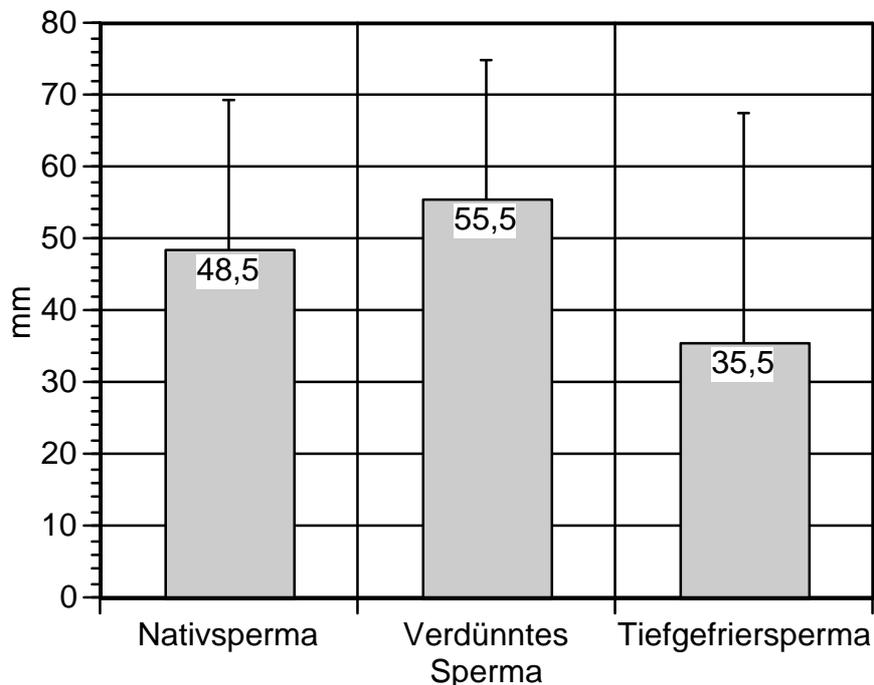


Abbildung 12: Penetrationsstrecken im Mukuspenetrationstest bei 25 Ejakulaten von 13 Hengsten des Hauptversuchs

Zwischen den Penetrationsstrecken im nativen und im Tiefgefriersperma zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($R = 0,76$, $p < 0,001$), d. h. je länger die Penetrationsstrecken vor dem Tiefgefrieren waren, desto länger fielen sie auch nach dem Tiefgefrieren aus (Abbildung 13).

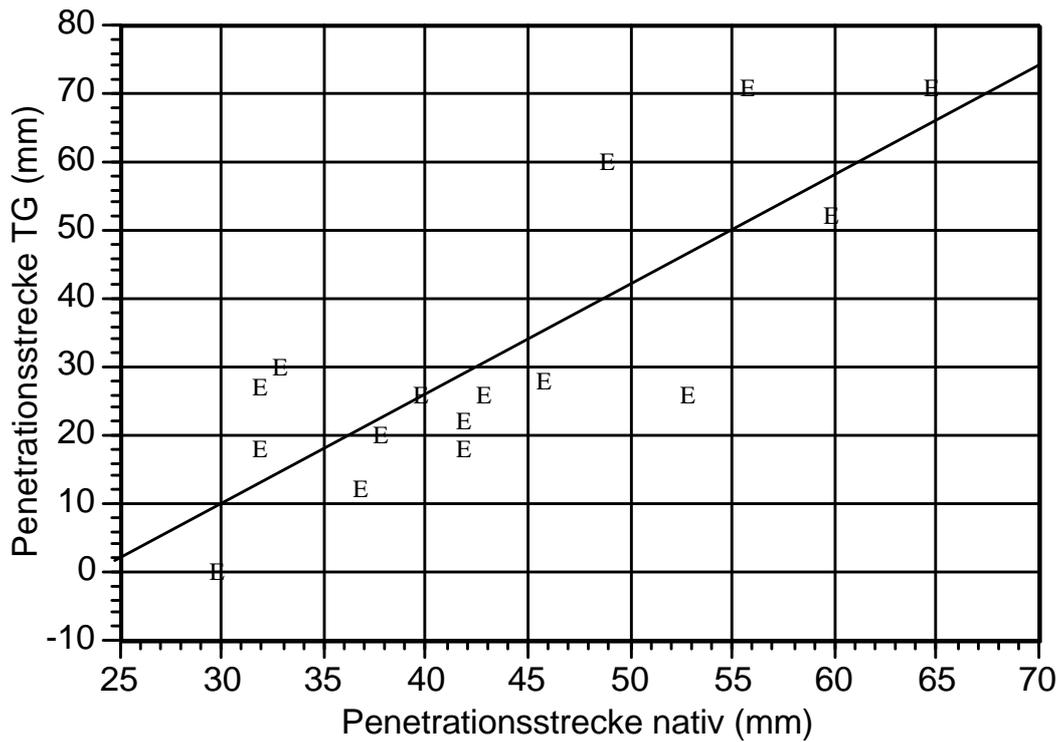


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen Penetrationsstrecken des nativen und tiefgefrorenem (TG) Sperma

4.2.3 Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse

4.2.3.1 *Prozentualer Anteil der Spermien mit einer Halobildung*

Der prozentuale Anteil an Spermien mit einer Halobildung fiel im Nativsperma und im verdünnten Sperma nahezu gleich gross aus (Abbildung 14). Er betrug im Nativsperma durchschnittlich $63,2 \pm 19,1\%$, im verdünnten Sperma $63,8 \pm 12,9\%$. Nach dem Tiefgefrieren war der Anteil der Spermien mit Halobildung auf $45,3 \pm 21,9\%$ abgesunken (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$).

Mit Hilfe des Spearman'schen Rangkorrelationskoeffizienten liess sich kein Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der Spermien mit Halobildung und der Art des Spermas nachweisen ($R = 0,24$, $p > 0,05$).

Tabelle 10: Prozentualer Anteil der Spermien mit Halobildung bei der Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse bei 25 Ejakulaten von 13 Hengsten des Hauptversuchs

	Nativ-sperma	Verdünntes Sperma	Tiefgefrier-sperma
Hauptversuch (n = 25)	63,2 ± 19,1 ^a	63,8 ± 12,9 ^b	45,3 ± 21,9 ^c

Wilcoxon-Test: a : c, b : c p < 0,05

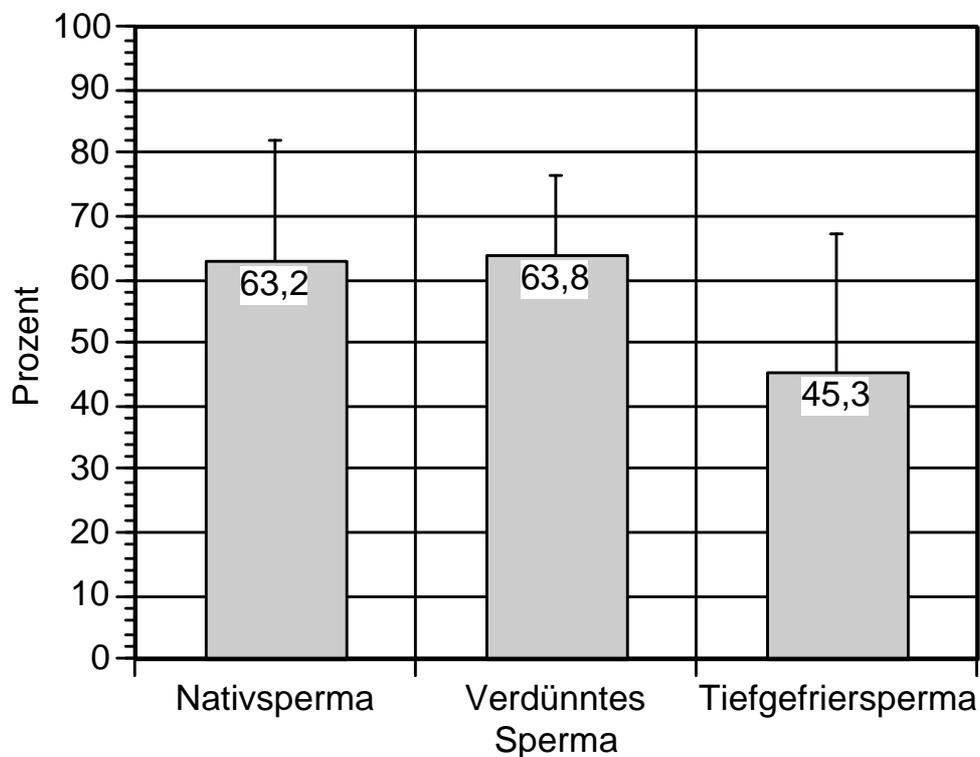


Abbildung 14: Prozentualer Anteil der Spermien mit Halobildung bei der Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse bei 25 Ejakulaten von 13 Hengsten des Hauptversuchs

4.2.3.2 Halodurchmesser

Der Halodurchmesser betrug bei Spermien aus dem Nativsperma im Mittel $27,6 \pm 4,6 \mu\text{m}$, im verdünnten Sperma $30,5 \pm 7,4 \mu\text{m}$ (Abbildung 15). Im Tiefgefrier-sperma zeigte sich ein geringfügig höherer Durchmesser von durchschnittlich $31,9 \pm 8,5 \mu\text{m}$. Der Unterschied zwischen dem mittleren Durchmesser im Tiefgefrier- und im Nativsperma war statistisch signifikant (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$).

Zusammenhänge zwischen dem mittleren Halodurchmesser bei unterschiedlicher Spermaaufbereitung bzw. Nativsperma konnten nicht nachgewiesen werden (Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient $R = 0,27$, $p > 0,05$).

Tabelle 11: Halodurchmesser (μm) bei der Akrosinbestimmung durch Gelatinolyse bei 25 Ejakulaten von 13 Hengsten des Hauptversuchs

	Nativ-sperma	Verdünntes Sperma	Tiefgefrier-sperma
Hauptversuch (n = 25)	$27,6 \pm 4,6^a$	$30,5 \pm 7,4$	$31,9 \pm 8,5^b$

Wilcoxon-Test: a : b, $p < 0,05$

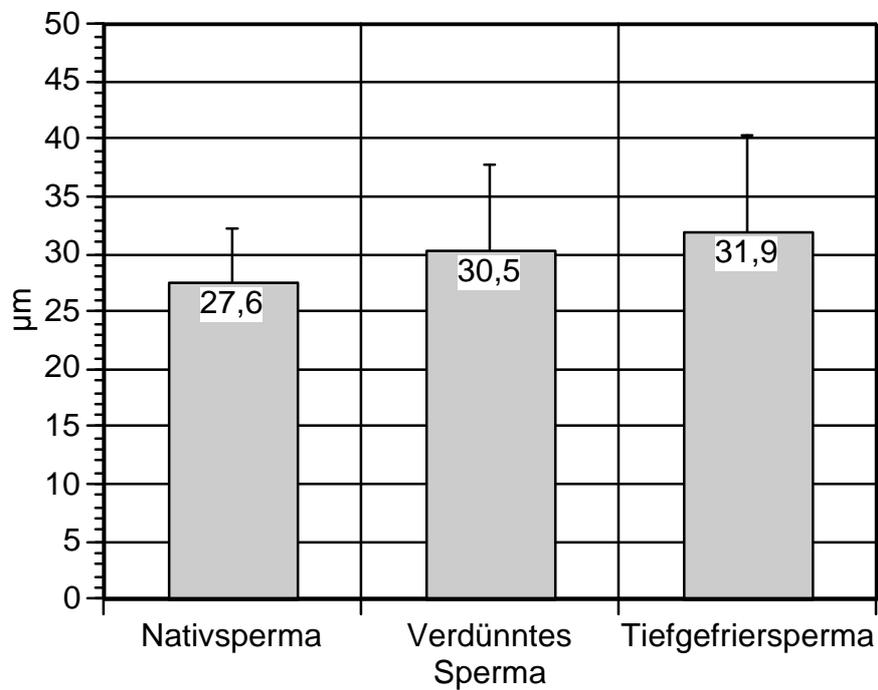


Abbildung 15: Halodurchmesser (μm) bei der Akrosinbestimmung durch Gelatinolyse bei 25 Ejakulaten von 13 Hengsten des Hauptversuchs

4.3 Statistische Analyse der Zusammenhänge zwischen Vorwärtsbeweglichkeit und Parametern des Mukuspenetrationstests bzw. der Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse bei Nativ- und Tiefgefriersperma

Es bestand ein statistisch signifikanter und direkter Zusammenhang zwischen der Vorwärtsbeweglichkeit und dem Anteil der Spermien mit Halobildung für Tiefgefriersperma ($R = 0,73$, $p < 0,01$). Auch für natives Sperma war dieser Zusammenhang vorhanden ($R = 0,47$, $p = 0,067$), allerdings war hier die Schwelle zur statistischen Signifikanz nicht ganz erreicht.

Für Tiefgefriersperma war zudem ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Vorwärtsbeweglichkeit und der Penetrationsstrecke gegeben ($R = 0,84$, $p < 0,0001$). Ein solcher Zusammenhang war für natives Sperma nicht nachzuweisen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Statistische Analyse der Zusammenhänge zwischen Vorwärtsbeweglichkeit und Parametern des Mukuspenetrationstests bzw. der Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse bei Nativ- und Tiefgefriersperma

	Variablenpaar	n	R	p
Nativ-sperma	% vorwärtsbewegliche Spermien/ % Spermien mit Halobildung	16	0,47	n. s.
	% vorwärtsbewegliche Spermien/ Halodurchmesser	16	-0,40	n.s.
	% vorwärtsbewegliche Spermien/ Penetrationsstrecke	16	0,17	n.s.
Tiefgefrier-sperma	% vorwärtsbewegliche Spermien/ % Spermien mit Halobildung	16	0,73	< 0,01
	% vorwärtsbewegliche Spermien/ Halodurchmesser	16	0,04	n.s.
	% vorwärtsbewegliche Spermien/ Penetrationsstrecke	16	0,84	$p < 0,001$