

5 Diskussion

Die vorliegende Studie hatte zum Ziel, zu prüfen, ob sich mit Hilfe des Mukus-Penetrationstests und der Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse Aussagen über die Tiefgefriereignung von Hengstsperma treffen lassen.

5.1 Spermienmotilität

Bisher stellt die Bestimmung der Motilitätsrate das in praxi am häufigsten verwendete Kriterium dar, um die Eignung von Hengstsperma für die Kryokonservierung zu testen. Mit Hilfe dieser Methode lässt sich ein durch den Tiefgefriervorgang bedingter Motilitätsverlust um etwa 60% nachweisen (COCHRAN et al. 1983, CRISTANELLI et al. 1984, KLOPPE et al. 1988, LEMOS de OLIVEIRA 1982, LOOMIS et al, 1983, MÜLLER 1987, ZIEGLER 1991, SPRECKELS 1994, KOHNE 1995).

In der Literatur wird als untere Grenze für die Gefriertauglichkeit ein Wert von mindestens 30% vorwärtsbeweglicher Spermien gefordert (KLUG 1986, LOOMIS et al. 1983, MÜLLER 1987). Dieser Wert wurde in der vorliegenden Untersuchung bei den drei Hengsten des Versuches in einzelnen Ejakulaten unterschritten: Der mittlere Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien betrug vor dem Einfrieren zwischen $26,3 \pm 7,4\%$ und $40,0 \pm 5,3\%$. Bei den 25 Ejakulaten von 13 Hengsten des Hauptversuchs zeigten durchschnittlich $31,6 \pm 10,7\%$ Spermien Vorwärtsbewegungen, so dass die Mindestanforderungen für eine Kryokonservierung knapp erfüllt wurden.

Die vielfach in der Literatur beschriebene gefrierbedingte Reduktion der Spermienmotilität bei Hengsten (COCHRAN et al. 1983, CRISTANELLI et al. 1984, KLOPPE et al. 1988, LEMOS de OLIVEIRA 1982, LOOMIS et al, 1983, MÜLLER 1987, ZIEGLER 1991, SPRECKELS 1994, KOHNE 1995) konnte nachvollzogen werden. Nach dem Auftauen betrug der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien bei den Hengsten des Vorversuchs nur noch zwischen $6,7 \pm 5,0\%$ und $34,0 \pm 7,4\%$, im Hauptversuch $19,6 \pm 13,6\%$.

Auch wenn die statistische Prüfung einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten vor und nach dem Tiefgefrieren aufzeigte (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$), wurde mittels Spearman'schem Rangkorrelationskoeffizienten kein Zusammenhang zwischen beiden Werten aufgedeckt, obwohl sich bei den Hengsten des Vorversuchs tendenziell eine positive Wechselbeziehung andeutete. Das bedeutet, dass die bisher geübte Praxis der Beurteilung der Spermienmotilität vor dem Einfrieren nur bedingt eine Prognose über die nach dem Auftauen zu erwartende Spermienmotilität erlaubt. Abgesehen hiervon scheint die Spermienmotilität nach dem Auftauen auch keinen sicheren Rückschluss auf die Konzeptionsrate zu gewähren, denn beispielsweise wurde mit Sperma hoher Motilität nach dem Auftauen keine Konzeptionen erzielt (VOSS et al. 1981). Ergänzende Methoden zur Überprüfung der Gefriereignung von Hengstsaamen scheinen daher unverzichtbar zu sein.

5.2 Mukuspenetrationstest

In der Humanmedizin hat sich für eine Fruchtbarkeitsprognose bzw. Infertilitätsdiagnose der Mukus-Penetrationstest bewährt (MORTIMER und LENTON 1983, MORTIMER et al. 1986), der auch für die Untersuchung von Tiefgefriersperma des Bullen eingesetzt wurde (GALLI et al. 1989, MATOUSEK et al. 1989). Beide genannten Untersuchungsgruppen fanden allerdings keine Korrelation zwischen der Penetrationsfähigkeit des Spermas und der Fertilität, während nach den Ergebnissen von MURASE et al. (1990) doch ein enger Zusammenhang zwischen Spermienmotilität und Penetration der Spermien im Rindermukus einerseits und der Konzeptionsrate andererseits besteht.

Die Entwicklung eines synthetischen Mukus-Ersatzes auf der Basis von Phosphatpuffer und Hyaluronsäure erlaubt die Verwendung des Mukus-Penetrationstests auch für andere Spezies (MORTIMER et al. 1990). Versuche mit Hengstsaamen wurden jedoch bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte im Vorversuch Tiefgefriersperma im Mukus-Penetrationstest zunächst ein indifferentes Verhalten im Vergleich mit Nativ- und verdünntem Sperma. Bei Hengst 1 und 3 waren die Penetrationsstrecken im aufgetauten Sperma signifikant kürzer, bei Hengst 2 länger. Im Hauptversuch war jedoch bei 25 Ejakulaten von 13 Hengsten eine signifikante Reduktion der Penetrationsstre-

cke von $48,5 \pm 20,9$ mm (Nativsperma) bzw. $55,5 \pm 19,3$ mm (verdünntes Sperma) auf $35,5 \pm 31,9$ mm zu verzeichnen (Wilcoxon-Test, $p < 0,001$). Gleichzeitig bestand ein direkter linearer Zusammenhang zwischen der Penetrationsstrecke vor und nach dem Auftauen (Spearman'scher Rangkorrelationskoeffizient $R = 0,076$, $p < 0,001$), d. h. ist diese vor dem Einfrieren lang, so ist auch mit einer langen Penetrationsstrecke nach dem Auftauen zu rechnen. Im Tiefgefriersperma – nicht aber im Nativsamen – war zudem die Penetrationsstrecke positiv mit dem prozentualen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien korreliert. Dies bedeutet, dass die Penetrationsstrecke im Nativsamen nicht mit der Spermienmotilität zusammenhängt und folglich einen unabhängigen Parameter zur Beurteilung der Gefriereignung darstellt.

5.3 Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse

Als weitere Methode wurde in der vorliegenden Untersuchung die Bestimmung der Akrosinaktivität mittels Gelatinolyse gewählt. Dieses Verfahren wird in der Humanmedizin zur Infertilitätsdiagnose herangezogen (WELKER et al. 1988). Die Proteina-seaktivität der Spermatozoen ist bei infertilen Männern signifikant geringer als bei fertilen (WELKER et al. 1988). Im veterinärmedizinischen Bereich wurde das Verfahren bisher bei Labortieren (GADDUM und BLANDAU 1970, GADDUM-ROSSE und BLANDAU 1972, CARILLO 1978) und Bullen (GADDUM und BLANDAU 1970, GADDUM-ROSSE und BLANDAU 1972, WENDT 1974, MATOUSEK et al. 1989) eingesetzt.

1980 wurde die Eignung des Tests auch für die Beurteilung von Hengstsperma nachgewiesen: VIEIRA (1980) untersuchte mit Hilfe der Gelatinolyse verschiedene Einfrier-, Auftau- und Pelletierverfahren in Abhängigkeit von Alter und Deckfrequenz der Hengste. Es bestanden, besonders nach langer Deckruhe, Beziehungen zwischen der Spermienmorphologie und der Akrosinaktivität (VIEIRA 1980). Im Nativsperma fand er bei 80-90% morphologisch unauffälliger Spermien eine lytische Akrosinaktivität.

In der vorliegenden Untersuchung war im Hauptversuch die Akrosinaktivität anhand der Halobildung bei $63,2 \pm 19,1\%$ (Nativsperma) bzw. $63,8 \pm 19,1\%$ (verdünntes Sperma) der Spermatozoen erkennbar. Der Anteil im Nativsperma war folglich deutlich geringer als der von VIEIRA (1980) ermittelte. Eine Begründung hierfür ist die

vermutlich von vornherein geringere Samenqualität der hier untersuchten Hengste, die sich auch in der geringen Motilität der Spermien im Nativsperma zeigte. Wie bereits oben erwähnt, lag der Anteil der motilen Spermien im Nativsperma an der unteren Grenze der Mindestanforderungen.

Durch die Tiefgefrierung fand eine signifikante Reduktion des Anteils an Samenzellen mit Halos auf $45,3 \pm 21,9\%$ statt. Es bestand aber keine Korrelation zwischen dem Anteil von Spermatozoen mit Lysisaktivität vor und nach dem Tiefgefrieren.

Die Prüfung des Zusammenhanges zwischen dem Anteil der vorwärtsbeweglicher Spermien und dem Anteil an Samenzellen mit Halobildung erbrachte keine Korrelation für das Nativ-, wohl aber für das Tiefgefriersperma. Diese Korrelation war positiv, d. h. dass im aufgetauten Sperma mit zunehmendem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien auch der Anteil an Spermien mit Halobildung zunahm.

Die widersprüchliche Beziehung zwischen der Spermien-Motilität und der Akrosinaktivität bei nativem und aufgetautem Sperma beruht vermutlich darauf, dass das Vorhandensein einer intakten Kopfkappe keine obligatorische Voraussetzung für die Beweglichkeit eines Spermiums darstellt (SAAKE 1970). Auch BAUMGARTL (1980) wies darauf hin, dass nicht unbedingt eine Korrelation zwischen der Motilität der Samenzellen und der Integrität ihrer Akrosome bestehen muss. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Bestimmung der Akrosinaktivität mittels Gelatinolyse eine Ergänzung der Motilitätsdiagnostik darstellen kann.

Die Auswertung der Halodurchmesser erwies sich als allein wenig aussagekräftiger Parameter für die Beurteilung der Gefriertauglichkeit von Hengstsperma. Zwar zeigte sich bei Tiefgefriersperma eine geringgradig höhere Variabilität der Halodurchmesser (Nativsperma $27,6 \pm 4,6 \mu\text{m}$, verdünntes Sperma $30,5 \pm 7,4 \mu\text{m}$, Tiefgefriersperma $31,9 \pm 8,5 \mu\text{m}$), die bereits WENDT et al. (1975) bei ihren Untersuchungen an Ebersperma aufgefallen war, jedoch waren bereits im Vorversuch die Halodurchmesser im Tiefgefriersperma teils grösser, teils kleiner als im nativen oder verdünnten Sperma. Auch im Hauptversuch erbrachte die Auswertung von 25 Ejakulaten von 13 Hengsten keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den Werten vor und nach dem Tiefgefrieren. Messfehler als Ursache für eine fehlende Korrelation können ausgeschlossen werden, da die Messfehleranalyse der Halomessungen eine hinreichende Genauigkeit bezüglich der Anzahl der durchgeführten Messungen ergab (s. Kap. 4.1.3.2).

Hieraus folgt, dass für die Beurteilung der Gefriereignung mittels Akrosinbestimmung die Auswertung der Halodurchmesser nicht unbedingt eine qualitative Einschätzung

erlaubt, sondern nur die quantitative Erfassung des Anteils von Samenzellen mit Lysohämolyse. VIEIRA (1980) versuchte, durch eine Einteilung in Reaktionsklassen (keine Akrosinaktivität, Halo = 25 µm, Halo > 25 µm) zu einer qualitativen Aussage zu gelangen, erzielte jedoch auch bei seinen zahlreichen Einzelversuchen zu verschiedenen Einfrier-, Auftau- und Pelletierverfahren in widersprüchliche Ergebnisse. Wie bei VIEIRA (1980) war auch in der vorliegenden Untersuchung die Fallzahl untersuchter Hengste vergleichsweise gering. Möglicherweise sind hier durch den Einsatz einer grossen Tiergruppe noch Verbesserungen hinsichtlich einer Aussage zur Samenqualität möglich. Da sich die Akrosinbestimmung mittels Gelatinolyse prinzipiell als eine geeignete Methode erwies, um Unterschiede zwischen Nativ-, verdünntem und Tiefgefriersperma aufzuzeigen, erscheint die Durchführung einer umfangreicheren Testreihe sinnvoll.

Zusammenfassend lassen sich durch die Messung der Penetrationsstrecke beim Mukuspenetrationstest Unterschiede zwischen Nativ- und Tiefgefriersperma aufdecken. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den Penetrationsstrecken vor und nach dem Auftauen. Die Länge der Penetrationsstrecke weist keinen Zusammenhang mit der Spermienmotilität auf und stellt folglich einen unabhängigen Parameter zur Beurteilung der Tiefgefriereignung dar.

Mittels Gelatinolyse lässt sich eine Reduktion des Anteils lysisaktiver Spermien nach dem Tiefgefrieren nachweisen. Im aufgetauten Sperma ist der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien positiv mit dem Anteil an Spermien mit Halobildung korreliert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Vorhandensein einer intakten Kopfkappe keine obligatorische Voraussetzung für die Spermienbeweglichkeit darstellt.

Die alleinige Auswertung des Halodurchmesser ist für die Beurteilung der Gefrier-tauglichkeit nicht geeignet.