

Aus dem Pferdezentrum Bad Saarow  
der Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

---

**Einfluss von Seminalplasma auf die Motilität  
von gekühltem Hengstsamen  
nach einer hochkonzentrierten Lagerung**

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

vorgelegt von  
**Julia Anna Kristin Lübke**  
Tierärztin aus Hamburg

Berlin 2016

Journal-Nr.: 3833

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Handler  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Rudolf Staufenbiel

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

accessory glands, artificial insemination, semen diluents, semen preservation,  
seminal plasma, spermatozoa, stallions

Tag der Promotion: 11.11.2016

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-774-3

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2016**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2016

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

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

## **Meiner Familie**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATUR .....</b>	<b>2</b>
2.1 Fraktionen des Hengstejakulats .....	2
2.2 Biochemische Zusammensetzung des Seminalplasmas .....	3
2.2.1 Proteine .....	3
2.2.2 Enzyme .....	7
2.2.2.1 Aspartat-Aminotransferase (AST) .....	7
2.2.2.2 Laktat-Dehydrogenase (LDH) .....	8
2.2.2.3 Alkalische Phosphatase (AP) .....	8
2.2.2.4 Saure Phosphatase (acP, acid phosphatase) .....	8
2.2.2.5 $\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT) .....	8
2.2.2.6 Glykosidasen .....	9
2.2.2.7 Lipase .....	9
2.2.2.8 Carboanhydrase (CA).....	10
2.2.2.9 PAF-Acetylhydrolase .....	10
2.2.3 Elektrolyte .....	11
2.2.3.1 Mengenelemente .....	11
2.2.3.2 Spurenelemente .....	13
2.2.4 Hormone .....	14
2.2.5 Saisonaler Einfluss auf die Zusammensetzung des Seminalplasmas.....	16
2.3 Methoden zur Reduktion des Seminalplasma-Anteils.....	17
2.3.1 Verdünnung des Samens .....	17
2.3.2 Zentrifugation .....	17
2.3.3 Fraktionierte Samengewinnung .....	19
2.3.4 Spermienfilter .....	19
2.4 Optimale Seminalplasma-Konzentration in der Besamungsportion.....	20
2.5 Einfluss des Seminalplasmas auf die „post-breeding Endometritis“ .....	21
2.6 Einfluss des Seminalplasmas auf den Zeitpunkt der Ovulation .....	24
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>27</b>
3.1 Probandenkollektiv .....	27
3.2 Samenentnahme .....	28
3.3 Entnahmezeitpunkte .....	28

3.4 Standardspermatologische Untersuchung.....	29
3.4.1 Makroskopische Untersuchung.....	29
3.4.2 Mikroskopische Untersuchung .....	30
3.4.2.1 Motilität.....	30
3.4.2.2 Agglutinationen.....	31
3.4.2.3 Fremdzellen.....	31
3.4.3 Dichte .....	31
3.4.4 pH-Wert .....	32
3.5 Gewinnung von Seminalplasma .....	32
3.6 Eingesetzte Verdüner.....	33
3.7 Konfektionierung von Kühlsamen.....	34
3.7.1 Konfektionierung 1 (HU 25).....	34
3.7.2 Konfektionierung 2 (HZ 25) .....	36
3.7.3 Konfektionierung 3 (HZ 333) .....	37
3.7.3.1 Versuchsschritt 1: Verdünnung auf 333 Mio. Spermien/ml nach Zentrifugation	37
3.7.3.2 Versuchsschritt 2: Verdünnung auf 25 Mio. Spermien/ml mit 0, 5, 20 und 80 % Seminalplasma im Verdüner.....	38
3.7.4 Die 3 Samenaufbereitungsmethoden im Überblick .....	39
3.8 Statistische Auswertung.....	40
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>41</b>
4.1 Standardspermatologische Untersuchung.....	41
4.1.1 Makroskopische Untersuchung.....	41
4.1.2 Mikroskopische Untersuchung .....	42
4.1.2.1 Motilität im Nativsamensamen .....	42
4.1.2.2 Agglutinationen.....	43
4.1.2.3 Fremdzellen.....	43
4.1.3 Dichte .....	44
4.1.4 pH-Wert .....	44
4.2 Einfluss der Konfektionierung auf die Spermienmotilität bei verschiedenen Verdünnern	45
4.2.1 BotuSemen .....	45
4.2.2 EquiPro .....	47
4.2.3 Gent.....	49
4.2.4 INRA 96.....	51
4.2.5 Zusammenfassung Konfektionierung .....	53
4.3 Einfluss des Verdüners auf die Spermienmotilität bei verschiedenen Konfektionierungen .....	54
4.3.1 Konfektionierung 1 (HU 25).....	54

4.3.2 Konfektionierung 2 (HZ 25) .....	56
4.3.3 Konfektionierung 3 (HZ 333 0 % SP) .....	58
4.3.4 Konfektionierung 3 (HZ 333 5 % SP) .....	60
4.3.5 Konfektionierung 3 (HZ 333 20 % SP) .....	62
4.3.6 Konfektionierung 3 (HZ 333 80 % SP) .....	64
4.3.7 Zusammenfassung Verdüner .....	66
4.4 Hengstspezifische Einflüsse auf die Spermienmotilität .....	67
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>76</b>
5.1 Einfluss der Konfektionierung auf die Spermienmotilität.....	76
5.2 Einfluss des Verdüners auf die Spermienmotilität .....	80
5.3 Hengstspezifische Einflüsse auf die Spermienmotilität .....	82
5.4 Ausblick.....	85
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>86</b>
<b>7. SUMMARY .....</b>	<b>88</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>90</b>
<b>9. ANHANG.....</b>	<b>99</b>
9.1 Abbildungsverzeichnis .....	99
9.2 Tabellenverzeichnis .....	100
9.3 Gesamt- und Vorwärtsmotilitäten der einzelnen Hengste .....	102

## Abkürzungsverzeichnis

acP	acid phosphatase (saure Phosphatase)
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
β-NGF	β-Nerve Growth Factor
BS	BotuSemen
CA	Carboanhydrase
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
Ca <sub>TOTAL</sub>	Gesamtcalcium
Cl	Chlorid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRISP	cysteine-rich secretory proteins
Cu	Kupfer
DHEA	Dehydroepiandrosteron
EHV	Equines Herpesvirus
EP	EquiPro
et al.	et alii (und andere)
Fe	Eisen
g	Zentrifugationskraft
GGT	γ-Glutamyltransferase
GM	Gesamtmotilität
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
GPC	Glycerylphosphorylcholin
H <sup>+</sup>	Proton, Kation des Wasserstoffs
H0/H24/H48	Haltetest nach 0/24/48 Stunden
hCG	humanes Choriongonadotropin
HCO <sup>3-</sup>	Bikarbonat
HDL	High-Density Lipoprotein
HSP 1-8	Horse Seminal Proteins 1-8 (Proteine im equinen SP)
HU 25	Haltetest einer unzentrifugierten Lagerung bei 25 Mio. Spermien/ml
HZ 25	Haltetest einer zentrifugierten Lagerung bei 25 Mio. Spermien/ml
HZ 333	Haltetest einer zentrifugierten Lagerung bei 333 Mio. Spermien/ml
IU	International Unit, internationale Einheit
K <sup>+</sup>	Kalium
kDa	Kilodalton



kg	Kilogramm
KLK2	Kallikrein-1E2
l	Liter
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	Low-Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
min	Minute
Mio.	Million
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mmol	Millimol
Mrd.	Milliarden
Na <sup>+</sup>	Natrium
NAG	N-acetyl-β-D-Glukosaminidase
NET	Neutrophil Extracellular Trap
O	Ortstmotilität
OIF	Ovulations-induzierender Faktor
P	Phosphor
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
pg	Pikogramm
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
SOD	Cu-Zn-Superoxid-Dismutase
SP	Seminalplasma
U	Unbewegliche Spermien
V	Vorwärtsmotilität
Zn	Zink



## 1. Einleitung

Der gekühlte Versand von Hengstsamen hat sich in der Pferdezucht aufgrund vielfältiger züchterischer und veterinärhygienischer Vorteile fest etabliert. Die kontinuierliche Verbesserung der Qualität von Besamungsportionen ist von großer Bedeutung, um die Trächtigkeitsraten bei der Verwendung von Kühlsamen weiter zu optimieren.

Bei der routinemäßigen Samenaufbereitung muss ein relativ großes Besamungsvolumen von 15 - 20 ml gekühlt verschickt werden. Durch die Etablierung einer volumensparenderen Konservierungsmethode könnten in Zukunft Versandkosten eingespart werden.

Jede Form der Samenkonservierung erfordert zunächst den Zusatz eines Frischsamenverdünners, der die Spermien während der Lagerung mit ausreichend Nähr- und Schutzsubstanzen versorgt und vor Kälteschäden schützt. Gleichzeitig führt die Zugabe des Verdünners zu einer Reduktion der schädlichen Faktoren im Seminalplasma (SP). Eine häufig angewandte Methode der Samenaufbereitung ist die Verdünnung des Ejakulats direkt nach der Samengewinnung auf 25 Mio. Spermien/ml oder alternativ eine Verdünnung auf diese Konzentration nach Zentrifugation und Entfernung des SP.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Form der Samenkonservierung getestet, die zu einer Reduzierung des Versandvolumens führt. Der Samen wurde bei einer sehr hohen Dichte von 333 Mio. Spermien/ml gelagert, so dass bei guter Samenqualität nur ein Volumen von 1,5 ml verschickt werden müsste. Erst nach der Lagerung über 48 Stunden wurde so viel Verdünner hinzugefügt, dass eine besamungsübliche Konzentration von 25 Mio. Spermien/ml entstand.

Der nach der Lagerung zugefügte Verdünner enthielt 0, 5, 20 oder 80 % autologes SP. Die Anwesenheit von SP in der Besamungsportion schützt die Spermien auf ihrem Weg durch den weiblichen Genitaltrakt und kann zu einer Optimierung der Trächtigkeitsergebnisse beitragen. Da das SP aber auch die Chromatinintegrität der Spermien mindert, sollten die Samenzellen nicht über längere Zeit in diesem Medium gelagert werden. Aus diesem Grund wurde das SP gemeinsam mit dem Verdünner in der vorliegenden Arbeit erst nach der Lagerung hinzugefügt.

Ziel der Studie war die Beurteilung der hochkonzentrierten Samenlagerung im Vergleich zu zwei herkömmlichen Samenaufbereitungsmethoden und die Bestimmung des Einflusses der Zugabe von verschiedenen SP-Konzentrationen nach Samenlagerung auf die Spermienmotilität unter Verwendung von vier unterschiedlichen Frischsamenverdünnern (BotuSemen, EquiPro, Gent, INRA 96).

## 2. Literatur

### 2.1 Fraktionen des Hengstejakulats

Der Hengst weist eine mehrphasige Ejakulation mit etwa 5 - 10 aufeinanderfolgenden, stoßartigen „Samenstrahlen“ auf (TISCHNER et al., 1974). Mithilfe von offenen Scheidenmodellen (z.B. Krakower Modell) oder automatisierten Phantomen (z.B. Equidame®) lassen sich die Ejakulatfraktionen separat gewinnen und analysieren.

Beim Hengst, wie auch bei vielen anderen Spezies, kommt es zu einer sequentiellen Freisetzung der Sekrete aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, so dass die Zusammensetzung von SP in den einzelnen Fraktionen variiert (MAGISTRINI et al., 2000). Da die verschiedenen Fraktionen an bestimmten Orten im weiblichen Genitaltrakt nacheinander platziert werden, kommen die Spermien nicht zwangsläufig mit allen Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen in Berührung. Anders verhält es sich bei der routinemäßigen Samengewinnung, wo meist das ganze Ejakulat in einem Gefäß aufgefangen und die Samenzellen somit allen Bestandteilen des SP gleichermaßen ausgesetzt werden. Diese Vermischung aller Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen sowie die lange Kontaktdauer zwischen Spermien und SP ist in dieser Form nicht in der Natur zu finden und sollte bei der instrumentellen Samenübertragung als Besonderheit berücksichtigt werden (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2011).

Im Folgenden werden die einzelnen Ejakulatfraktionen genauer beschrieben:

Die erste Ejakulatfraktion, das Vorsekret, wird während der präkoitalen Phase ausgeschieden und stellt daher streng genommen keinen Bestandteil des eigentlichen Ejakulats dar. Das spermienfreie Vorsekret wird in den Bulbourethraldrüsen und den Urethradrüsen gebildet und weist eine wässrig - klare Beschaffenheit auf. Es beinhaltet vor allem Mucine, Sialinsäure, Galaktose sowie einen hohen Natriumchloridgehalt (MANN, 1975, RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2011). Aufgrund der physiologischen Funktion des Vorsekrets, der Spülung der Urethra, sind auch zahlreiche Bakterien und Epithelzellen enthalten (AURICH, 2009).

Die darauffolgende Fraktion wird als „spermienreiche Fraktion“ bezeichnet, da sie über 75 % der Samenzellen enthält (TISCHNER et al., 1974, KOSINIAK, 1975). Sie beinhaltet auch Sekrete aus der Prostata und den Samenleiterampullen sowie 70 % des im Ejakulat vorhandenen Glycerylphosphorylcholins (GPC), welches überwiegend epididymalen Ursprungs ist (KOSINIAK, 1975, MANN, 1975, MAGISTRINI et al., 1995). Zudem weist die Fraktion den höchsten Gehalt an Ergothionein und Fruktose auf (KOSINIAK, 1975). Ergothionein ist eine stark reduzierende Substanz, die in den Ampullen der Samenleiter gebildet wird und die

Spermien vor einer Immobilisierung durch oxidierende Substrate schützt (MANN, 1975). Der Gehalt an Fruktose im Ejakulat ist verglichen mit anderen Spezies (z.B. Bulle, Eber, Schafbock, Mensch) sehr gering (MANN, 1975).

Die nächste Fraktion wird als „spermienarme Fraktion“ oder „Gelfraktion“ bezeichnet. Sie ist von gallertartiger Konsistenz und enthält Sekrete aus den Samenblasendrüsen. Die physiologische Funktion der Gelfraktion besteht in einem Verschluss des Zervikalkanals, um ein frühzeitiges Zurückfließen der Spermien aus dem Uterus zu verhindern (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al, 2011). Da diese Fraktion zu einer Koagulation des Ejakulats führen kann, wird sie bei der Samenentnahme routinemäßig entfernt. Die Samenblasendrüsen bilden den Großteil der im Ejakulat enthaltenen Zitronensäure, die Komplexe mit Calcium bildet und somit eine puffernde Funktion im SP ausübt (MANN, 1975, MAGISTRINI et al., 1975). Erfolgt eine chirurgische Entfernung der Samenblasendrüsen (Vesikulektomie), so ist die Gesamt- und Vorwärtsmotilität bei Tiefgefriersamen nach dem Auftauen höher als bei Hengsten, deren Samenblasendrüsen nicht entfernt wurden (WEBB et al., 1990).

Beim Abstieg des Hengstes vom Paarungspartner tropfen noch einige Milliliter Ejakulat aus der Harnröhre ab, die von MANN (1975) als „tail-end sample“ bezeichnet werden. Diese Fraktion ist von wässriger Konsistenz und enthält nur noch vereinzelte Spermien.

## **2.2 Biochemische Zusammensetzung des Seminalplasmas**

Das SP stellt den azellulären Teil des Ejakulats dar und wird im Hoden, in den Nebenhoden und in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen gebildet. Mit etwa 90 % trägt es zu einem Großteil des gewonnenen Ejakulats beim Hengst bei. Das SP dient nicht nur als Transportmittel und Energiequelle für die Spermien (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2011), seine zahlreichen Komponenten üben eine Reihe weiterer Funktionen aus, die im Folgenden genauer erläutert werden.

### **2.2.1 Proteine**

Proteine stellen einen Hauptbestandteil des SP dar mit multiplen Effekten auf die Spermienfunktion und den weiblichen Genitaltrakt (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Sie weisen ein niedriges Molekulargewicht von 12 - 30 kDa auf und kommen in der Regel als Multi-Protein Aggregate vor (NESSAU, 1994, CABALLERO et al., 2012). Zu den Aufgaben der Proteine gehören unter anderem die Regulation der Kapazitation (MANJUNATH und THERIEN, 2002),

die Etablierung eines Spermienreservoirs im Eileiter (TÖPFER-PETERSEN, 1999), die Modulation der uterinen Immunantwort (ALGHAMDI et al., 2004), der Spermientransport im weiblichen Genitaltrakt und die Interaktion der Gameten und deren Fusion (TÖPFER-PETERSEN, 1999).

Die SP-Proteine werden aus den Nebenhoden und den akzessorischen Geschlechtsdrüsen sezerniert. Während der Passage im männlichen und weiblichen Reproduktionstrakt heften sie sich mit Ausnahme von „Horse Seminal Protein-4“ (HSP-4) an die Oberfläche der Spermien (METZ et al., 1990, NESSAU, 1994). Die Adsorption der Proteine an die Plasmamembran der Spermien bewahrt die Stabilität der Spermienmembran und verhindert dadurch eine prämatüre Kapazitation (MUINO-BLANCO et al., 2008). Eine frühzeitige Kapazitation hätte nachteilige Effekte auf die Befruchtungsfähigkeit, da kapazitierte Spermien nur eine kurze Überlebensdauer aufweisen und wesentlich fragiler sind als nicht kapazitierte Formen (SCHEMBRI et al., 2002). Im Regelfall werden daher erst im weiblichen Genitaltrakt die inhibitorisch wirkenden Proteine (Dekapazitationsfaktoren) von der Oberfläche entfernt, so dass die Kapazitation möglich wird (FRASER, 1984). Diese wiederum ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Bindung an die Eizelle und geht unter anderem mit einer Änderung des Cholesterol-Phospholipidverhältnisses, einer Reorganisation der Membranproteine und einer Hyperaktivierung der Spermien einher (WITTE und SCHÄFER-SOMI, 2007).

Kapazitations-ähnliche Veränderungen können auch im Rahmen der Kryokonservierung beobachtet werden und stellen eine mögliche Ursache für die reduzierte Fruchtbarkeit und Vitalität von Tiefgefriersperma dar (WATSON, 1995). Durch den Kälteschock beim Einfriervorgang kann es zu einem Verlust von Phospholipiden und zu morphologischen Defekten in der Plasma- und Akrosommembran kommen (DARIN-BENNETT et al., 1973). Diese Kälteschäden können durch die Anwesenheit von SP-Proteinen verhindert bzw. repariert werden (BARRIOS et al., 2000).

Ursprünglich wurden die Proteine im SP des Hengstes als „Horse Seminal Proteins 1 - 8“ (HSP 1 - 8) klassifiziert. In den letzten Jahren hat sich beim Hengst jedoch immer mehr eine Einteilung in die folgenden 3 Hauptproteingruppen durchgesetzt:

- Fn-2 type proteins (Fibronectin-2 enthaltende Proteine)
- CRISP (cysteine-rich secretory proteins, cysteinreiche sekretorische Proteine) und
- Spermadhesine.

Fibronectin-2 enthaltende Proteine wurden erstmals im bovinen SP identifiziert und dort als BSP-Proteine (bovine seminal-plasma proteins) bezeichnet (MANJUNATH und SAIRAM, 1987). Die Proteinfamilie ist gekennzeichnet durch ein niedriges Molekulargewicht und zwei hintereinander angeordnete Fibronectin-2-Domänen (MANJUNATH et al., 2007). Proteine, die homolog zu den BSP-Proteinen sind, wurden beim Hengst, Ziegenbock, Bison, Schafbock und in niedrigen Mengen auch beim Eber nachgewiesen. Dies deutet auf ein ubiquitäres Vorkommen dieser Proteinfamilie bei Säugern hin (MANJUNATH et al., 2007). Der hohe Konservierungsgrad zwischen den einzelnen Spezies lässt vermuten, dass es sich um eine Proteinfamilie mit einer essentiellen Rolle bei der Reproduktion handelt (CABALLERO et al., 2012). Beim Hengst wurden bisher 3 SP-Proteine identifiziert, die Fn-2-Domänen enthalten: horse seminal plasma protein 1 (HSP-1), horse seminal plasma protein 2 (HSP-2) und EQ-12. HSP-1 und HSP-2 werden überwiegend in den Samenleiterampullen gebildet, während EQ-12 aus den Nebenhoden sezerniert wird (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005). HSP-1 und HSP-2 machen 70 - 80 % der Proteinmenge im equinen SP aus (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2011). Fibronectin-2 enthaltende Proteine schützen die Spermien vor einer frühzeitigen Kapazitation durch Bindung an deren Phospholipidmembran. Erst im weiblichen Genitaltrakt wird die Kapazitation möglich aufgrund von den dort in großer Menge vorkommenden High-Density Lipoproteins (HDLs) und Glykosaminoglykanen, die die Proteine aus der Membran wieder entfernen (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005, MANJUNATH et al., 2007).

CRISP weisen 16 Cysteinreste auf, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (REINEKE et al., 1999). Das SP enthält ca. 2,5 mg/ml CRISP-Proteine, die 5 - 7 % des Gesamt-Proteingehalts im SP ausmachen (REINEKE et al., 1999). Bisher sind 3 CRISP-Gene (CRISP-1, CRISP-2, CRISP-3) identifiziert, die bei Menschen, Mäusen, Ratten, Schweinen und Pferden nachgewiesen wurden (EBERSPAECHER et al., 1995, KRÄTZSCHMAR et al., 1996, SCHAMBONY et al., 1998b, VADNAIS et al., 2008). CRISP-1 wird vor allem im Nebenhoden gebildet (KRÄTZSCHMAR et al., 1996). Es verhindert eine frühzeitige Kapazitation und spielt eine Rolle bei der Spermien-Oozyten-Fusion (COHEN et al., 2000, ROBERTS et al., 2006). CRISP-2 wird im Hoden gebildet (KRÄTZSCHMAR et al., 1996) und erleichtert vermutlich die Zell-Zell-Interaktionen zwischen Spermatozyten und Sertoli-Zellen (MAEDA et al., 1999). CRISP-3 (früher als HSP-3 bezeichnet) wird aus der Samenleiterampulle und der Samenblasendrüse sezerniert, aber kommt auch in anderen Geweben, z.B. in Speicheldrüsen und Immunzellen vor (SCHAMBONY et al., 1998a). Diese Verteilung lässt die Annahme zu, dass CRISP-3 eine Rolle bei der angeborenen Immunabwehr spielt (UDBY et al., 2002). DOTY

et al. (2011) bestätigten dies durch die Erkenntnis, dass CRISP-3 die Bindung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) an die Spermien unterdrückt und dadurch an der Regulation der Spermienelimination im weiblichen Genitaltrakt beteiligt ist. Im Gegensatz zu anderen Spezies bilden Hengste sehr große Mengen CRISP-3 im Genitaltrakt, was auf eine zusätzliche besondere Rolle von CRISP-3 beim Pferd hindeuten könnte, die bei anderen Spezies nicht anzutreffen ist (SCHAMBONY et al., 1998a). Alle CRISP binden fest an die Spermienoberfläche im Bereich des Postakrosoms und am Mittelstück des Schwanzes. Dabei korreliert die Anzahl der an der Spermienoberfläche gebundenen CRISP-Moleküle mit der Fertilität eines Hengstes (REINEKE et al., 1999, NOVAK et al., 2010). Eine Dichte von > 18.000 CRISP-Molekülen/Spermatozoon korreliert mit einer guten Befruchtungsfähigkeit (REINEKE et al., 1999). Bei subfertilen Hengsten kommt CRISP-3 in bis zu 10-fach niedrigerer Konzentration vor als bei Hengsten mit guter Fertilität (SCHAMBONY et al., 1997). Jedoch scheint nicht nur die Konzentration an CRISP-Molekülen für die Fertilität eine Rolle zu spielen, sondern auch die Ausprägung der CRISP-Gene. So weisen Hengste, die für ein bestimmtes CRISP-Gen (CRISP-3 AJ459965:c+622G>A) homozygot sind eine höhere Fertilität auf als Hengste, die bei diesem Gen eine heterozygote Ausprägung zeigen. In Zukunft könnte das CRISP-Gen daher als Biomarker für die Spermienqualität herangezogen werden (HAMANN et al., 2007).

Andere Proteine im SP korrelieren hingegen negativ mit der Fertilität. So kommen die 4 Proteine Kallikrein-1E2 (KLK2), Clusterin, HSP-1 und HSP-2 in besonders hohen Konzentrationen bei Hengsten mit niedriger Fruchtbarkeit vor (NOVAK et al., 2010). Unter anderem aus diesem Grund wird von hohen Konzentrationen an SP und somit einem hohen Gehalt an SP-Proteinen, die negativ mit der Fertilität korrelieren, in der Besamungsportion abgeraten (NOVAK et al., 2010).

Spermadhesine sind Glykoproteine mit einem niedrigen Molekulargewicht von 12 - 16 kDa (CABALLERO et al., 2012). Sie wurden bisher nur bei Huftieren (Eber, Bulle, Schafbock, Ziegenbock, Hengst) nachgewiesen (CALVETE und SANZ, 2007, MELO et al., 2008). Während bei anderen Spezies, insbesondere beim Eber, eine Großzahl an Spermadhesinen vorkommt, so ist beim Pferd nur ein Spermadhesin (HSP-7) mit einem Molekulargewicht von 14 kDa bekannt (REINERT et al., 1996, CALVETE und SANZ, 2007). Spermadhesine sind in der Lage eine Vielzahl von Liganden zu binden (z.B. Kohlehydrate, Glykosaminoglykane, Phospholipide, Protease-Inhibitoren). Während des Spermientransportes im Nebenhoden binden sie an die Oberfläche der Spermien durch Interaktion mit den Phospholipiden der



Plasmamembran. So bilden sie einen protektiven Schutzmantel um die sensible Akrosomregion des Spermienkopfes, der eine vorzeitige Akrosomreaktion verhindert (TÖPFER-PETERSEN et al., 1998). Darüber hinaus fungiert HSP-7 als primärer Rezeptor für die Bindung an die Zona pellucida und ermöglicht somit eine erste Kontaktaufnahme zwischen Spermium und Eizelle (REINERT et al., 1996, TÖPFER-PETERSEN et al., 1998).

## 2.2.2 Enzyme

Im SP des Hengstes kommt eine Vielzahl an Enzymen vor, deren physiologische Funktion jedoch oftmals noch nicht bekannt ist. Einen Überblick über das mengenmäßige Vorkommen einiger Enzyme gibt Tabelle 1.

*Tabelle 1: Median-, Minimum- und Maximumwerte von Enzymaktivitäten (IU/l), erstes und drittes Quartil in eckigen Klammern [Q1/Q3], entnommen aus PESCH et al. (2006)*

Enzym	Median [Q1/Q3]	Minimum	Maximum
AST (IU/l)	80,0 [62,8/119,8]	26,0	400,0
LDH (IU/l)	81,0 [27,0/167,0]	3,0	1450,0
AP (IU/l)	30200,0 [22700,0/39125,0]	344,0	62900,0
AcP (IU/l)	20,0 [13,2/28,8]	2,0	92,0
GGT (IU/l)	7500,0 [6025,0/10325,0]	1300,0	19000,0

### 2.2.2.1 Aspartat-Aminotransferase (AST)

Die AST ist im Mittelstück des Spermiums lokalisiert (COLENBRANDER et al., 1992). Es wird ein Zusammenhang zwischen der Unbeweglichkeit von Spermien und ihrem AST-Gehalt vermutet. Denn bei Defekten in der Membran und damit einhergehendem Verlust von AST ins SP kann keine ATP-Produktion in den Spermien stattfinden, sodass es folglich zur Immotilität kommt (COLENBRANDER et al., 1992). Die AST-Konzentration korreliert negativ mit dem Samenvolumen und positiv mit der Spermienkonzentration, so dass ein testikulärer oder

epididymaler Ursprung angenommen werden kann (PESCH et al., 2006). BITTMAR und KOSINIAK (1992) wiesen auch einen Zusammenhang zwischen der AST-Konzentration und der Tiefgefrierbarkeit von Hengstsamen nach.

#### **2.2.2.2 Laktat-Dehydrogenase (LDH)**

Die LDH weist eine starke Korrelation mit der Gesamtmotilität, der Vorwärtsmotilität, dem Lebend- Tod- Verhältnis und der Pathomorphologie der Spermien auf. Daher wird dem Enzym eine wichtige Rolle im Rahmen der Spermienfunktion und des Spermienmetabolismus zugeschrieben. LDH scheint somit ein geeigneter Marker zur Beurteilung der Spermienqualität zu sein (PESCH et al., 2006).

#### **2.2.2.3 Alkalische Phosphatase (AP)**

Die höchste Aktivität der AP wurde von TURNER und MCDONELL (2003) in den Hoden und Nebenhoden nachgewiesen. Daher schlugen sie die AP als einen spermienunabhängigen Marker für die Ejakulation vor, der es ermöglicht eine testikuläre Azoospermie von Störungen der Ejakulation abzugrenzen. PESCH et al. (2006) bestätigten den testikulären und epididymalen Ursprung durch den Nachweis einer negativen Korrelation zwischen AP und dem Samenvolumen sowie einer positiven Korrelation zwischen AP und der Spermienkonzentration.

#### **2.2.2.4 Saure Phosphatase (acP, acid phosphatase)**

Die Bildung der acP erfolgt vermutlich in den Hoden und Nebenhoden, da das Enzym negativ mit dem Samenvolumen und positiv mit der Spermienkonzentration korreliert (PESCH et al., 2006, KARESKOSKI et al., 2010). Beim Rüden kann die acP als Indikator für die Funktion der Prostata genutzt werden (JAMES et al., 1979), was beim Hengst aufgrund des anderen Ursprungsortes jedoch nicht möglich ist.

#### **2.2.2.5 $\gamma$ -Glutamyltransferase (GGT)**

Die Herkunft der GGT ist speziesspezifisch. Es ist anzunehmen, dass GGT beim Hengst aus den Hoden und Nebenhoden stammt, da es negativ mit dem Samenvolumen und positiv mit der

Spermienkonzentration korreliert (PESCH et al., 2006). GGT spielt eine wichtige Rolle beim Schutz der Spermien vor oxidativem Stress (HINTON et al., 1998). Deshalb lässt sich auch eine Korrelation zwischen GGT und der Spermienmotilität feststellen (PESCH et al., 2006).

#### **2.2.2.6 Glykosidasen**

Glykosidasen, wie z.B.  $\beta$ -Galaktosidase,  $\beta$ -Glukuronidase, N-acetyl- $\beta$ -D-Glukosaminidase (NAG) binden beim Mann an die Oberfläche des Spermienkopfes während des Transportes in den Nebenhoden. Die NAG ist an der Akrosomreaktion beim Mann beteiligt (BRANDELLI et al., 1994), während die  $\beta$ -Glukuronidase für die Durchdringung des Cumulus oophorus von Bedeutung ist (TULSIANI et al., 1998). Die Glykosidasen spielen beim Mann somit eine wichtige Rolle bei der Spermienreifung und der Fertilisation, dennoch wirkt sich eine Überexpression dieser Glykosidasen-Gene negativ auf die Fruchtbarkeit aus. So sind viele Glykosidasen bei infertilen Männern deutlich erhöht (CORRALES et al., 2000, CORRALES et al., 2002). Ob es auch beim Hengst einen Zusammenhang zwischen dem Glykosidase-Gehalt und der Fruchtbarkeit gibt, ist bisher nicht bekannt.

In den Sekreten des Nebenhodens wurde beim Hengst eine  $\alpha$ -Glukosidase nachgewiesen, die in zwei katalytisch aktiven Formen vorkommt: die „saure“ Form I dominiert im Nebenhodenschwanz, während die „neutrale“ Form II überwiegend im Nebenhodenkopf vorkommt. Bei einem physiologischen pH-Wert im SP dominiert die Form II. Der  $\alpha$ -Glukosidase wird eine Rolle beim Remodelling der Plasma-Membran im Rahmen der Spermienreifung zugeschrieben (DIAS et al., 2004).

#### **2.2.2.7 Lipase**

Die bisher unbeantwortete Frage nach den schädlichen Bestandteilen im SP während der Spermienlagerung war Anlass zu einer Untersuchung der Lipase im equinen SP. Da bei Ziegen eine Lipase im SP bekannt ist, die sich nachteilig auf die Spermienmotilität auswirkt, führten CARVER und BALL (2002) eine Studie durch, in der sie die Wirkung der porcinen Pankreaslipase auf gekühlten Pferdesamen untersuchten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Lipase die Gesamt- und Vorwärtsmotilität der Spermien in einer dosisabhängigen Weise senkt und daher eine mögliche Ursache für die nachteiligen Effekte des SP auf die Spermien darstellt.

### **2.2.2.8 Carboanhydrase (CA)**

Die CA ist an der Regulation des pH-Wertes im SP beteiligt durch die Umwandlung von Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ) in Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) und Protonen ( $\text{H}^+$ ). Im equinen SP kommen drei Formen der Carboanhydrase (CA-I, CA-II, CA-III) vor. Sie stammen vorwiegend aus den Samenblasendrüsen, der Prostata und den Bulbourethraldrüsen. CA-III konnte auch in den Sertolizellen und Basalzellen des Ductus deferens nachgewiesen werden (ASARI et al., 1996).

### **2.2.2.9 PAF-Acetylhydrolase**

Die PAF-Acetylhydrolase im SP führt zu einer Inaktivierung des Plättchenaktivierenden Faktors (PAF). Der PAF kann die Motilität der Spermien beim Menschen steigern, so dass eine Beteiligung an Kapazitationsprozessen bzw. der Hyperaktivierung vermutet wird. Die PAF-Acetylhydrolase kann ein frühzeitiges Ablaufen dieser Vorgänge verhindern (HOUGH und PARKS, 1994).

Eine weitere Funktion des Enzyms ist die Reduktion von oxidativen Schäden durch neutrophile Granulozyten im weiblichen Genitaltrakt. Der PAF führt zu einer Aktivierung von PMN, so dass eine Entzündungsreaktion mit der Bildung von freien Radikalen ausgelöst wird. Die Folgen sind ausgedehnte Zellschäden, die mit einer Immotilität der Samenzellen einhergehen können. Die PAF-Acetylhydrolase ist in der Lage die entzündliche Reaktion während des Spermientransportes zum Eileiter zu vermindern (HOUGH und PARKS, 1994).

### 2.2.3 Elektrolyte

Die Ionenzusammensetzung des SP übt einen großen Einfluss auf die Funktion der Spermien aus und korreliert mit konventionellen Samenparametern (PESCH et al., 2006). Wie Tabelle 2 zeigt, tritt eine große Varianz zwischen den Minimum- und Maximumwerten der einzelnen Mengen- und Spurenelementen auf.

*Tabelle 2: Median-, Minimum- und Maximumwerte der Mengen- und Spurenelemente, erstes und drittes Quartil in eckigen Klammern [Q1/Q3], entnommen aus PESCH et al. (2006)*

Elektrolyte	Median [Q1/Q3]	Minimum	Maximum
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	110,5 [99,8/118,3]	69,0	126,0
K <sup>+</sup> (mmol/l)	22,1 [19,9/25,7]	2,1	53,0
Ca <sub>TOTAL</sub> (mmol/l)	2,9 [1,4/3,8]	0,66	14,4
Ca <sup>2+</sup> (mmol/l)	1,7 [1,1/2,6]	0,5	8,9
Mg <sup>2+</sup> (mmol/l)	3,1 [1,7/3,9]	0,5	4,2
P (mmol/l)	1,1 [0,9/1,7]	0,4	59
Cl (mmol/l)	114,5 [108,0/119,0]	84,0	129,0
Cu (µmol/l)	17,8 [11,3/25,6]	2,0	54,4
Fe (µmol/l)	1,9 [0,9/3,4]	0	34,6
Zn (µmol/l)	13,2 [10,1/16,9]	2,1	27,2

#### 2.2.3.1 Mengenelemente

Die Mengenelemente **Natrium** und **Kalium** sind für die Aufrechterhaltung eines osmotischen Gleichgewichts im SP essentiell (ASADPOUR, 2012). Dabei ist die SP-Konzentration von Natrium stets höher als die von Kalium. Jedoch ist die Natrium-Konzentration im SP niedriger als die Konzentration in der Samenzelle, so dass ein aktiver Transportmechanismus bestehen muss (PESCH, 2005). PESCH et al. (2006) ermittelten einen Medianwert für Natrium von

110,5 mmol/l, der somit ungefähr der Blutkonzentration entspricht. Die Kaliumkonzentration im SP liegt mit einem Median von 22,1 mmol/l deutlich oberhalb der Blutkonzentration (PESCH et al., 2006). Die Kaliumkonzentration wird häufig mit der Spermienmotilität in Zusammenhang gebracht. So wurde bei anderen Spezies ein hemmender Effekt von Kalium auf die Motilität beobachtet (BURKMAN et al., 1984, ABDEHL-RAHMAN et al., 2000). Beim Menschen wurde bisher kein Zusammenhang festgestellt (ROSSATO et al., 2002), während beim Pferd das Hinzufügen von Kalium zum Verdünner sogar einen positiven Effekt auf die Motilität ausübt (PADILLA und FOOTE, 1991).

Die **Chlorid**konzentration im SP ähnelt mit einem Median von 114,5 mmol/l stark der von Natrium. Dies ist darin begründet, dass beide Elemente stets gemeinsam auftreten. Nach bisherigem Kenntnisstand gibt es keinen Zusammenhang zwischen der Chloridkonzentration und der Fertilität (PESCH, 2005).

**Calcium** und andere divalente Kationen (z.B. Magnesium, Zink) liegen im SP in hohen Konzentrationen vor. Dies lässt einen aktiven Transportmechanismus aus dem Blut vermuten. Die Konzentration von Gesamtcalcium und ionisiertem Calcium korrelieren positiv mit dem Ejakulatvolumen (PESCH, 2005). Beim Hengst liegen 60 - 75 % des Calciums in ionisierter Form vor (PESCH et al., 2006), während beim Mensch nur 2 - 4 % des Gesamtcalciums ionisiert sind (ARVER und SJÖBERG, 1983). Calcium ist in viele Vorgänge im weiblichen und männlichen Genitaltrakt involviert. Unter anderem ist es an der Spermienkapazitation und Hyperaktivierung sowie an der Akrosomreaktion beteiligt (BAKER et al. 2004, MARQUEZ und SUAREZ, 2004). Erhöhte Calcium-Konzentrationen können auch zu spontanen Akrosomreaktionen beim Hengst führen (PESCH, 2005).

Die **Magnesium**konzentration liegt im SP im Median bei 3,1 mmol/l. Die Konzentration steigt von April/Mai bis November/Dezember an (PESCH, 2005). Bei einer Untersuchung von BARRIER-BATTUT et al. (2002) konnte kein Zusammenhang zwischen der Tiefgefrierbarkeit von Hengstpermien und der Magnesiumkonzentration im SP festgestellt werden.

Die Konzentration an anorganischem **Phosphat** liegt im Median bei 1,1 mmol/l und korreliert mit dem pH-Wert, der Dichte und der Gesamtspermienzahl (PESCH, 2005).

### 2.2.3.2 Spurenelemente

**Kupfer** ist Bestandteil vieler Enzyme im SP. Unter anderem ist es in der Cu-Zn-Superoxid-Dismutase (SOD) enthalten, die einen wichtigen Zellschutz gegenüber freien Radikalen darstellt. Auch die Cytochrom C-Oxidase, die eine Rolle bei der Energiebereitstellung spielt, enthält Kupfer. Der Kupfergehalt korreliert mit dem Anteil der lebenden Spermien und dem Samenvolumen (PESCH, 2005). Erhöhte Kupfer-Konzentrationen führen zu einer Reduktion oxidativer Prozesse und der Glykolyse, so dass es folglich zur Immotilität der Spermien kommen kann (PESCH et al., 2006). BARRIER-BATTUT et al. (2002) untersuchten den Zusammenhang zwischen der Tiefgefrierbarkeit von Hengststamen und der Kupferionen-Konzentration, sie konnten jedoch keine Korrelation feststellen.

**Eisen** liegt im SP in der Regel gebunden in Form von Transferrin, Haptoglobin und Laktoferrin vor. Die Bindung an Proteine führt dazu, dass sich das Eisen in einer katalytisch inaktiven Form befindet und dadurch übermäßige oxidative Prozesse vermieden werden (PESCH et al., 2006). Die Eisen-Konzentration korreliert mit dem Samenvolumen und der Spermienkonzentration (PESCH et al., 2006).

**Zink** ist an der Spermienreifung beteiligt und verhindert, sofern es in einer physiologischen Konzentration vorkommt, den Calciumeinstrom in die Spermienzelle und dadurch eine frühzeitige Induktion von Kapazitation und Akrosomreaktion (PESCH et al., 2006). Beim Mensch sind erhöhte Zinkkonzentrationen im SP mit einer niedrigeren Vorwärtsmotilität der Spermien assoziiert (SORENSEN et al., 1999). Die Zink-Konzentration korreliert mit dem Samenvolumen und der Spermienkonzentration (PESCH et al., 2006).

**Selen** ist ein Spurenelement, das essentiell für eine gute Spermienqualität und Fertilität beim Hengst ist. Die Selenkonzentration im SP und in den Spermien korreliert nicht mit den Blutwerten oder der diätetischen Versorgung, so dass zur Fertilitätsbestimmung immer eine Messung der Selenkonzentration in den Spermien anstelle einer Blutuntersuchung vorgenommen werden sollte. Die Selenmenge in den Spermien korreliert mit dem Anteil der Spermien mit intakter Membran, der Vorwärtsmotilität und der Trächtigkeitsrate (BERTELSMANN et al., 2010).

### 2.2.4 Hormone

Das SP des Hengstes ist reich an unterschiedlichen Hormonen (Tabelle 3). Dabei weisen die Hormongehalte eine große Variabilität zwischen den einzelnen Hengsten auf (CLAUS et al., 1992).

*Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hormonkonzentrationen im SP bzw. Samen des Hengstes*

Hormon	Hormonkonzentration	Autor
Gesamt-Östrogene	4447 pg/ml (im SP)	CLAUS et al., 1992
– Östron	257,1 ± 267,0 pg/ml (im Samen) 117,7 ± 1,53 pg/ml (im SP)	CLAUS et al., 1992 HOFFMANN et al., 1999
– Östradiol-17β	73,4 ± 87,4 pg/ml (im Samen) 24,2 ± 1,42 pg/ml (im SP)	CLAUS et al., 1992 HOFFMANN et al., 1999
– Östronsulfat	4116 ± 7193,4 pg/ml (im SP) 2,92 ± 1,42 ng/ml (im SP)	CLAUS et al., 1992 HOFFMANN et al., 1999
Testosteron	23,1 ± 1,68 pg/ml (im SP)	HOFFMANN et al., 1999
Androstendion	17,9 ± 1,39 pg/ml (im SP)	HOFFMANN et al., 1999
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	12,4 ± 1,51 pg/ml (im SP)	HOFFMANN et al., 1999
5α-Dihydrotestosteron	9,7 ± 1,29 pg/ml (im SP)	HOFFMANN et al., 1999
Prostaglandin E2	43,73 ± 4,93 ng/ml (im SP)	BIELANSKI et al., 1982
Prostaglandin F2α	14,5 ± 18,8 ng/ml (im Samen)	CLAUS et al., 1992
Oxytocin	≈ 4 pg/ml (im SP)	WATSON et al., 1999



Die Hormone zeigen saisonale Schwankungen in ihrem seminalen Gehalt mit charakteristischen Peaks (HOFFMANN und LANDECK, 1999, LEMAZURIER et al., 2002). Im Winter zeigen die Hengste ein androgenes Profil mit hohen Androstendion-Konzentrationen. In der Zuchtsaison hingegen dominieren die Östrogene, die dann in 20 - 200 x höherer Konzentration vorliegen als die Androgene. Diese Hormonverschiebungen sind auf die unterschiedliche Aktivität der in den Leydig-Zellen lokalisierten Aromatase zurückzuführen. Die Aromatase ist für die irreversible Umwandlung von Androgenen in Östrogene verantwortlich und weist die höchste Aktivität von April – Juni auf. Die equine Aromatase wird daher auch als Marker für die endokrine testikuläre Funktion vorgeschlagen (LEMAZURIER et al., 2002).

Im Vergleich zu den meisten anderen untersuchten Spezies weist der Hengst relativ hohe Östrogenkonzentrationen im SP auf. Dabei tendiert der Gesamtöstrogengehalt im SP zu höheren Werten als im Blut (CLAUS et al., 1992). Der größte Teil des Östrogens liegt in Form von Östronsulfat vor (CLAUS et al., 1992, RAESIDE und CHRISTIE, 1997). Die Synthese der Östrogene erfolgt in den Leydig-Zellen des Hodens (ALMADHIDI et al., 1995). Daher ist der Östrogengehalt in der gelfreien Fraktion höher als in der Gelfraktion (LEMAZURIER et al., 2002). Ähnlich wie beim Eber sind wahrscheinlich auch beim Hengst die Östrogene teilweise an die Spermatozoen assoziiert (RAESIDE und CHRISTIE, 1997). Die physiologische Funktion der Östrogene im SP ist beim Hengst nicht genau bekannt, jedoch wird ein ähnlicher Effekt wie beim Schwein vermutet. Der Eber weist neben dem Hengst ebenfalls hohe Östrogenkonzentrationen aufgrund des hohen Ejakulatvolumens auf. Die Östrogene können hier die uterinen Kontraktionen verstärken und einen Einfluss auf den Ovulationszeitpunkt ausüben, indem sie die Freisetzung von Prostaglandin F<sub>2α</sub> aus dem Endometrium fördern (CLAUS et al., 1990).

Oxytocin kommt in allen Fraktionen des Hengstejakulats vor. Dabei ist der Gehalt in der Gelfraktion am höchsten, was die Vermutung nahe legt, dass die Bildung in den Samenblasendrüsen erfolgt. Die funktionelle Bedeutung der hohen Oxytocin-Konzentration in der Gelfraktion bleibt jedoch laut WATSON et al. (1999) unklar, da die Gelfraktion erst am Ende der Ejakulation abgegeben wird und zum Großteil in Vagina und Zervix verbleibt ohne den Uterus zu erreichen. Vermutlich spielt Oxytocin daher eher eine Rolle beim Spermientransport im männlichen Genitaltrakt durch Kontraktion der samenleitenden Wege (WATSON et al., 1999).

### **2.2.5 Saisonaler Einfluss auf die Zusammensetzung des Seminalplasmas**

Das Pferd zählt zu den saisonal fortpflanzungsaktiven Spezies, bei dem mit zunehmender Tageslänge im Frühjahr die Reproduktionssaktivität ansteigt (long-day breeder). Dabei ist nicht nur der Zyklus der Stute, sondern auch das Sexualverhalten und die Spermaqualität des Hengstes durch die Jahreszeiten beeinflusst. Außerhalb der Zuchtsaison kommt es beim Hengst zu physiologischen Veränderungen, die unter anderem mit einer Abnahme der Hodengröße und einem sinkenden Testosteron-Gehalt einhergehen (JOHNSON und THOMPSON, 1987). Auch die Zusammensetzung des Ejakulats unterliegt saisonalen Schwankungen (PICKETT et al., 1970). So sind in den Wintermonaten das Ejakulatvolumen und die Gesamtspermienzahl niedriger als während der Zuchtsaison (PICKETT et al., 1970, WRENCH et al., 2010). Die Motilität der Spermien ist während der Sommermonate am niedrigsten (PICKETT et al., 1970, JANETT et al., 2003). Im Frühjahr weist die Spermienkonzentration ihr Minimum auf, während im Herbst die wenigsten Spermiendefekte zu finden sind (JANETT et al., 2003).

Die Zusammensetzung des SP ist ebenfalls saisonabhängig und durch schwankende Sexualhormonspiegel beeinflusst (HOFFMANN und LANDECK, 1999). GEBAUER et al. (1976) stellten im SP jahreszeitliche Veränderungen im Protein-, Glycerolphosphorylcholin-, Kohlenhydrat-, Trockenmasse-, Gesamtstickstoff- und Milchsäuregehalt fest. Nach GEBAUER et al. (1976) ist der saisonale Einfluss auf die Zusammensetzung des SP stärker als der Einfluss auf die Spermien, da die Sekretion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen stärker saisonal beeinflusst wird als die Spermienbildung. Auch ABOU-AHMED et al. (1993) stellten bei der Bestimmung von Glycerolphosphorylcholin, Ergothionein, Fructose, Zitronensäure, Totalprotein und dem Kohlenhydratgehalt saisonale Unterschiede fest mit jeweils den niedrigsten Konzentrationen im Sommer.

## **2.3 Methoden zur Reduktion des Seminalplasma-Anteils**

Das SP enthält sowohl protektive Bestandteile, welche die Vitalität der Spermien fördern, aber auch Komponenten, die während des Samenversandes einen schädlichen Einfluss ausüben. Hohe Konzentrationen an SP haben sich während einer Lagerung bei 5 °C in der Regel als nachteilig für die Spermienqualität erwiesen (PICKETT et al., 1975, PRUITT et al., 1993). Um den SP-Anteil in der Besamungsportion zu reduzieren, steht eine Reihe unterschiedlicher Methoden zur Verfügung.

### **2.3.1 Verdünnung des Samens**

Ein einfaches und häufig praktiziertes Verfahren ist das langsame Hinzugeben eines geeigneten Frischsamenverdünners. Durch die Verdünnung werden zum einen mögliche vitalitätshemmende Einflüsse des SP reduziert, zum anderen werden die Spermien durch den Verdünner mit wichtigen Nähr- und Schutzsubstanzen versorgt (WEITZE, 2001). Empfohlen werden Verdünnungen auf 25 Mio. Spermien/ml (VARNER et al., 1987, JASKO et al., 1992a) oder 50 Mio. Spermien/ml (COCHRAN et al., 1984). Neben der Spermienkonzentration ist bei der Samenaufbereitung auch die Volumenrelation (Samen zu Verdünner) von Bedeutung. Es sollte ein Verhältnis von mindestens 1 Teil Ejakulat + 2 Teile Verdünner angestrebt werden (JASKO et al., 1991).

### **2.3.2 Zentrifugation**

Die Zentrifugation des Ejakulats mit der anschließenden Entfernung des Überstandes stellt neben der Verdünnung die gebräuchlichste Methode zur Reduktion des SP-Anteils dar. Im Rahmen der Kryokonservierung ist die Zentrifugation ein unverzichtbarer Prozess, um eine gute Motilität nach dem Auftauen zu erhalten und das Besamungsvolumen zu verringern. Bei der Kühlkonservierung sollte individuell abgewogen werden, ob eine Zentrifugation sinnvoll erscheint. Ist die Spermienkonzentration niedrig, so ist eine Zentrifugation zur Verdichtung des Samens empfehlenswert, um eine ausreichende Zahl progressiv beweglicher Spermien in der Besamungsportion zu gewährleisten (JASKO et al., 1992a). In diesen Fällen würde durch eine einfache Verdünnung ein sehr großes Besamungsvolumen entstehen, das möglicherweise zu einer reduzierten Fertilität führen kann (PICKETT und SHINER., 1994). Bei Hengsten, die nach der Samengewinnung bereits eine hohe Konzentration aufweisen, sollte der Samen nur

zentrifugiert werden, wenn er dadurch nachweislich in seiner Haltbarkeit verbessert wird (SIEME, 2009).

Vor der Zentrifugation muss eine Vorverdünnung des Ejakulats mit einem Zentrifugationsverdünner stattfinden. Dies kann in Form einer 1 + 1 Verdünnung (1 Teil Ejakulat + 1 Teil Verdünner) oder durch eine Verdünnung auf 50 Mio. Spermien/ml geschehen (SIEME, 2009).

Bei der Durchführung der Zentrifugation ist auf die adäquate Einstellung der Zentrifugationskraft zu achten (PICKETT et al., 1975). Eine zu niedrige Zentrifugationskraft führt zu einem großen Spermienverlust beim Absaugen (HOOGEWIJS et al., 2010), während eine zu hohe Zentrifugationskraft die Membranintegrität der Spermien schädigt und folglich die Motilität mindert (PICKETT et al., 1975). In der Literatur sind verschiedene Empfehlungen für die optimale Zentrifugationskraft zu finden (Tabelle 4).

*Tabelle 4: Empfehlungen für die Zentrifugationskraft und -dauer zur Reduktion / Entfernung des SP-Anteils*

Zentrifugationskraft (g)	Zentrifugationsdauer (min)	Autor
400	15	COCHRAN et al. (1984)
400	12	BRINSKO et al. (2000)
600	10	WEISS et al. (2004)
1000	5	MARTIN et al. (1979)
1800 / 2400	5	HOOGEWIJS et al. (2010)

Als Standardmethode konnte sich die Zentrifugation bei Raumtemperatur mit einer Zentrifugationskraft von 400 - 600 g über 10 - 15 min etablieren. Nach der Zentrifugation wird der Großteil des Überstandes durch Aspiration oder Dekantierung entfernt. Ein kleiner Überstand sollte belassen werden, da die Entfernung des gesamten SP sich negativ auf die Spermienmotilität auswirkt (JASKO et al., 1992a). Bei der Entfernung des SP ist mit einem Spermienverlust von etwa 25 % zu rechnen (LOOMIS, 2006). Eine Methode, um die Spermienverluste durch eine höhere Zentrifugationskraft zu minimieren, ist die „cushion“-Technik (sog. Hochgeschwindigkeits-Kissen-zentrifugationstechnik). Hier wird ein Medium

mit einer hohen spezifischen Dichte (z.B. CushionFluid<sup>®</sup>, Optiprep<sup>®</sup>, EqcellSire-B<sup>®</sup>) unter den verdünnten Samen gegeben. Dies verhindert eine starke Verdichtung der Spermien am Boden des Zentrifugenröhrchens und somit eine Schädigung der Samenzellen. Eine Zentrifugationsstärke von 1000 g über 20 min ist durch diese Medien möglich, so dass die Spermienverluste im Überstand laut LOOMIS (2006) auf 10 % minimiert werden können. Eine neue Studie von LEN et al. (2013) rät hingegen von der Anwendung der „cushion“-Technik ab, da durch das Absaugen des Mediums nach der Zentrifugation auch ein erheblicher Teil der Spermien mitaspiriert wird. In der Studie war die Spermienrückgewinnungsrate sogar niedriger als bei Zentrifugation ohne „cushion“-Medium.

Nach Entfernung des Überstandes wird das Spermienpellet in einem geeigneten Frischsamenverdünner resuspendiert und kann wie in 2.3.1 beschrieben verdünnt werden (z.B. auf 25 Mio. Spermien/ml).

### **2.3.3 Fraktionierte Samengewinnung**

Eine weitere Möglichkeit den Anteil an SP in der Besamungsportion zu verringern stellt die „fraktionierte Samengewinnung“ mit offenen Scheidenmodellen oder automatisierten Phantomen dar. Hierbei werden nur die ersten 1 - 3 „Samenstrahlen“ für die Besamungsportion aufgefangen, also ausschließlich die spermienreiche Fraktion, die von Natur aus arm an SP ist. Jedoch ist zu beachten, dass bei dieser Methode die Spermiengesamtzahl verringert ist, da die spermienreiche Fraktion nur etwa 75 % aller Spermien aus dem Ejakulat enthält. VARNER et al. (1987) konnten bei Lagerung der Spermien in der spermienreichen Fraktion die Motilität über 24 und 48 h besser erhalten als bei Verwendung des Gesamtejakulats.

### **2.3.4 Spermienfilter**

Eine neuere Methode zur Entfernung des SP stellt der von BotuPharma entwickelte hydrophile Spermienfilter dar (Sperm Filter, BotuPharma, Sao Paulo, Brasilien). Durch eine Filterung des Ejakulats sind die Spermienverluste niedriger und die Motilität ebenso gut wie durch das Entfernen des SP durch Zentrifugation (RAMIRES NETO et al., 2013). Auch SIEME (2009) erzielte mit verschiedenen Filtrationsverfahren (Thomapore<sup>®</sup>, Xampler<sup>®</sup>) gute Erfolge in der Reduktion des SP-Anteils bei nur geringen Spermienverlusten. Jedoch sprechen Kosten und Arbeitsaufwand gegen eine Verwendung dieser Filter bei der routinemäßigen Samenaufbereitung.

## 2.4 Optimale Seminalplasma-Konzentration in der Besamungsportion

Bei der Aufbereitung des Samens stellt sich die Frage, wie groß der SP-Anteil in einer Besamungsportion sein sollte, um die Spermiovitalität während der Lagerung bestmöglich zu erhalten. In einigen Studien erwies sich die komplette Entfernung des SP als beste Methode zur Erhaltung der Motilität über 24 h (JASKO et al., 1991, PADILLA und FOOTE, 1991). KARESKOSKI et al. (2011) stellten zwar keinen Unterschied in der Motilität fest, jedoch war die DNA-Integrität besser, wenn das SP ganz entfernt wurde. Eine komplette Entfernung des SP scheint auch einen stabilisierenden Effekt auf die Plasmamembran der Spermien zu haben (BARRIER-BATTUT et al., 2013). Der Großteil der Studien kommt jedoch zu dem Schluss, dass ein geringer Anteil SP in der Besamungsportion verbleiben sollte. PICKETT et al. (1975) erachten eine Konzentration von 20 % SP als optimal, um die Motilität zu erhalten. JASKO et al. (1992a) erhielten die besten Motilitätsergebnisse nach 72 h gekühlter Lagerung bei einem Gehalt von 5 - 20 % SP. Eine Studie von BRAUN et al. (1994) kommt zu dem Ergebnis, dass für die gekühlte Lagerung in einem Magermilchverdünner eine Konzentration von 5 % SP dem kompletten Entfernen des SP und einer 25 %igen Konzentration vorzuziehen ist. Auch BRINSKO et al. (2000) erzielten durch Zentrifugation und Entfernung von ca. 90 % des SP die höchste Vorwärtsbeweglichkeit. Die Entfernung von einem Großteil des SP eignete sich besonders für Hengste, die sich durch eine einfache Verdünnung ohne Zentrifugation nur schlecht konservieren ließen („bad coolers“).

Inwiefern eine Zentrifugation mit Entfernung des SP sinnvoll ist, wird auch durch den verwendeten Samenverdünner beeinflusst. So kommen PADILLA und FOOTE (1991) zu dem Ergebnis, dass bei Verwendung eines Magermilch-Glukose-Verdünners (Kenney-Verdüner) die Spermienmotilität über 72 h am besten erhalten bleibt, wenn keine Zentrifugation stattfindet. Wird hingegen der Kenney-Verdüner modifiziert durch Zusatz eines kaliumhaltigen Tyrodes Medium (KMT), so ist die Spermienmotilität besser, wenn der Samen zentrifugiert und das SP vollständig entfernt wird (PADILLA und FOOTE, 1991).

Bei der Ermittlung einer optimalen SP-Konzentration ist ein weiterer Faktor, die Lagerungsdauer, zu berücksichtigen. Ein Versuch von PRUITT et al. (1993) zeigte, dass bei einer Lagerung über 48 h eine Entfernung des gesamten SP sinnvoll ist, um die Motilität bestmöglich zu erhalten. Bei einer kürzeren Lagerungsdauer von nur 24 h macht es hingegen keinen Unterschied, ob das ganze SP entfernt wird oder ob 20 % SP in der Besamungsportion verbleiben (PRUITT et al., 1993). MORRELL et al. (2010) untersuchten besonders robuste Spermien, die

mittels eines spermien-selektiven Aufbereitungsverfahrens („single layer centrifugation“) selektiert wurden. Hier war es von Vorteil schon bei einer Lagerungsdauer von 24 h das gesamte SP zu entfernen, während bei einer Lagerung über nur wenige Stunden ein geringer SP-Anteil von 5 % die Motilität am besten erhielt. Das SP scheint somit die Beweglichkeit insbesondere in den ersten Stunden zu steigern, so dass es von Vorteil sein kann, das SP erst kurz vor der Besamung hinzuzugeben (MORRELL et al., 2010).

Auch wenn letztlich keine genaue prozentuale SP-Konzentration angegeben werden kann, so erhalten die meisten Studien die besten Motilitätsergebnisse mit einem geringen SP-Anteil von 5 - 20 % (PICKETT et al., 1975, JASKO et al., 1992a, BRAUN et al., 1994, BRINSKO et al., 2000). Die relativ große Variabilität der Ergebnisse liegt sowohl an einer unterschiedlichen Zusammensetzung des SP der einzelnen Hengste als auch an einer meist geringen Zahl an Versuchstieren und unterschiedlichen Studiendesigns. So unterscheidet sich der Versuchsaufbau meist bezüglich der Samenentnahmetechnik, der Wahl des Verdünners, dem Verdünnungsverhältnis, dem Zentrifugations-Regime sowie der Lagerungstemperatur und -dauer.

Im Idealfall sollte daher bei jedem Hengst individuell untersucht werden, inwiefern eine Entfernung bzw. Reduktion des SP vor der Lagerung sinnvoll ist (BARRIER-BATTUT et al., 2013).

## **2.5 Einfluss des Seminalplasmas auf die „post-breeding Endometritis“**

Eine vorübergehende Endometritis der Stute als Reaktion auf eine Besamung ist ein physiologischer Vorgang mit dem Ziel, den Uterus von überschüssigen Spermien, SP und Kontaminanten zu reinigen (TROEDSSON, 1999). Die Säuberung des Uterus ist eine essentielle Voraussetzung für die erfolgreiche Implantation des Embryos (WATSON, 2000). Nach der Befruchtung bleibt der Embryo zunächst für 5 - 6 Tage im Eileiter, bevor er in die Gebärmutter absteigt (BETTERIDGE et al., 1982). Geht die Dauer der Endometritis über diesen Zeitraum hinaus, so findet der Embryo bei seinem Abstieg in den Uterus schädliche Bedingungen vor, die mit einer Trächtigkeit nicht vereinbar sind (WATSON, 2000). Eine persistierende Endometritis führt somit zu einer reduzierten Trächtigkeitsrate und stellt eine wichtige Ursache für die Subfertilität einer Stute dar (TROEDSSON, 1999).

Die Entzündungsreaktion des Uterus wird ausgelöst durch die Inokulation von Spermien in das Uteruslumen (KOTILAINEN et al., 1994). Die Spermien induzieren eine Aktivierung des



Komplementsystems, so dass die Spaltprodukte C5a und C3b entstehen (TROEDSSON et al., 2001). Die Folgen sind eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Chemotaxis von Entzündungszellen, Opsonierung, Aktivierung von Membranlipasen und eine Lysis von Zielzellen (TROEDSSON, 1999). Die ersten Entzündungszellen, die aufgrund der chemotaktischen Wirkung von C5a bereits nach 0,5 h das Uteruslumen erreichen, sind die PMN (KOTILAINEN et al., 1994, TROEDSSON et al., 2001). Diese führen zu einer Phagozytose der Spermien und Bakterien. Nach 4 - 8 h ist die maximale Konzentration von PMN erreicht, die für etwa 24 h bestehen bleibt. 40 - 48 h nach der Besamung sind nur noch minimale Konzentrationen von PMN im Uteruslumen feststellbar (KATILA, 1995). Die Spermien und Bakterien werden somit recht schnell aus dem Uterus eliminiert, so dass das Endometrium zu seinem normalen Zustand zurückkehren und sich auf den Embryo vorbereiten kann.

Eine Regulation der Entzündungsreaktion findet unter anderem durch Komponenten des SP statt. Das SP unterdrückt die Phagozytose der lebenden Spermien, während es die Bindung von PMN an tote Spermien und deren Phagozytose fördert (TROEDSSON et al., 2005). Diese selektive Regulation der Immunantwort fördert das Erreichen des Eileiters durch die lebenden Spermien und die Elimination von toten Spermien aus dem Uterus.

Die Anwesenheit von SP in einer Besamungsportion erhöht die Anzahl der PMN, die in den Uterus einwandern (PORTUS et al., 2005). Die Entzündungsreaktion läuft somit intensiver ab und führt zu einer schnelleren Eliminierung von Bakterien und toten Spermien aus dem Uterus. Durch die effizientere Säuberung des Uterus ist die Dauer der Entzündung kürzer, wenn SP in der Besamungsportion enthalten ist (TROEDSSON et al., 2001). Dabei ist der Anteil an SP in der Besamungsportion direkt proportional zu der Intensität der Entzündung. Je mehr SP enthalten ist, desto mehr PMN wandern in den Uterus ein und desto schneller erfolgt die Reinigung der Gebärmutter (FIALA et al., 2007).

Die Anwesenheit von SP in der Besamungsportion ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn eine Stute mehrmals in einer Rosse besamt wird und noch mit der Anwesenheit von intrauteriner Flüssigkeit durch die vorherige Besamung gerechnet werden muss. Die Inkubation von Spermien in uteriner Entzündungsflüssigkeit ohne SP führt zu einer extensiven Bindung zwischen PMN und Spermien. Hierdurch wird die Motilität der Spermien stark reduziert, so dass nur wenige Spermien den Eileiter erreichen (ALGHAMDI et al., 2001). Werden die Spermien allerdings in der Gegenwart von SP in den entzündeten Uterus eingebracht, so entfaltet das SP eine protektive Wirkung und unterdrückt die Bindung zwischen Spermien und PMN (ALGHAMDI et al., 2004). Dieser positive Einfluss des SP spiegelt sich auch in der



Trächtigkeitrate wider. ALGHAMDI et al. (2004) besamten Stuten 12 h nach der Auslösung einer uterinen Entzündung. Bei Anwesenheit von SP in der Besamungsportion war die Trächtigkeitrate normal hoch (77 %), während sie bei Besamung ohne SP dramatisch reduziert (5 %) war. Dies zeigt, dass die Anwesenheit von equinem SP die Fertilität deutlich verbessern kann, wenn mehrere Besamungen aufeinander erfolgen.

Die Bestandteile des SP, die die Immunantwort der Stute regulieren, sind bisher nicht genau identifiziert. ALGHAMDI et al. (2004) stellten fest, dass die Proteine im SP für die immunsuppressive Wirkung verantwortlich sind. Sie fällten die Proteine im SP mit Ammoniumsulfat aus und kamen zu dem Ergebnis, dass frisches SP und die ausgefällten Proteine gleichermaßen die Bindung zwischen PMN und Spermien unterdrücken. Die Verdauung der SP-Proteine mit Proteinase K führte zu einem kompletten Verlust der immunsuppressiven Aktivität, was ebenfalls zeigte, dass proteinöse Komponenten im SP die Immunantwort regulieren (ALGHAMDI et al., 2004). Die Proteinfraction, die die Bindung zwischen Spermien und PMN hemmt, weist ein Molekulargewicht von < 35 kDa auf (TROEDSSON et al., 2005). Neuere Studienergebnisse zeigen, dass es sich bei diesem Protein möglicherweise um das equine CRISP-3 handelt (DOTY et al., 2011). Neben dem equinen CRISP-3 spielt vermutlich auch eine DNase im SP eine Rolle bei der Bindung zwischen PMN und Spermien (ALGHAMDI und FOSTER, 2005). Die PMN setzen DNA frei, die zur Bildung von neutrophilen extrazellulären Fallen (Neutrophil Extracellular Traps, NETs) führt. In diesen Netzwerken extrazellulärer Fasern werden die Spermien wie in einem Spinnennetz immobilisiert. DNase im SP ist in der Lage die ausgestoßene DNA zu verdauen und die Spermien aus der Matrix zu befreien. So können mehr Spermien den Ort der Befruchtung im Eileiter erreichen (ALGHAMDI und FOSTER, 2005).

Die Restprodukte der Entzündung werden auf lymphatischem Weg und durch die geöffnete Zervix eliminiert (KATILA, 1997). Für diesen Vorgang ist eine gute Kontraktibilität des Myometriums von Bedeutung. SP scheint die Kontraktionsfähigkeit des Uterus zu beeinflussen. So sind die uterinen Kontraktionen vermindert, wenn SP in der Besamungsportion enthalten ist (PORTUS et al., 2005). Dieses Ergebnis ist erstaunlich, da das SP reich an Oxytocin und Prostaglandinen ist und somit eine Steigerung der Uteruskontraktionen in Anwesenheit von SP zu erwarten gewesen wäre. Bei Stuten, die ohnehin eine eingeschränkte Uteruskontraktibilität aufweisen und dadurch zu einer persistierenden Endometritis neigen, ist die Anwesenheit von SP aus dieser Sichtweise somit nicht von Vorteil (PORTUS et al., 2005).

## 2.6 Einfluss des Seminalplasmas auf den Zeitpunkt der Ovulation

Die Auslösung der Ovulation kann je nach Spezies durch zwei unterschiedliche Strategien erfolgen. So wird eine Unterteilung in Spezies mit spontaner und Spezies mit induzierter Ovulation vorgenommen, je nachdem welcher Stimulus zu einer Freisetzung des Gonadotropin Releasing Hormons (GnRH) aus dem Hypothalamus führt.

Bei den Spezies mit spontaner Ovulation kommt es mit zunehmender Follikelausreifung zu einem Anstieg der Östrogen-Konzentration im Blut. Das folliculäre Östrogen stimuliert die pulsatile Freisetzung von GnRH aus dem Nucleus arcuatus des Hypothalamus, sodass es im Folgenden zu einer verstärkten Ausschüttung von Luteinisierendem Hormon (LH) aus dem Hypophysenvorderlappen kommt. Die präovulatorische LH-Freisetzung in die systemische Zirkulation löst nun die Ovulation aus. Die Zeitspanne zwischen LH-Peak und Ovulation ist dabei tierartsspezifisch festgelegt. Der Follikel bestimmt bei diesem Ovulationstyp somit letztlich selbst durch seine Östrogenkonzentration den Zeitpunkt der Ovulation. Diesen Typ der Ovulation weisen unter anderem Pferde, Schweine, Rinder, Hunde, Mäuse und der Mensch auf (MEINECKE, 2005).

Bei den Spezies mit induzierter Ovulation, zu denen Kameliden, Katzen, Kaninchen, Opossums, Koalas und Frettchen zählen, löst ein physikalischer Stimulus während der Kopulation die Ovulation aus. Die sensorischen Nervenendigungen an Vagina und Zervix werden durch den Penis stimuliert, so dass es zu einer Reizweiterleitung über das Rückenmark an den Hypothalamus kommt. Im Hypothalamus erfolgt die hochfrequente Freisetzung von GnRH, so dass es folglich zu einer massiven LH-Ausschüttung und zur Ovulation kommt (MEINECKE, 2005). In den letzten Jahren wird jedoch zunehmend in Frage gestellt, ob immer ein physikalischer Reiz für die Auslösung der Ovulation erforderlich ist. So wurde zunächst im Ejakulat von Kameliden eine chemische Substanz nachgewiesen, die in der Lage ist die Ovulation auszulösen. Diese Substanz wird als „Ovulations-induzierender Faktor“ (OIF) bezeichnet und wurde erstmals von chinesischen Wissenschaftlern nachgewiesen. CHEN et al. (1985) besamten Kamele sowohl mit ganzem Ejakulat als auch nur mit SP und mit gewaschenen Spermien. Dabei konnten sie eine Ovulation mithilfe des ganzen Ejakulats und mithilfe des SP auslösen, jedoch nicht allein mit Spermien. So folgerten sie, dass ein OIF im SP der Kamele enthalten ist. Des Weiteren führten sie Besamungen von Kamelen mit dem Ejakulat von Bullen durch und konnten auf diese Weise ebenfalls Ovulationen auslösen. Dies ließ den Schluss zu, dass auch bei Bullen ein OIF im Ejakulat enthalten ist. WABERSKI et al. (1997) wiesen ebenfalls einen OIF im SP von Ebern nach, der in der Lage ist die Ovulation zu beschleunigen.

Sie führten eine transzervikale Infusion von SP in einem Uterushorn durch und zogen dadurch den Ovulationszeitpunkt um 8,5 h im ipsilateralen Ovar im Vergleich zum kontrolateralen Ovar vor, dessen Uterushorn nicht infundiert wurde. Das SP ist somit in der Lage die Zeitspanne zwischen LH-Peak und Ovulation zu verkürzen. Des Weiteren zeigten die Versuche, dass ein OIF sowohl bei Spezies mit induzierter als auch mit spontaner Ovulation vorkommt. Es handelt sich also um einen Bestandteil im SP von Säugern, der zwischen den Spezies konserviert ist.

Der OIF entfaltet seine Wirkung auf systemischem Weg. So lässt sich nicht nur durch eine intrauterine, sondern auch durch eine intramuskuläre Verabreichung von gereinigtem Lama- und Alpaka-SP eine Ovulation auslösen (ADAMS et al., 2005). Auch die intramuskuläre Gabe von Bullen-SP kann beim Lama eine Ovulation induzieren (RATTO et al., 2006).

Beim Pferd scheint ebenfalls ein OIF im SP zu existieren. So führt die intramuskuläre Gabe von equinem SP an Lamas zur Ovulation. Die Ovulationsrate ist jedoch niedriger als bei der Verabreichung von Lama-SP, was die Vermutung zulässt, dass im equinen SP eine niedrigere Konzentration des OIF enthalten ist als bei Lamas. Die gleiche Beobachtung wurde auch bei der Verabreichung von porcinem SP an Lamas gemacht. Hier konnte erst durch eine hohe Dosis SP eine Ovulation beim Lama ausgelöst werden. Ob dies den Schluss zulässt, dass alle Tiere mit induzierter Ovulation höhere Konzentrationen des OIF im SP haben als Tiere mit spontaner Ovulation, bedarf weiterer Forschungstätigkeit (BOGLE et al., 2011).

Die Wirkung des OIF scheint einen dosisabhängigen Effekt aufzuweisen. Je höher die intramuskuläre Dosis an SP ist, desto höher ist die Ovulationsrate, der Gelbkörper-Durchmesser und die Progesteron-Konzentration (TANCO et al., 2011).

Der OIF führt, genauso wie das körpereigene GnRH, zu einer Stimulation der LH-Ausschüttung, jedoch unterscheidet es sich chemisch gesehen von diesem. So lässt sich die durch SP ausgelöste LH-Ausschüttung nicht durch den Einsatz von Anti-GnRH-Antikörpern unterdrücken (PAOLICCHI et al., 1999). Auch ist ein durch SP ausgelöster Gelbkörper in seinem Durchmesser größer und bildet sich erst später zurück als ein Gelbkörper, der durch die Gabe von GnRH ausgelöst wird. Zudem bildet ein Gelbkörper, der durch SP entstanden ist, etwa doppelt so viel Progesteron (ADAMS et al., 2005).

Der OIF ist ein Proteinbestandteil im SP, der sowohl hitzeresistent als auch resistent gegenüber einer enzymatischen Verdauung mit Proteinase K ist, jedoch sensibel gegenüber Pronase (RATTO et al., 2010). Der OIF weist vermutlich ein Molekulargewicht von 14 kDa auf

(RATTO et al., 2011). Das am häufigsten vorkommende Protein im SP mit einem Molekulargewicht von 14 kDa ist  $\beta$ -nerve growth factor ( $\beta$ -NGF). Die intramuskuläre Gabe von humanem  $\beta$ -NGF bei Lamas löst genauso häufig die Ovulation aus wie die Gabe von dem GnRH-Agonist Buserelin und Alpaka-SP, so dass die Vermutung nahe liegt, dass es sich beim OIF um  $\beta$ -NGF handelt (KERSHAW-YOUNG et al., 2012).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Probandenkollektiv

Für die vorliegende Arbeit standen 8 Hengste zur Verfügung, die ein Alter von 3 - 12 Jahren aufwiesen. Es handelte sich um 2 Shetland-Ponys, 2 Haflinger, 2 Deutsche Sportpferde, 1 Kaltblut-Araber-Mix und 1 Trakehner. Drei Hengste (Hengst 4, 5 und 8) wurden im Kühlsamenversand eingesetzt. Alle Hengste wurden zur Gewährleistung einer optimalen Samenqualität unabhängig von den Analysen dreimal pro Woche abgesamt. Die Hengste hatten täglich für einige Stunden Koppelgang und teilweise Bewegung in der Führmaschine oder unter dem Reiter. Die Aufstallung erfolgte in Einzelboxen auf Stroh. Die Fütterungsration beinhaltete Heu, Müsli und Mineralfutter. Wasser stand ad libitum aus Selbsttränken zur Verfügung.

Alle Hengste wurden regelmäßig gegen EHV-1, EHV-4, Tetanus und Influenza geimpft. Alle 3 Monate wurden die Tiere zeitgleich entwurmt. Vor Versuchsbeginn wurden Tupferproben aus der Fossa glandis, Urethra und dem Penis entnommen und mikrobiologisch untersucht. Es wurde bei keinem der Hengste eine Besiedelung mit pathogenen Keimen nachgewiesen. Alle Hengste waren im Versuchszeitraum klinisch gesund.

Die Hengste wiesen eine gute Libido sexualis auf. Sechs Hengste wiesen ebenfalls eine gute Fertilität auf, bei den übrigen 2 Hengsten war die Fruchtbarkeit nicht bekannt, da sie aufgrund ihrer schlechten Spermienmotilität bisher nicht in der Zucht eingesetzt wurden (Tabelle 5).

*Tabelle 5: Rasse, Alter, Fertilität und Spermienmotilität der Versuchshengste*

Hengste	Rasse	Alter	Fertilität	Motilität
Hengst 1	Shetland-Pony	12	gut	gut
Hengst 2	Haflinger	3	gut	gut
Hengst 3	Haflinger	4	gut	gut
Hengst 4	Deutsches Sportpferd	3	gut	gut
Hengst 5	Deutsches Sportpferd	3	gut	gut
Hengst 6	Kaltblut-Araber-Mix	3	unbekannt	schlecht
Hengst 7	Shetland-Pony	12	unbekannt	schlecht
Hengst 8	Trakehner	3	gut	mäßig

### **3.2 Samenentnahme**

Die Gewinnung der Ejakulate erfolgte am Phantom. Bei den Haflingern, dem Kaltblut-Araber-Mix und den Warmblütern wurde ein Phantom der Firma Minitüb (Tiefenbach, Deutschland) verwendet, bei den Ponys kam ein kleineres selbstgebautes Phantom zum Einsatz. Die Phantome wurden aus hygienischen Gründen mit Folie eingewickelt, die nach jedem Hengst erneuert wurde. Die Stimulation der Hengste erfolgte entweder durch eine Animierstute oder nur olfaktorisch durch ein mit Rosseharn gefülltes Röhrchen. Bei Hengst 4 und 5 reichte der bloße Anblick des Phantoms zur Samenentnahme aus, so dass auf eine Stute sowie Rosseharn verzichtet werden konnte.

Zum Absamen wurde eine künstliche Vagina (modifiziertes Modell Hannover, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) verwendet. Der Innenraum der künstlichen Scheide wurde mit einem Folienschlauch (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) ausgekleidet, der nach jedem Hengst gewechselt wurde. Zum Auffangen des Samens dienten 200 ml Einwegflaschen (Animal Reproduction Systems, Chino, Kalifornien, USA). Samenfilter aus Nylon (Animal Reproduction Systems, Chino, Kalifornien, USA) führten zu einer Abtrennung der Gelfraktion sowie zur Entfernung von Smegma und Schmutzpartikeln aus dem Ejakulat.

### **3.3 Entnahmezeitpunkte**

Die Samengewinnung erfolgte dreimal wöchentlich am Montag, Mittwoch und Freitag. Die 3 Hengste, die im Kühlsamenversand eingesetzt wurden, wurden bei Eingang von Samenbestellungen zusätzlich an weiteren Tagen abgesamt. In der Regel erfolgte die Ejakulatgewinnung am Vormittag.

Von jedem Hengst wurde zunächst SP gewonnen, das bei -20 °C eingefroren und für den eigentlichen Versuch zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut wurde.

Nachdem in genügender Menge SP tiefgefroren war, wurden von jedem Hengst 6 Ejakulate für den eigentlichen Versuch gewonnen. Die 6 Ejakulate eines Hengstes wurden in zwei aufeinanderfolgenden Wochen im Zeitraum von Oktober 2013 bis Juli 2014 entnommen.

### **3.4 Standardspermatologische Untersuchung**

Unmittelbar nach der Gewinnung des Ejakulats erfolgte die Aufbereitung des Samens im Labor bei Raumtemperatur. Hierzu wurde das gewonnene Ejakulat zunächst aus den Samenauffangfläschchen in 50 ml Falcon-Röhrchen umgefüllt. 1 ml Ejakulat wurde für die standardspermatologische Untersuchung in ein Mikrozentrifugenröhrchen (Starlab, Ahrensburg, Deutschland) pipettiert. Der übrige Teil des Ejakulats diente der Gewinnung von SP oder der Herstellung von unterschiedlich konfektioniertem Kühltaschen für den eigentlichen Versuch.

#### **3.4.1 Makroskopische Untersuchung**

Die makroskopische Beurteilung des Ejakulats ist ein wichtiger Bestandteil jeder Samenuntersuchung, um die weiteren Analysen (z.B. Dichte, Fremdzellen) auf ihre Plausibilität hin zu überprüfen.

Die Untersuchung begann mit der Volumenbestimmung. Es wurde sowohl das schleimfreie Ejakulatvolumen im Falcon-Röhrchen als auch das Volumen der Gelfraktion im Samenfilter bestimmt. Durch Addition der beiden Volumina wurde das Gesamtvolumen ermittelt.

Ein weiteres makroskopisches Untersuchungskriterium war die Farbe. Diese wurde als grau, hellgrau, weiß, elfenbein, gelb, braun oder rot bezeichnet. Bei einer rötlichen oder bräunlichen Färbung (Hinweis auf Hämospemie) oder einer gelblichen Farbe (Hinweis auf Urospemie) wäre das Ejakulat verworfen worden.

Die Konsistenz wurde als wässrig, molkig, milchig oder rahmig eingestuft. Eine herabgesetzte Spermienkonzentration (Oligozoospermie) oder die vollständige Abwesenheit von Spermien (Azoospermie) führen zu einer wässrigen Konsistenz.

Ebenfalls wurde notiert, ob das Ejakulat Beimengungen, wie Schleim, Schmutzpartikel oder Smegma enthielt.

### **3.4.2 Mikroskopische Untersuchung**

#### **3.4.2.1 Motilität**

Die Beurteilung der Motilität ist ein essentieller Bestandteil jeder Samenanalyse, da die Beweglichkeit Auskunft gibt über die Funktionsfähigkeit und die strukturelle Integrität einer Samenzelle (VERSTEGEN et al., 2002). Die Motilität gilt als einer der wichtigsten prognostischen Faktoren zur Beurteilung der Fertilität und war auch in dieser Studie das entscheidende Untersuchungsmerkmal.

Im Ejakulat sollte die Vorwärtsmotilität bei Hengsten im Besamungseinsatz mindestens 50 % betragen (WABERSKI und SIEME, 2009). Im vorliegenden Projekt wurden jedoch auch Hengste mit einer niedrigeren progressiven Beweglichkeit berücksichtigt, da unter Alltagsbedingungen auch teilweise Samen aufbereitet wird, der den Mindestanforderungen nicht entspricht.

Im Versuch erfolgte immer eine Beurteilung des Nativsamens sowie der unterschiedlich konfektionierten Proben. Die Analyse des Nativsamens gab einen Hinweis auf die Bewegungsfähigkeit der Spermien in ihrer natürlichen „Flüssigkeitsumgebung“ (VARNER, 2008). Sie war jedoch teilweise erschwert durch eine sehr hohe Spermienkonzentrationen sowie durch Spermienagglutinationen.

Zur Analyse wurde ein Dunkelphasenkontrastmikroskop (Olympus Corporation, Model CX41RF, Tokyo, Japan) verwendet mit einem auf 38 °C erwärmbaren Mikroskopheiztisch (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland). Die Proben wurden in Leja-Messkammern (4 Chamber Slide, Leja Products, Nieuw-Vennep, Niederlande) mit einer Tiefe von 20 µm bewertet. Unmittelbar nach Befüllung der Leja-Kammer wurden die zentralen Bereiche der Messkammer zugänglich analysiert, um einen Verlust der Homogenität der Probe durch eine Migration der Spermien zum Randbereich zu vermeiden.

Es wurde eine subjektive Motilitätsanalyse durchgeführt, bei der immer die gleiche Person die Beweglichkeit schätzte. Die Einteilung erfolgte prozentual in vorwärts-, orts- und unbewegliche Spermien. Samenzellen, die meist eine geradeaus gerichtete Bewegung zeigten, wurden als progressiv beweglich eingestuft. Spermien, die trotz Schwanzbewegungen auf der Stelle verharrten oder sich in kleinen Kreisen bewegten, deren Radius geringer als die Spermiumlänge war, wurden als ortsbeweglich eingestuft. Die Summe aus vorwärts- und ortsbeweglichen Spermien wurde als Gesamtmotilität angegeben.



### 3.4.2.2 Agglutinationen

Als Agglutination wurde die Aneinanderlagerung von Spermienköpfen bezeichnet, wobei der Schwanz in der Regel frei und beweglich war. Diese Aneinanderheftung der Spermien konnte paarweise, sternförmig oder ungeordnet in Haufen erfolgen. Auch eine Anheftung an andere Partikel, wie z.B. Fremdzellen wurde als Agglutination gewertet. Das Auftreten von Agglutinationen wurde je nach Ausprägung in geringgradig, mittelgradig oder hochgradig eingeteilt.

### 3.4.2.3 Fremdzellen

Als Fremdzellen wurden alle Zellen klassifiziert, die keine Spermien darstellten. Sie wurden nach Typ (Epithelzellen, Rundzellen, Erythrozyten, Leukozyten) und Häufigkeit des Vorkommens (geringgradig, mittelgradig, hochgradig) eingeteilt.

### 3.4.3 Dichte

Die Spermienkonzentration ist einer der wichtigsten Faktoren bei der Samenanalyse, da Infertilität bei vielen Spezies mit einer niedrigen Dichte korreliert (VERSTEGEN et al., 2002).

Die Dichte ist definiert als Spermienanzahl pro Raumeinheit und wird meist in der Einheit Mio./ml angegeben. Bei Hengsten im Besamungseinsatz sollte die Konzentration mindestens 100 Mio./ml betragen (WABERSKI und SIEME, 2009).

In der vorliegenden Arbeit ist zur Dichtebestimmung eine fluoreszenzoptische Messung durchgeführt worden. Als Messgerät diente der NucleoCounter SP-100 (Chemometec, Allerød, Dänemark). Bei dieser Messmethode wird die Plasmamembran der Samenzellen zunächst durch das Reagent S100 zerstört, bevor die Zellkerne mit Propidiumiodid angefärbt und fluoreszenzoptisch ausgezählt werden.

Schließlich wurde von jedem Ejakulat auch die Gesamtspermienzahl ermittelt. Sie stellt das Produkt aus der Spermiedichte und dem Ejakulatvolumen ohne Gelfraktion dar. Bei Großpferderassen sollte die Gesamtspermienzahl bei mindestens  $5 \times 10^9$  liegen, bei Ponyrassen werden oft niedrigere Werte gemessen (WABERSKI und SIEME, 2009).

### **3.4.4 pH-Wert**

Der pH-Wert gibt Auskunft über Beimengungen im Ejakulat (z.B. Harn, Blut) und über entzündliche Prozesse, die in den Hoden, Nebenhoden oder akzessorischen Geschlechtsdrüsen ablaufen können. Der physiologische pH-Wert liegt beim Hengst bei 6,7 - 7,5. Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte mit einem pH-Indikatorpapier (Chemsolute® test pH Indicator, pH 4,0 - 7,5, 0,3 Intervalle, Th. Geyer, Renningen, Deutschland).

### **3.5 Gewinnung von Seminalplasma**

Nachdem das Ejakulat in 50 ml Falcon-Röhrchen umgefüllt und 1 ml Probe für die standardspermatologische Untersuchung entnommen worden war, erfolgte eine zweimalige Zentrifugation des übrigen Ejakulats zur Abtrennung der Spermien vom SP. Die Zentrifugation erfolgte bei 2500 g über einen Zeitraum von 10 min bei 25 °C in einer Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 (Thermo Fisher Scientific, Osterode, Deutschland). Nach der ersten Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Falcon-Röhrchen gekippt, so dass das Spermienpellet am Boden des ersten Falcon-Röhrchens nicht in das zweite Falcon-Röhrchen gelangte. Der Überstand wurde erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, so dass sich die noch im Überstand vorhandenen Spermien am Boden absetzten. Nach Erfolgen der zweiten Zentrifugation wurde das SP zügig abgesaugt. Hierzu wurde eine 20 ml Spritze (B Braun, Injekt, Melsungen, Deutschland) mit einer TSK-Supra Sonderkanüle (2,00 x 120 mm, Ehrhardt Medizinprodukte GmbH, Geislingen, Deutschland) verwendet. Um eventuell noch vorhandene Spermien im Aspirat zu entfernen, erfolgte eine Filtration durch einen Millex® 33 mm Spritzenvorsatzfilter mit einer Porenweite von 0,22 µm (Millipore, Carrigtwohill, Irland). Die Filtration zur Trennung von Spermien und SP stellt eine bewährte Methode dar (JASKO et al., 1992a, KATILA et al., 2004, MARI et al., 2011). Anschließend wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob alle Spermien erfolgreich aus dem SP entfernt wurden. Nach erfolgter Überprüfung wurde das SP bis zum Gebrauch bei -20 °C tiefgefroren. Die Lagerung von SP bei dieser Temperatur hat sich schon vielfach als geeignet erwiesen (JASKO et al., 1992a, WABERSKI et al., 1997, WATSON et al., 1999, ALGHAMDI et al., 2004).

Vor der Verwendung wurde das gefrorene SP im Wärmeblock auf 37 °C erwärmt.

### 3.6 Eingesetzte Verdüner

In der vorliegenden Arbeit wurden die 4 folgenden, kommerziell erhältlichen Frischsamenverdünner in ihrer Wirkung auf die Spermienmotilität miteinander verglichen:

1. **BotuSemen** (Nidacon, Mölndal, Schweden)

BotuSemen (BS) ist ein Verdünner auf Magermilchbasis. Er enthält zudem Kohlenhydrate, Aminosäuren, Konservierungsstoffe, Penicillin K (1.0 g/l), Gentamicin (0.5 g/l) und destilliertes Wasser.

Der Verdünner wurde nach Anleitung selbst angemischt und anschließend in 15 ml Falcon-Röhrchen und 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen bis zum Gebrauch bei -20 °C tiefgefroren.

2. **EquiPro** (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland)

EquiPro (EP) ist ein Frischsamenverdünner auf Magermilchbasis mit Antibiotikazusatz. Er enthält definierte Caseinate und Molkenproteine sowie die Zucker Glukose und Sucrose. Der Verdünner war bei Erwerb in Pulverform und wurde vor Gebrauch in destilliertem Wasser aufgelöst. Anschließend wurde die fertige Suspension in 15 ml Falcon-Röhrchen und 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen bis zum Gebrauch bei -20 °C tiefgefroren.

3. **Gent** (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland)

Gent ist ein eigelbhaltiger Verdünner mit Antibiotikum. Er war beim Erwerb bereits gebrauchsfertig und wurde bei -20 °C tiefgefroren gelagert. Da eine 45 ml Flasche nicht an einem Versuchstag verbraucht werden konnte, wurde der nicht benötigte Verdünner nach dem Auftauen bis zum Gebrauch im Kühlschrank bei 5 °C gelagert.

4. **INRA 96** (IMV Technologies, L'Aigle, Frankreich)

INRA 96 ist ein Verdünner auf Magermilchbasis, der aus der Milchfraktion nur die nativen Phosphocaseinate enthält. Neben den Zuckern Glukose und Laktose beinhaltet er die Antibiotika Penicillin (27mg/l) und Gentamicin (76 mg/l) sowie das Antimykotikum Amphotericin B. INRA 96 eignet sich nicht nur für eine Spermienlagerung bei 5 °C, sondern ermöglicht auch den Versand bei höheren Temperaturen (15 °C) ohne Qualitätsverlust. Der Verdünner war beim Erwerb bereits gebrauchsfertig in 200 ml Flaschen, die im Kühlschrank bei 5 °C gelagert wurden.

Alle Verdüner wurden vor Versuchsbeginn aufgetaut bzw. aus dem Kühlschrank genommen und im Wärmeblock (Accu Block, Digital Dry Bath, Labnet, New Jersey, USA) auf 37 °C erwärmt.

### 3.7 Konfektionierung von Kühlsamen

In der vorliegenden Arbeit wurden 3 Methoden der Samenaufbereitung miteinander verglichen. Bei Konfektionierung 1 (HU 25) und 2 (HZ 25) handelt es sich um Verfahren, die sich bei der routinemäßigen Samenaufbereitung bereits vielfach bewährt haben. Konfektionierung 3 (HZ 333) ist eine neu entwickelte, hoch konzentrierte und volumensparende Methode der Konservierung.

#### 3.7.1 Konfektionierung 1 (HU 25):

##### **Verdünnung auf 25 Mio. Spermien/ml ohne Zentrifugation**

Die Verdünnung des Ejakulats auf eine Konzentration von 25 Mio. Spermien/ml wurde von VARNER et al. (1987) beschrieben und gehört zu den klassischen und einfach durchzuführenden Methoden der Samenaufbereitung. Der Samen wird ohne Zentrifugation verdünnt, er enthält also noch das gesamte SP, das durch die Verdünnung lediglich in seinem Anteil an der Besamungsportion reduziert wird.

Das Ejakulat wurde in Aliquots aufgeteilt und mit den 4 Frischsamenverdünnern (BotuSemen, EquiPro, Gent, INRA 96) in einem Mikrozentrifugengefäß so verdünnt, dass eine Konzentration von 25 Mio. Spermien/ml entstand.

Das Verhältnis von Samen zu Verdüner wurde nach der unten aufgeführten Formel berechnet. Um die Rechnung zu vereinfachen, wurde dabei zunächst von einem Probenvolumen (Ejakulatmenge) von 1 ml ausgegangen:

$$\frac{\text{Dichte} \left( \frac{\text{Mio.}}{\text{ml}} \right)}{25 \left( \frac{\text{Mio.}}{\text{ml}} \right)} \cdot 1 \text{ ml (Probenvolumen)} = \text{Verdünermenge (ml)}$$

Da die verdünnten Proben in 1,5 ml Mikrozentrifugengefäßen gelagert werden sollten, wurden das Probenvolumen und die Verdünermenge so weit reduziert, dass das Gesamtvolumen maximal 1,5 ml betrug. Zunächst wurde die entsprechende Menge des Ejakulats in das

Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert, bevor die errechnete Verdünnermenge langsam vom Rand des Gefäßes aus hinzugegeben wurde. Danach wurde die Probe gut geschwenkt. Jede Probe wurde zweimal identisch angesetzt. Die zwei entstandenen Aliquots wurden mit H24 (Haltetest nach 24 h) bzw. H48 (Haltetest nach 48 h) gekennzeichnet und beide für 10 min in einen Wärmeblock (Accu Block, Digital Dry Bath, Labnet, New Jersey, USA) bei 37 °C gestellt. Diese Inkubationszeit vor der Motilitätsanalyse wurde durchgeführt, da die Spermien direkt nach der Verdünnung oft noch ein zirkuläres Bewegungsmuster aufweisen, das erst nach 5- bis 10-minütiger Inkubation verschwindet (JASKO et al., 1992a, VARNER, 2008).

Nach der Inkubationszeit wurden die 2 Proben aus dem Wärmeblock genommen. Die mit H24 gekennzeichnete Probe diente auch zur Spermienanalyse zum Zeitpunkt 0 (H0), um nicht unnötig viele Aliquots herstellen zu müssen. Sie wurde einer subjektiven Motilitätsanalyse unterzogen, bevor beide Aliquots im Kühlschrank bei 5 °C gelagert wurden. Eine Probe wurde nach 24 h erneut analysiert (H24), die andere Probe wurde nach 48 h beurteilt (H48). Jede der Proben wurde vor der Analyse jeweils 10 Minuten im Wärmeblock inkubiert.

#### Sonderfall: 1 + 2 Verdünnung

Ein Hengst (Hengst 7) wies im Nativejakulat in 4 von 6 Ejakulaten eine Dichte von < 75 Mio. Spermien/ml auf. Da aber in jedem Fall mindestens eine 1 + 2 Verdünnung (1 Teil Ejakulat + 2 Teile Verdünner) stattfinden sollte, um die Spermaqualität bestmöglich zu erhalten, wurde dieser Hengst bei einer Konzentration von < 75 Mio./ml in einem Verhältnis von 1 + 2 verdünnt. Hierzu wurden zu je 100 µl Samen 200 µl des jeweiligen Verdünners gegeben. Es wurden ebenfalls 2 Aliquots (H24, H48) erstellt. Diese Form der Verdünnung wird, da sie nur in 4 von 48 ausgewerteten Ejakulaten Anwendung fand, im Folgenden nicht gesondert angeführt.

### 3.7.2 Konfektionierung 2 (HZ 25):

#### Verdünnung auf 25 Mio. Spermien/ml nach Zentrifugation

Die Zentrifugation der Spermien mit anschließender Entfernung des SP stellt ebenfalls eine übliche Methode der Samenaufbereitung dar, die gegenüber der Konfektionierung 1 den Vorteil hat, dass eine Lagerung der Spermien ohne die schädlichen Faktoren im SP erfolgt (PADILLA und FOOTE, 1991, JASKO et al., 1991, BRINSKO et al., 2000).

Vor der Zentrifugation wurde eine 1 + 1 Vorverdünnung des Ejakulats durchgeführt. Hierzu wurden 7 ml Ejakulat und anschließend 7 ml des jeweiligen Verdünners (BotuSemen, EquiPro, Gent, INRA 96) in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert. Da oftmals das Gesamtvolumen des Ejakulats nicht für diese Verdünnung ausreichte, wurden die Proben- und Verdünnermengen in diesen Fällen entsprechend reduziert, so dass aber in jedem Fall eine 1 + 1 Verdünnung stattfand.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 600 g über einen Zeitraum von 10 min bei 25 °C. Nach der Zentrifugation wurde mit einer 20 ml Spritze und einer TSK-Supra Sonderkanüle das SP zügig abgesaugt. Nur ein kleiner Überstand wurde belassen, da ein restlicher SP-Anteil für die Erhaltung der Spermien-Vitalität von Vorteil ist (SIEME, 2009).

Das Spermienpellet am Boden des Röhrchens wurde vorsichtig mit dem kleinen verbliebenen Überstand resuspendiert. Hierzu wurde mit einer 1000 µl Pipette das Pellet und der Überstand mehrmals langsam aufgezogen und auf diese Weise durchmischt. Nach gründlicher Resuspension aller 4 Proben erfolgte eine Dichtemessung mit dem NucleoCounter und anschließend eine Verdünnung auf 25 Mio./ml nach der gleichen Formel wie bei Konfektionierung 1:

$$\frac{\text{Dichte} \left( \frac{\text{Mio.}}{\text{ml}} \right)}{25 \left( \frac{\text{Mio.}}{\text{ml}} \right)} \cdot 1 \text{ ml (Probenvolumen)} = \text{Verdünnermenge (ml)}$$

Es wurden, genauso wie bei der 1. Konfektionierung, wieder von jeder Probe 2 Aliquots (H24, H48) hergestellt. Diese wurden für 10 min in den Wärmeblock gegeben. Obwohl immer nur eine Probe direkt danach analysiert wurde, war es wichtig beide Proben in den Wärmeblock zu stellen, um sie den gleichen Versuchsbedingungen auszusetzen. Nachdem die mit H24 gekennzeichnete Probe einer subjektiven Motilitätsbewertung unterzogen worden war, wurden die Proben für 24 bzw. 48 h bei 5 °C gelagert und anschließend analysiert.

### 3.7.3 Konfektionierung 3 (HZ 333):

Konfektionierung 3 umfasste die Kühlisamenkonservierung mit der hochkonzentrierten Lagerung der Samenzellen bei 333 Mio. Spermien/ml über einen Zeitraum von 48 h. Nach der Lagerung wurden der Großteil des Verdünners und das SP hinzugegeben, um eine zur Besamung optimale Spermienkonzentration von 25 Mio. Spermien/ml zu erzielen.

#### 3.7.3.1 Versuchsschritt 1: Verdünnung auf 333 Mio. Spermien/ml nach Zentrifugation

Die Konfektionierung 3 entsprach in ihrer Vorgehensweise zunächst der Konfektionierung 2. Die folgenden Arbeitsschritte wurden daher nur einmal ausgeführt und konnten anschließend für beide Samenaufbereitungsformen genutzt werden:

- Vorverdünnung mit BotuSemen, EquiPro, Gent, INRA 96 im Verhältnis 1 + 1
- Zentrifugation bei 600 g für 10 min bei 25 °C
- Absaugen des Überstands
- Resuspension des Pellets
- Dichtemessung

Anschließend wurden von jedem resuspendierten Pellet 2 Aliquots entnommen, die mit dem jeweiligen Frischsamenverdünner auf 333 Mio./ml verdünnt wurden. Die Berechnung der Verdünnung erfolgte wieder auf der Basis von 1 ml Probenvolumen:

$$\frac{\text{Dichte } \left(\frac{\text{Mio}}{\text{ml}}\right)}{333 \left(\frac{\text{Mio}}{\text{ml}}\right)} \cdot 1 \text{ ml (Probenvolumen)} = \text{Verdünnermenge (ml)}$$

Da auch hier wieder die Lagerung in 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen erfolgte und nach der Zentrifugation für jedes Aliquot nur ein kleines Volumen zur Verfügung stand, wurden in der Regel nur 100 µl Probenvolumen und die errechnete Verdünnermenge langsam zusammen gegeben. Wenn das Probenvolumen nach dem Absaugvorgang sehr gering war, wurde die Menge auch auf < 100 µl reduziert. Es wurden pro Verdünner wieder 2 Aliquots (H24, H48) angesetzt.

Hengst 7 neigte zu einer Oligozoospermie. In 3 von 6 Ejakulaten war die Dichte nach der Zentrifugation bei einigen Verdünnern < 333 Mio./ml, so dass eine Verdünnung auf 333 Mio./ml nicht möglich war. In diesen Fällen wurden nur die Konfektionierungen 1 + 2 durchgeführt, sowie die Proben der Konfektionierung 3 weiter aufbereitet, die eine Dichte > 333 Mio./ml aufwiesen.

### 3.7.3.2 Versuchsschritt 2: Verdünnung auf 25 Mio. Spermien/ml mit 0, 5, 20 und 80 % Seminalplasma im Verdünner

Vor jedem Versuchstag wurden die 4 Verdüner jeweils mit 0, 5, 20 und 80 % SP versetzt und im Wärmeblock auf 37 °C erwärmt. In Tabelle 6 sind die Volumenverhältnisse von dem Verdünner und der jeweiligen Menge SP dargestellt. Es wurde immer autologes SP desselben Hengstes verwendet.

*Tabelle 6: Mischungsverhältnisse von SP und Verdünner zur Herstellung von 1 ml Verdünner mit einem Anteil von 0, 5, 20 und 80 % SP*

SP (%)	Verdünner (µl)	SP (µl)	SP in der Endprobe (%)
0	1000	0	0
5	950	50	4,624
20	800	200	18,496
80	200	800	73,985

Nach der Herstellung von 2 Aliquots (H24, H48) der 333 Mio./ml Probe, wurden aus dem H24-Aliquot 4 x 10 µl entnommen für die Analyse zum Zeitpunkt 0. Zu den 10 µl wurden jeweils 123 µl Verdünner mit 0, 5, 20 bzw. 80 % SP hinzu pipettiert. So entstanden Proben mit einer Dichte von 25 Mio./ml. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37 °C im Wärmeblock erfolgte eine Motilitätsbewertung. Die mit SP und Verdünner versetzten H0-Proben wurden nach der Analyse verworfen.

Die mit H24 bzw. H48 gekennzeichneten Proben wurden für 24 bzw. 48 h im Kühlschrank gelagert. Nach dem entsprechenden Zeitraum wurden aus einem Aliquot wieder 4 x 10 µl entnommen und mit je 123 µl Verdünner mit 0, 5, 20 oder 80 % SP vermischt. Die entstandenen Proben mit einer Dichte von 25 Mio./ml wurden nach 10-minütiger Inkubation im Wärmeblock einer Motilitätsanalyse unterzogen.



### 3.7.4 Die 3 Samenaufbereitungsmethoden im Überblick

Abbildung 1 gibt eine Übersicht über die angewendeten Konfektionierungen in dieser Arbeit.

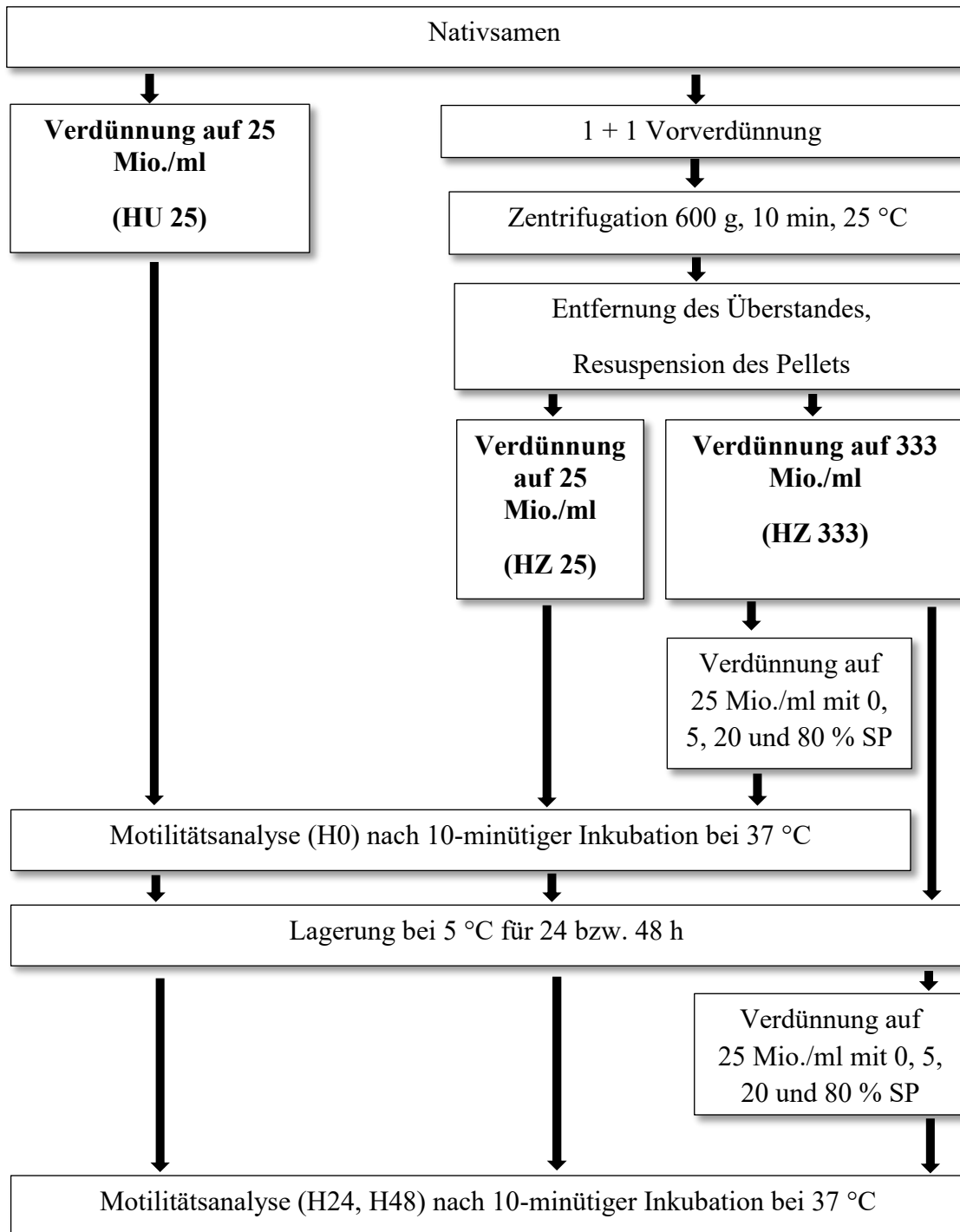


Abbildung 1: Studiendesign im Überblick. Lagerung ohne Zentrifugation bei 25 Mio./ml (HU25), zentrifugierte Lagerung bei 25 Mio./ml (HZ 25) und bei 333 Mio./ml (HZ 333). Motilitätsanalyse 0 h (H0), 24 h (H24) und 48 h (H48) nach Samenentnahme.

### **3.8 Statistische Auswertung**

Die in den Untersuchungen erhaltenen Daten wurden unter Verwendung des Programms „Microsoft Excel“ (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA) erfasst. In diesem Programm wurden auch die graphischen Darstellungen angefertigt. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit den in JMP 10.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) zur Verfügung stehenden Funktionen.

Die Versuchsergebnisse wurden zunächst auf Normalverteilung geprüft (Shapiro–Wilk–Test). Da die Ergebnisse nicht normalverteilt waren, wurden die Einflüsse von Verdünner, Hengst und Konfektionierung auf die Motilität abhängig von den Merkmalsausprägungen anhand von nichtparametrischen Tests für verbundene Stichproben (Wilcoxon signed rank-Test und Kruskal-Wallis-Test) überprüft. In den Tabellen 9 – 18 sind die Ergebnisse in Form von Medianwerten mit den entsprechenden Minimum- und Maximumwerten angegeben. Die Abbildungen 2, 3 und 5 – 12 zeigen die Verteilung der Ergebnisse in Form von Boxplots mit der Angabe von Median, Minimum- und Maximumwerten sowie der Quartile.

Alle Wahrscheinlichkeitswerte mit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Alle Werte von  $p \geq 0,05$  bis  $p = 0,1$  wurden als statistisch auffällig, jedoch nicht als signifikant betrachtet. Alle Werte mit  $p > 0,1$  wurden als statistisch nicht signifikant eingestuft.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Standardspermatologische Untersuchung

#### 4.1.1 Makroskopische Untersuchung

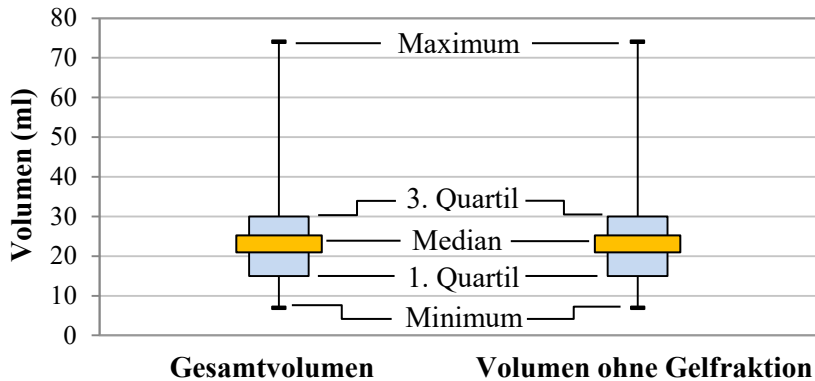


Abbildung 2: Verteilung des Ejakulatvolumens von 48 gewonnenen Samenproben

Wie Abbildung 2 zu entnehmen ist, zeigte das Volumen eine große Schwankungsbreite von 7 - 74 ml zwischen den Hengsten. Gründe für diese große Varianz waren, neben genetischen Faktoren, auch die unterschiedliche Stimulationsdauer und die variierende Anzahl von 1 - 4 Aufsprüngen.

Die Gelfraktion, die im Samenfilter aufgefangen wurde, machte in der Regel nur einen sehr kleinen Anteil des gewonnenen Ejakulats aus. Meist war das Volumen im Samenfilter zu gering, um es zur Volumenbestimmung in einer Spritze aufziehen zu können. Daher stimmen in dieser Arbeit das Gesamtvolumen und das Volumen ohne Gelfraktion häufig überein.

Die Ejakulate wiesen die Farben hellgrau ( $n = 10$ ), weiß ( $n = 1$ ) und elfenbein ( $n = 37$ ) auf. Es kamen somit keine pathologischen Farbabweichungen vor.

Die Konsistenz der Ejakulate war wässrig ( $n = 5$ ), molkig ( $n = 3$ ), molkig – milchig ( $n = 5$ ), milchig ( $n = 34$ ) oder milchig – rahmig ( $n = 1$ ). Die wässrige Konsistenz trat nur bei einem Hengst (Hengst 7) auf und war auf eine verminderte Spermienkonzentration im Ejakulat zurückzuführen.

Als Beimengungen konnten in einigen Fällen geringe Mengen Schleim ( $n = 11$ ) und/oder Schmutzpartikel ( $n = 6$ ) festgestellt werden, die sich im Samenfilter ablagerten.

### 4.1.2 Mikroskopische Untersuchung

#### 4.1.2.1 Motilität im Nativsamem

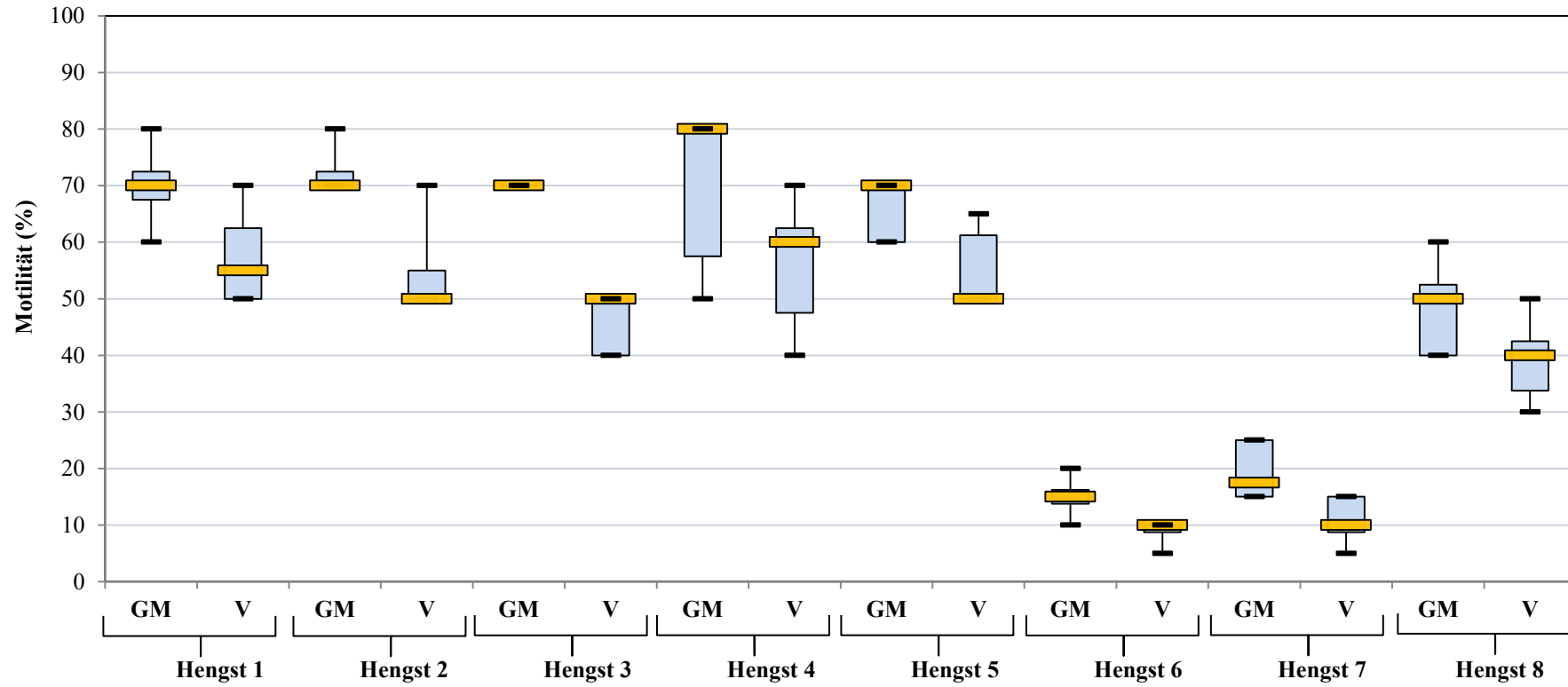


Abbildung 3: Darstellung von Gesamtmotilität (GM) und Vorwärtsmotilität (V) in den Nativejakulaten der 8 Hengste

Die Beweglichkeit der Spermien im Nativejakulat variierte zwischen den einzelnen Hengsten sehr stark (Abbildung 3). Während einige Hengste die Mindestanforderung von 50 % vorwärtsbeweglichen Spermien immer erfüllten (Hengst 1, 2, 5), war dies bei anderen Hengsten in keinem Ejakulat der Fall (Hengst 6, 7). Hengst 3 erfüllte in 4 von 6 Ejakulaten die Mindestanforderungen, Hengst 4 erfüllte in 5 von 6 Ejakulaten die Mindestanforderungen, Hengst 8 erfüllte nur in 1 von 6 Ejakulaten die Mindestanforderungen bezüglich der progressiven Motilität.

#### **4.1.2.2 Agglutinationen**

Die Ejakulate wiesen entweder keine ( $n = 26$ ), geringgradige ( $n = 19$ ), gering- bis mittelgradige ( $n = 2$ ) oder mittelgradige ( $n = 1$ ) Agglutinationen auf. In einem normalen Hengstejakulat sollten keine Agglutinationen vorhanden sein (WABERSKI und SIEME, 2009). Da aber in einigen Fällen die Dichte sehr hoch war entstanden Agglutinationen, die sich nach der Verdünnung jedoch wieder auflösten.

#### **4.1.2.3 Fremdzellen**

In den Ejakulaten waren häufig Rundzellen ( $n = 39$ ) und/ oder Epithelzellen ( $n = 23$ ) zu finden. Meist kamen die Fremdzellen nur in geringgradiger Menge vor, 8 x auch in mittelgradiger Ausprägung. Bei Hengst 8 waren Rundzellen in 5 von 6 Ejakulaten in mittelgradiger Ausprägung zu finden. Rundzellen sind aus dem Keimepithel abgestoßene Vorstadien von Spermien, ein geringgradiges Auftreten ist unbedenklich. Das vermehrte Vorkommen wurde in diesem Fall auf das noch relativ junge Alter des Hengstes (3 Jahre) und somit die noch nicht vollständig ausgereifte Spermatogenese zurückgeführt.

### 4.1.3 Dichte

Tabelle 7: Dichte und Spermiengesamtzahl aus 48 Ejakulaten

	Median	Minimum	Maximum
Dichte (Mio./ml)	314,75	16,48	884,4
Spermiengesamtzahl (Mrd.)	7,44	0,21	13,52

Wie Tabelle 7 zu entnehmen ist, variierten die Dichte und die Spermiengesamtzahl sehr stark zwischen den Hengsten. Die Mindestanforderungen hinsichtlich der Dichte (mindestens 100 Mio. Spermien/ml) wurden von allen Hengsten, bis auf Hengst 7, immer erreicht. Hengst 7 wies in 5 von 6 untersuchten Ejakulaten eine Dichte < 100 Mio. Spermien/ml auf.

Nach den Mindestanforderungen für Besamungshengste sollte die Spermiengesamtzahl bei mindestens 5 Mrd. liegen (WABERSKI und SIEME, 2009). Hengst 7 wies in allen Ejakulaten eine verminderte Spermiengesamtzahl auf. Hengst 8 erfüllte in 4 von 6 Ejakulaten und Hengst 3 in 1 von 6 Ejakulaten die Mindestanforderungen der Spermiengesamtzahl nicht.

### 4.1.4 pH-Wert

Tabelle 8: Darstellung des pH-Wertes von 48 Ejakulaten

	Median	Minimum	Maximum
pH-Wert	6,7	6,4	7

Die mit Indikatorpapier bestimmten pH-Werte der 48 Ejakulate sind in Tabelle 8 dargestellt. In der Regel lag der pH-Wert im Normbereich von 6,7 - 7,5. In 6 Ejakulaten wurde hingegen ein niedrigerer pH-Wert von 6,4 gemessen. Da die Hengste und die Ejakulate sonst keinerlei Abnormalitäten zeigten, wurde dies auf die teilweise nicht ganz eindeutige Ablesbarkeit der Farben des Indikatorpapiers im Grenzbereich zwischen 6,4 und 6,7 zurückgeführt.

## **4.2 Einfluss der Konfektionierung auf die Spermienmotilität bei verschiedenen Verdünnern**

Im Folgenden wird dargestellt, inwiefern sich die Spermienmotilität bei den einzelnen Konfektionierungen voneinander unterscheidet. Es wird insbesondere beurteilt, ob die hochkonzentrierte Samenlagerung (HZ 333) zur Aufrechterhaltung der Spermienbeweglichkeit genauso geeignet ist wie die zwei konventionellen Formen der Konfektionierung (HU 25, HZ 25).

### **4.2.1 BotuSemen**

Wie in Tabelle 9 ersichtlich, unterschieden sich die einzelnen Konfektionierungsformen bei Verwendung von BotuSemen während des gesamten Untersuchungszeitraums von 48 h nicht signifikant in der Gesamtmotilität und dem Anteil der unbeweglichen Spermien.

Die Vorwärtsmotilität war jedoch bei einer hochkonzentrierten Lagerung des Samens und dem Hinzufügen von 80 % SP im Verdünner (HZ 333 80 % SP) nach 0, 24 und 48 h signifikant schlechter als bei jeder anderen Aufbereitungsform ( $p < 0,05$ ). Der Anteil der Ortsbeweglichen war bei dieser Konfektionierung stets signifikant höher als bei den übrigen Konfektionierungen ( $p < 0,05$ ).

Bei Verwendung von BotuSemen erzielte die hochkonzentrierte Samenlagerung mit wenig (5 oder 20 % SP) bzw. keinem SP (0 %) genauso gute Resultate wie die beiden konventionellen Formen der Samenlagerung (HU 25, HZ 25).

Tabelle 9: Vergleich von Gesamtmotilität (GM), Vorwärtsmotilität (V), Ortsmotilität (O) und dem Anteil unbeweglicher Spermien (U) bei unterschiedlichen Konfektionierungsformen unter Verwendung von **BotuSemen** nach 0 h (H0), 24 h (H24) und 48 h (H48). Angabe der Medianwerte sowie Minimum- und Maximumwerte in Klammern (Min-Max) aus 48 gewonnenen Samenproben. Identische hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Spalte zeigen an, dass es keine signifikanten Motilitätsunterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.

<u>H0</u>	GM (%)	V (%)	O (%)	U (%)
HU 25	55 (5-80) <sup>a</sup>	47,5 (2-75) <sup>a</sup>	7,5 (0-20) <sup>a</sup>	45 (20-95) <sup>a</sup>
HZ 25	50 (5-80) <sup>a</sup>	45 (5-70) <sup>a</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	50 (20-95) <sup>a</sup>
HZ 333 0 % SP	50 (5-80) <sup>a</sup>	45 (5-75) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	50 (20-95) <sup>a</sup>
HZ 333 5 % SP	55 (5-80) <sup>a</sup>	42,5 (4-75) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	45 (20-95) <sup>a</sup>
HZ 333 20 % SP	52,5 (5-80) <sup>a</sup>	40 (5-70) <sup>a</sup>	10 (0-30) <sup>a</sup>	47,5 (20-95) <sup>a</sup>
HZ 333 80 % SP	50 (5-75) <sup>a</sup>	20 (2-60) <sup>b</sup>	20 (2-50) <sup>b</sup>	50 (25-95) <sup>a</sup>

<u>H24</u>	GM (%)	V (%)	O (%)	U (%)
HU 25	35 (5-70) <sup>a</sup>	25 (3-65) <sup>a</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	65 (30-95) <sup>a</sup>
HZ 25	40 (3-70) <sup>a</sup>	30 (2-60) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	60 (30-97) <sup>a</sup>
HZ 333 0 % SP	35 (4-80) <sup>a</sup>	27,5 (2-75) <sup>a</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	65 (20-96) <sup>a</sup>
HZ 333 5 % SP	37,5 (5-80) <sup>a</sup>	27,5 (3-75) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	62,5 (20-95) <sup>a</sup>
HZ 333 20 % SP	32,5 (5-75) <sup>a</sup>	25 (3-70) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	67,5 (25-95) <sup>a</sup>
HZ 333 80 % SP	32,5 (5-70) <sup>a</sup>	15 (2-55) <sup>b</sup>	15 (3-40) <sup>b</sup>	67,5 (30-95) <sup>a</sup>

<u>H48</u>	GM (%)	V (%)	O (%)	U (%)
HU 25	27,5 (5-70) <sup>a</sup>	20 (2-60) <sup>a</sup>	5 (1-20) <sup>a</sup>	72,5 (30-95) <sup>a</sup>
HZ 25	35 (2-60) <sup>a</sup>	25 (1-45) <sup>a</sup>	5 (1-20) <sup>a</sup>	65 (40-98) <sup>a</sup>
HZ 333 0 % SP	22,5 (2-70) <sup>a</sup>	17,5 (1-65) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	77,5 (30-98) <sup>a</sup>
HZ 333 5 % SP	25 (3-75) <sup>a</sup>	20 (2-70) <sup>a</sup>	5 (1-20) <sup>a</sup>	75 (25-97) <sup>a</sup>
HZ 333 20 % SP	27,5 (3-75) <sup>a</sup>	20 (2-70) <sup>a</sup>	5 (1-20) <sup>a</sup>	72,5 (25-97) <sup>a</sup>
HZ 333 80 % SP	25 (3-65) <sup>a</sup>	10 (1-50) <sup>b</sup>	15 (2-35) <sup>b</sup>	75 (35-97) <sup>a</sup>



### 4.2.2 EquiPro

Die verschiedenen Konfektionierungsformen unterschieden sich bei Verwendung von EquiPro während des gesamten Untersuchungszeitraums von 48 h nicht signifikant in der Gesamtmotilität und dem Anteil der unbeweglichen Spermien (Tabelle 10).

Die Vorwärtsmotilität war jedoch bei der hochkonzentrierten Lagerung des Samens und dem Hinzufügen von 80 % SP im Verdünner (HZ 333 80 % SP) nach 0, 24 und 48 h signifikant schlechter als bei jeder anderen Aufbereitungsform ( $p < 0,05$ ). Der Anteil der ortsbeweglichen Spermien war bei dieser Konfektionierungsform über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant höher als bei den übrigen Aufbereitungsmethoden. Einzige Ausnahme stellte die Aufbereitung mit 20 % SP nach 48 h dar, die teilweise ebenfalls zu einem ähnlich hohen Anteil ortsbeweglicher Spermien führte wie 80 % SP.

Wird EquiPro als Verdünner verwendet, so ist die hochkonzentrierte Lagerung mit wenig oder ohne SP genauso gut zum Erhalt der Motilität geeignet wie die Lagerung bei niedrigerer Dichte (HU 25, HZ 25).

*Tabelle 10: Vergleich von Gesamtmotilität (GM), Vorwärtsmotilität (V), Ortsmotilität (O) und dem Anteil unbeweglicher Spermien (U) bei unterschiedlichen Konfektionierungsformen unter Verwendung von **EquiPro** nach 0 h (H0), 24 h (H24) und 48 h (H48). Angabe der Medianwerte sowie Minimum- und Maximumwerte in Klammern (Min-Max) aus 48 gewonnenen Samenproben. Identische hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Spalte zeigen an, dass es keine signifikanten Motilitätsunterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.*

<b>H0</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>HU 25</b>	60 (5-80) <sup>a</sup>	45 (5-75) <sup>a</sup>	7,5 (0-30) <sup>a</sup>	40 (20-95) <sup>a</sup>
<b>HZ 25</b>	50 (1-75) <sup>a</sup>	45 (0-70) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	50 (25-99) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 0 % SP</b>	45 (2-75) <sup>a</sup>	40 (1-70) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	55 (25-98) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 5 % SP</b>	50 (2-80) <sup>a</sup>	40 (1-70) <sup>a</sup>	5 (0-30) <sup>a</sup>	50 (20-98) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 20 % SP</b>	50 (3-80) <sup>a</sup>	40 (2-70) <sup>a</sup>	10 (0-30) <sup>a</sup>	50 (20-97) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 80 % SP</b>	45 (5-70) <sup>a</sup>	20 (2-60) <sup>b</sup>	20 (2-50) <sup>b</sup>	55 (30-95) <sup>a</sup>

<b>H24</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>HU 25</b>	30 (0-60) <sup>a</sup>	25 (0-50) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	70 (40-100) <sup>a</sup>
<b>HZ 25</b>	32,5 (0-70) <sup>a</sup>	25 (0-60) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	67,5 (30-100) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 0 % SP</b>	25 (0-75) <sup>a</sup>	20 (0-70) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	75 (25-100) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 5 % SP</b>	30 (0-75) <sup>a</sup>	20 (0-70) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	70 (25-100) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 20 % SP</b>	30 (0-70) <sup>a</sup>	20 (0-65) <sup>a</sup>	5 (0-30) <sup>a</sup>	70 (30-100) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 80 % SP</b>	25 (0-60) <sup>a</sup>	10 (0-45) <sup>b</sup>	15 (0-40) <sup>b</sup>	75 (40-100) <sup>a</sup>

<b>H48</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>HU 25</b>	22,5 (0-55) <sup>a</sup>	17,5 (0-50) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	77,5 (45-100) <sup>a</sup>
<b>HZ 25</b>	30 (0-70) <sup>a</sup>	20 (0-60) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	70 (30-100) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 0 % SP</b>	25 (0-65) <sup>a</sup>	20 (0-60) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	75 (35-100) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 5 % SP</b>	20 (0-70) <sup>a</sup>	15 (0-65) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	80 (30-100) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 20 % SP</b>	25 (0-70) <sup>a</sup>	15 (0-65) <sup>a</sup>	5 (0-30) <sup>a,b</sup>	75 (30-100) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 80 % SP</b>	20 (0-50) <sup>a</sup>	5 (0-40) <sup>b</sup>	10 (0-30) <sup>b</sup>	80 (50-100) <sup>a</sup>

### 4.2.3 Gent

Tabelle 11 veranschaulicht, dass bei Verwendung von Gent alle Konfektionierungsformen, mit Ausnahme von HZ 333 80 % SP, gleichermaßen zur Erhaltung der Motilität über 48 h geeignet waren. Insbesondere die Lagerung bei niedriger Dichte nach Entfernung des SP (HZ 25) führte zu einer guten Beweglichkeit.

HZ 333 80 % SP führte nach 48 h zu einer signifikant schlechteren Gesamtmotilität als alle anderen Aufbereitungsformen ( $p < 0,05$ ). Die Vorwärtsmotilität war bei dieser Konfektionierung über den gesamten Untersuchungszeitraum niedriger als bei allen anderen Konfektionierungen ( $p < 0,05$ ). Der Anteil der ortsbeweglichen Spermien war bei HZ 333 80 % SP nach 0 und 24 h signifikant höher als bei allen anderen Aufbereitungsmethoden ( $p < 0,05$ ). Die Zahl der unbeweglichen Spermien war bei HZ 333 80 % SP nach 48 h signifikant größer als bei allen anderen Konfektionierungen ( $p < 0,05$ ).

Weiterhin fiel auf, dass die Verwendung von Gent mit 80 % SP bei einigen Hengsten zur Entstehung von zahlreichen Partikeln führte, deren Größe kleiner als die der Spermienköpfe war (Abbildung 4). Es gibt somit eine Interaktion von SP und dem eigelhaltigen Verdüner, die sich bei hohen SP-Konzentrationen bemerkbar macht. Die Partikelbildung kann auch Ursache für die verminderte Vorwärtsbewegung der Spermien und den höheren Anteil ortsbeweglicher Samenzellen bei 80 % SP sein. Möglicherweise schränken die Partikel die Bewegungsfähigkeit der Spermien so stark ein, dass eine linear gerichtete Vorwärtsbewegung nur noch schwer möglich ist.

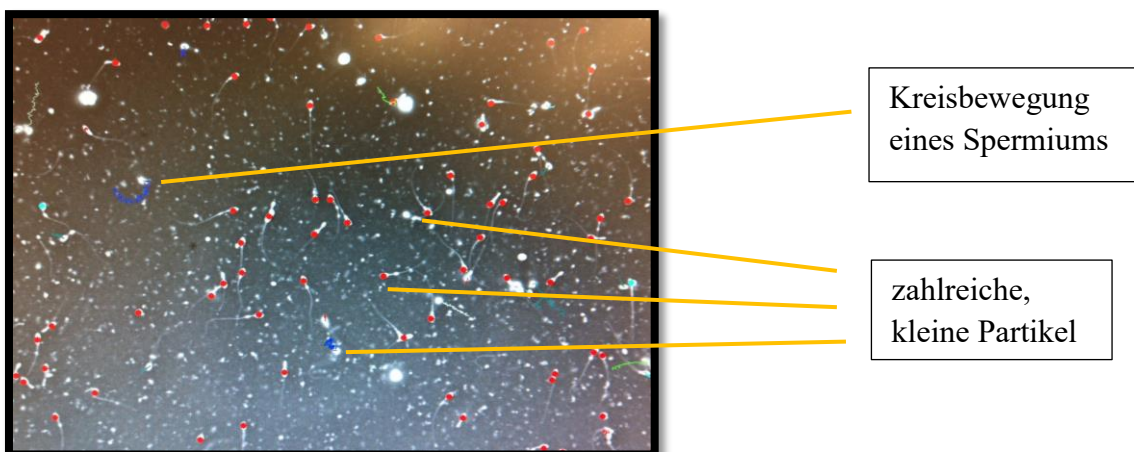


Abbildung 4: mikroskopische Aufnahme der Spermien bei einer Verdünnung mit Gent und Konfektionierung auf 333 Mio. Spermien/ml mit 80 % SP

*Tabelle 11: Vergleich von Gesamtmotilität (GM), Vorwärtsmotilität (V), Ortsmotilität (O) und dem Anteil unbeweglicher Spermien (U) bei unterschiedlichen Konfektionierungsformen unter Verwendung von **Gent** nach 0 h (H0), 24 h (H24) und 48 h (H48). Angabe der Medianwerte sowie Minimum- und Maximumwerte in Klammern (Min-Max) aus 48 gewonnenen Samenproben. Identische hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Spalte zeigen an, dass es keine signifikanten Motilitätsunterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.*

<u>H0</u>	GM (%)	V (%)	O (%)	U (%)
HU 25	57,5 (5-90) <sup>a</sup>	47,5 (3-80) <sup>a</sup>	5 (0-30) <sup>a</sup>	42,5 (10-95) <sup>a</sup>
HZ 25	60 (7-80) <sup>a</sup>	50 (5-75) <sup>a</sup>	5 (0-30) <sup>a</sup>	40 (20-93) <sup>a</sup>
HZ 333 0 % SP	57,5 (5-80) <sup>a</sup>	47,5 (5-70) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	42,5 (20-95) <sup>a</sup>
HZ 333 5 % SP	55 (5-80) <sup>a</sup>	45 (5-70) <sup>a</sup>	5 (0-25) <sup>a</sup>	45 (20-95) <sup>a</sup>
HZ 333 20 % SP	50 (5-80) <sup>a</sup>	45 (5-75) <sup>a</sup>	5 (0-25) <sup>a</sup>	50 (20-95) <sup>a</sup>
HZ 333 80 % SP	50 (5-80) <sup>a</sup>	20 (1-65) <sup>b</sup>	20 (3-50) <sup>b</sup>	50 (20-95) <sup>a</sup>

<u>H24</u>	GM (%)	V (%)	O (%)	U (%)
HU 25	42,5 (5-80) <sup>a,b</sup>	32,5 (3-70) <sup>a</sup>	10 (0-25) <sup>a</sup>	57,5 (20-95) <sup>a,b</sup>
HZ 25	50 (5-80) <sup>a</sup>	35 (3-70) <sup>a</sup>	5 (0-30) <sup>a</sup>	50 (20-95) <sup>a</sup>
HZ 333 0 % SP	37,5 (2-75) <sup>a,b</sup>	30 (1-70) <sup>a</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	62,5 (25-98) <sup>a,b</sup>
HZ 333 5 % SP	47,5 (3-80) <sup>a,b</sup>	30 (2-75) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	52,5 (20-97) <sup>a,b</sup>
HZ 333 20 % SP	50 (2-80) <sup>a,b</sup>	30 (1-75) <sup>a</sup>	5 (0-25) <sup>a</sup>	50 (20-98) <sup>a,b</sup>
HZ 333 80 % SP	30 (1-80) <sup>b</sup>	20 (0-65) <sup>b</sup>	15 (1-50) <sup>b</sup>	70 (20-99) <sup>b</sup>

<u>H48</u>	GM (%)	V (%)	O (%)	U (%)
HU 25	35 (2-70) <sup>a</sup>	25 (1-65) <sup>a</sup>	10 (0-20) <sup>a</sup>	65 (30-98) <sup>a</sup>
HZ 25	45 (3-70) <sup>a</sup>	30 (2-60) <sup>a</sup>	8 (1-25) <sup>a,b</sup>	55 (30-97) <sup>a</sup>
HZ 333 0 % SP	30 (2-65) <sup>a</sup>	22,5 (1-60) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>b</sup>	70 (35-98) <sup>a</sup>
HZ 333 5 % SP	30 (2-70) <sup>a</sup>	25 (0-60) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>b</sup>	70 (30-98) <sup>a</sup>
HZ 333 20 % SP	30 (2-70) <sup>a</sup>	20 (0-65) <sup>a</sup>	7,5 (0-30) <sup>a,b</sup>	70 (30-98) <sup>a</sup>
HZ 333 80 % SP	15 (1-70) <sup>b</sup>	5 (0-60) <sup>b</sup>	7,5 (1-50) <sup>a,b</sup>	85 (30-99) <sup>b</sup>

#### 4.2.4 INRA 96

Wie aus Tabelle 12 ersichtlich, lassen sich bei Verwendung von INRA 96 auch zwischen den zwei konventionellen Konfektionierungen Unterschiede feststellen. So führte die Zentrifugation mit Entfernung des SP und die anschließende Lagerung bei niedriger Dichte (HZ 25) nach 48 h zu einer signifikant besseren Gesamt- ( $p = 0,0402$ ) und Vorwärtsmotilität ( $p = 0,0250$ ) sowie zu weniger unbeweglichen Spermien ( $p = 0,0402$ ) als die unzentrifugierte Lagerung bei niedriger Dichte (HU 25).

Die unzentrifugierte Lagerung bei niedriger Dichte (HU 25) führte teilweise auch zu einer schlechteren Beweglichkeit als die hochkonzentrierte Lagerung bei 333 Mio. Spermien/ml. So war die Vorwärtsmotilität bei HU 25 nach 24 h signifikant niedriger als bei HZ 333 mit 0 % SP ( $p = 0,0480$ ) und auch tendenziell niedriger als bei HZ 333 mit 5 % SP ( $p = 0,0552$ ). Auch nach 48 h war die Vorwärtsmotilität bei HU 25 signifikant geringer als bei HZ 333 0 % SP ( $p = 0,0209$ ) und HZ 333 5 % SP ( $p = 0,0246$ ).

Die hochkonzentrierte Lagerung mit dem Hinzufügen von 80 % SP (HZ 333 80 % SP) führte zu schlechteren Motilitäten als die übrigen Konfektionierungsformen. Nach 24 h war die Gesamtmotilität bei HZ 333 80 % SP signifikant niedriger als bei HZ 333 0 % und 5 % SP ( $p < 0,05$ ). Nach 48 h war die Gesamtmotilität sogar signifikant niedriger als bei allen anderen Konfektionierungsformen, abgesehen von HU 25. Die unzentrifugierte Lagerung bei niedriger Dichte (HU 25) führte zu ähnlich schlechten Motilitäten wie HZ 333 80 % SP. Der Anteil der Vorwärtsbeweglichen war bei HZ 333 80 % SP zu jedem Untersuchungszeitpunkt niedriger und der Anteil der Ortsbeweglichen höher als bei allen anderen Konfektionierungen ( $p < 0,05$ ).

*Tabelle 12: Vergleich von Gesamtmotilität (GM), Vorwärtsmotilität (V), Ortsmotilität (O) und dem Anteil unbeweglicher Spermien (U) bei unterschiedlichen Konfektionierungsformen unter Verwendung von INRA 96 nach 0 h (H0), 24 h (H24) und 48 h (H48). Angabe der Medianwerte sowie Minimum- und Maximumwerte in Klammern (Min-Max) aus 48 gewonnenen Samenproben. Identische hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Spalte zeigen an, dass es keine signifikanten Motilitätsunterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.*

<b>H0</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>HU 25</b>	60 (15-85) <sup>a</sup>	50 (10-80) <sup>a</sup>	10 (0-30) <sup>a</sup>	40 (15-85) <sup>a</sup>
<b>HZ 25</b>	62,5 (10-80) <sup>a</sup>	52,5 (8-75) <sup>a</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	37,5 (20-90) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 0 % SP</b>	65 (10-85) <sup>a</sup>	55 (10-70) <sup>a</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	35 (15-90) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 5 % SP</b>	65 (10-85) <sup>a</sup>	55 (10-75) <sup>a</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	35 (15-90) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 20 % SP</b>	65 (10-85) <sup>a</sup>	50 (10-75) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	35 (15-90) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 80 % SP</b>	55 (7-80) <sup>a</sup>	30 (2-65) <sup>b</sup>	20 (5-40) <sup>b</sup>	45 (20-93) <sup>a</sup>

<b>H24</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>HU 25</b>	42,5 (7-70) <sup>a,b</sup>	30 (3-60) <sup>a</sup>	5 (0-25) <sup>a</sup>	57,5 (30-93) <sup>a,b</sup>
<b>HZ 25</b>	50 (10-70) <sup>a,b</sup>	42,5 (5-65) <sup>a,b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	50 (30-90) <sup>a,b</sup>
<b>HZ 333 0 % SP</b>	50 (2-80) <sup>a</sup>	40 (1-75) <sup>b</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	50 (20-98) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 5 % SP</b>	50 (3-80) <sup>a</sup>	40 (2-75) <sup>a,b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	50 (20-97) <sup>a</sup>
<b>HZ 333 20 % SP</b>	50 (3-75) <sup>a,b</sup>	40 (1-70) <sup>a,b</sup>	10 (0-25) <sup>a</sup>	50 (25-97) <sup>a,b</sup>
<b>HZ 333 80 % SP</b>	40 (1-70) <sup>b</sup>	15 (0-50) <sup>c</sup>	15 (1-40) <sup>b</sup>	60 (30-99) <sup>b</sup>

<b>H48</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>HU 25</b>	35 (2-70) <sup>a,c</sup>	30 (1-60) <sup>a</sup>	7,5 (0-25) <sup>a</sup>	65 (30-98) <sup>a,c</sup>
<b>HZ 25</b>	47,5 (7-70) <sup>b</sup>	40 (2-60) <sup>b</sup>	10 (0-20) <sup>a</sup>	52,5 (30-93) <sup>b</sup>
<b>HZ 333 0 % SP</b>	45 (1-80) <sup>a,b</sup>	35 (0-75) <sup>b</sup>	10 (0-20) <sup>a</sup>	55 (20-99) <sup>a,b</sup>
<b>HZ 333 5 % SP</b>	40 (1-80) <sup>a,b</sup>	35 (0-75) <sup>b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	60 (20-99) <sup>a,b</sup>
<b>HZ 333 20 % SP</b>	40 (1-80) <sup>a,b</sup>	30 (0-70) <sup>a,b</sup>	10 (0-25) <sup>a</sup>	60 (20-99) <sup>a,b</sup>
<b>HZ 333 80 % SP</b>	30 (0-70) <sup>c</sup>	10 (0-60) <sup>c</sup>	15 (0-30) <sup>b</sup>	70 (30-100) <sup>c</sup>

#### 4.2.5 Zusammenfassung Konfektionierung

Die volumensparende Lagerung des Samens bei 333 Mio. Spermien/ml ist genauso gut in der Lage, die Spermienmotilität über 48 h zu erhalten, wie die konventionellen Lagerungsformen bei 25 Mio. Spermien/ml. Bei allen getesteten Verdünnern ließ sich die hochkonzentrierte Lagerung erfolgreich einsetzen.

Bei der Samenaufbereitung machte es in Hinblick auf die Motilität in der Regel keinen Unterschied, ob kein SP (0 %) oder ein geringer Anteil von 5 oder 20 % zu dem stark konzentrierten Samen hinzugegeben wurde. Nur ein hoher prozentualer Anteil von 80 % SP im Verdünner führte zu einer schlechteren Beweglichkeit als die übrigen Konfektionierungen. Ein großes SP-Volumen und ein damit einhergehender niedriger Verdünner-Anteil führen zu einer Abnahme der vorwärtsbeweglichen Spermien und einem Anstieg der ortsbeweglichen. Die Gesamtmotilität und der Anteil der unbeweglichen Spermien werden durch den SP-Gehalt hingegen nur wenig (Gent, INRA 96) bis überhaupt nicht (BotuSemen, EquiPro) beeinflusst.

Bei der Samenaufbereitung mit INRA 96 sind eine Zentrifugation des Samens und die Entfernung des SP empfehlenswert. So führte die zentrifugierte Lagerung bei niedriger Dichte (HZ 25), aber auch die hochkonzentrierte Lagerung mit wenig oder keinem SP (HZ 333 mit 0, 5 % SP) zu einer besseren Motilität als die unzentrifugierte Lagerung (HU 25).

### **4.3 Einfluss des Verdünners auf die Spermienmotilität bei verschiedenen Konfektionierungen**

Im Folgenden wird dargestellt, inwiefern es Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnern in ihrer Fähigkeit die Spermienmotilität zu erhalten gibt. Für jede Form der Konfektionierung wurde untersucht, welche Verdüner besonders für die Aufrechterhaltung der Spermienbeweglichkeit geeignet sind bzw. welche Verdüner gemieden werden sollten.

#### **4.3.1 Konfektionierung 1 (HU 25)**

Bei dieser Konfektionierung wurde der Samen direkt nach der Gewinnung auf 25 Mio./ml verdünnt. Zum Zeitpunkt 0 ließen sich noch keine signifikanten Unterschiede in der Motilität bei den einzelnen Verdünnern feststellen.

Nach einer 24- und 48-stündigen Lagerung wiesen INRA 96 und Gent jedoch eine signifikant bessere Gesamtmotilität auf als EquiPro ( $p < 0,05$ ). Auch die Zahl der vorwärtsbeweglichen Spermien war nach 24 h bei INRA 96 ( $p = 0,0125$ ) und Gent ( $p = 0,0264$ ) signifikant höher als bei EquiPro. Ebenso nach 48 h zeigten sich INRA 96 ( $p = 0,0515$ ) und Gent ( $p = 0,0890$ ) hinsichtlich der Vorwärtsmotilität EquiPro tendenziell überlegen. Der Anteil der ortsbeweglichen Spermien war nach 24 und 48 h bei INRA 96 und Gent signifikant höher als bei EquiPro ( $p < 0,05$ ). Der Anteil der unbeweglichen Spermien war bei EquiPro nach 24 und 48 h signifikant größer als bei INRA 96 und Gent ( $p < 0,05$ ).

Für eine unzentrifugierte Lagerung eigneten sich INRA 96 und Gent daher am besten zur Erhaltung der Motilität. Sie zeigten sich insbesondere EquiPro überlegen (Tabelle 13).



*Tabelle 13: Vergleich von Gesamtmotilität (GM), Vorwärtsmotilität (V), Ortsmotilität (O) und dem Anteil unbeweglicher Spermien (U) bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektio- nierung „HU 25“ nach 0 h (H0), 24 h (H24) und 48 h (H48) gekühlter Lagerung. Angabe der Medianwerte sowie Minimum- und Maximumwerte in Klammern (Min-Max) aus 48 gewonne- nen Samenproben. Identische hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Spalte zeigen an, dass es keine signifikanten Motilitätsunterschiede zwischen den Verdünnern gab.*

<b>H0</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	55 (5-80) <sup>a</sup>	47,5 (2-75) <sup>a</sup>	7,5 (0-20) <sup>a</sup>	45 (20-95) <sup>a</sup>
<b>EquiPro</b>	60 (5-80) <sup>a</sup>	45 (5-75) <sup>a</sup>	7,5 (0-30) <sup>a</sup>	40 (20-95) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	57,5 (5-90) <sup>a</sup>	47,5 (3-80) <sup>a</sup>	5 (0-30) <sup>a</sup>	42,5 (10-95) <sup>a</sup>
<b>INRA 96</b>	60 (15-85) <sup>a</sup>	50 (10-80) <sup>a</sup>	10 (0-30) <sup>a</sup>	40 (15-85) <sup>a</sup>

<b>H24</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	35 (5-70) <sup>a,b</sup>	25 (3-65) <sup>a,b</sup>	5 (0-15) <sup>a,c</sup>	65 (30-95) <sup>a,b</sup>
<b>EquiPro</b>	30 (0-60) <sup>a</sup>	25 (0-50) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	70 (40-100) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	42,5 (5-80) <sup>b</sup>	32,5 (3-70) <sup>b</sup>	10 (0-25) <sup>b</sup>	57,5 (20-95) <sup>b</sup>
<b>INRA 96</b>	42,5 (7-70) <sup>b</sup>	30 (3-60) <sup>b</sup>	5 (0-25) <sup>b,c</sup>	57,5 (30-93) <sup>b</sup>

<b>H48</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	27,5 (5-70) <sup>a,b</sup>	20 (2-60) <sup>a</sup>	5 (1-20) <sup>a,c</sup>	72,5 (30-95) <sup>a,b</sup>
<b>EquiPro</b>	22,5 (0-55) <sup>a</sup>	17,5 (0-50) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	77,5 (45-100) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	35 (2-70) <sup>b</sup>	25 (1-65) <sup>a</sup>	10 (0-20) <sup>b</sup>	65 (30-98) <sup>b</sup>
<b>INRA 96</b>	35 (2-70) <sup>b</sup>	30 (1-60) <sup>a</sup>	7,5 (0-25) <sup>b,c</sup>	65 (30-98) <sup>b</sup>

### 4.3.2 Konfektionierung 2 (HZ 25)

Bei dieser Konfektionierung wurde der Samen nach einer Vorverdünnung zentrifugiert, das SP entfernt und das Spermienpellet anschließend resuspendiert und auf 25 Mio. Spermien/ml verdünnt. Zum Zeitpunkt 0 (H0) gab es kaum Unterschiede zwischen den Verdünnern. Lediglich die Vorwärtsmotilität war bei Verwendung von INRA 96 signifikant besser als bei Verwendung von EquiPro ( $p = 0,0281$ ).

Mit zunehmender Lagerungsdauer (H24, H48) erwiesen sich INRA 96 und Gent dem Verdünner EquiPro deutlich überlegen. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h führten INRA 96 und Gent zu einer signifikant besseren Gesamt- und Vorwärtsmotilität als EquiPro ( $p < 0,05$ ). Der Anteil der unbeweglichen Spermien war bei EquiPro nach 24 und 48 h signifikant höher als bei INRA 96 und Gent ( $p < 0,05$ ).

INRA 96 wies zudem sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Lagerung eine bessere Gesamtmotilität und weniger unbewegliche Spermien auf als BotuSemen ( $p < 0,05$ ). Auch die Vorwärtsmotilität war bei INRA 96 nach 24 h tendenziell besser ( $p = 0,0579$ ) und nach 48 h signifikant besser als bei BotuSemen ( $p = 0,0032$ ).

Der Anteil der ortsbeweglichen Spermien wurde durch den Verdünner nicht beeinflusst.

Zur Erhaltung der Motilität bei einer Lagerung mit 25 Mio. Spermien/ml nach Zentrifugation eigneten sich INRA 96 und Gent daher besser als EquiPro und BotuSemen (Tabelle 14).

*Tabelle 14: Vergleich von Gesamtmotilität (GM), Vorwärtsmotilität (V), Ortsmotilität (O) und dem Anteil unbeweglicher Spermien (U) bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektio- nierung „HZ 25“ nach 0 h (H0), 24 h (H24) und 48 h (H48) gekühlter Lagerung. Angabe der Medianwerte sowie Minimum- und Maximumwerte in Klammern (Min-Max) aus 48 gewonne- nen Samenproben. Identische hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Spalte zeigen an, dass es keine signifikanten Motilitätsunterschiede zwischen den Verdünnern gab.*

<b>H0</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	50 (5-80) <sup>a</sup>	45 (5-70) <sup>a,b</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	50 (20-95) <sup>a</sup>
<b>EquiPro</b>	50 (1-75) <sup>a</sup>	45 (0-70) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	50 (25-99) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	60 (7-80) <sup>a</sup>	50 (5-75) <sup>a,b</sup>	5 (0-30) <sup>a</sup>	40 (20-93) <sup>a</sup>
<b>INRA 96</b>	62,5 (10-80) <sup>a</sup>	52,5 (8-75) <sup>b</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	37,5 (20-90) <sup>a</sup>

<b>H24</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	40 (3-70) <sup>a,b</sup>	30 (2-60) <sup>a,b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	60 (30-97) <sup>a,b</sup>
<b>EquiPro</b>	32,5 (0-70) <sup>a</sup>	25 (0-60) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	67,5 (30-100) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	50 (5-80) <sup>b,c</sup>	35 (3-70) <sup>b</sup>	5 (0-30) <sup>a</sup>	50 (20-95) <sup>b,c</sup>
<b>INRA 96</b>	50 (10-70) <sup>c</sup>	42,5 (5-65) <sup>b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	50 (30-90) <sup>c</sup>

<b>H48</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	35 (2-60) <sup>a,b</sup>	25 (1-45) <sup>a,b</sup>	5 (1-20) <sup>a</sup>	65 (40-98) <sup>a,b</sup>
<b>EquiPro</b>	30 (0-70) <sup>a</sup>	20 (0-60) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	70 (30-100) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	45 (3-70) <sup>b,c</sup>	30 (2-60) <sup>b,c</sup>	8 (1-25) <sup>a</sup>	55 (30-97) <sup>b,c</sup>
<b>INRA 96</b>	47,5 (7-70) <sup>c</sup>	40 (2-60) <sup>c</sup>	10 (0-20) <sup>a</sup>	52,5 (30-93) <sup>c</sup>

### **4.3.3 Konfektionierung 3 (HZ 333 0 % SP)**

Bei dieser Konfektionierung wurde der Samen hoch konzentriert gelagert und erst kurz vor der Analyse auf 25 Mio. Spermien/ml verdünnt. In der ersten Motilitätsauswertung (H0) war lediglich festzustellen, dass INRA 96 zu einer signifikant besseren Gesamt- und Vorwärtsmotilität und zu weniger unbeweglichen Spermien führte als EquiPro ( $p < 0,05$ ). Hiervon abgesehen traten zum Zeitpunkt 0 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verdünnern auf.

Nach einer 24-stündigen Lagerung waren die Gesamt- und Vorwärtsmotilität bei INRA 96 signifikant höher und der Anteil Unbeweglicher signifikant niedriger als bei EquiPro oder BotuSemen ( $p < 0,05$ ). Nach 48 h Lagerung führte INRA 96 sogar zu einer signifikant besseren Gesamt- und Vorwärtsmotilität als alle anderen getesteten Verdüner ( $p < 0,05$ ). Der Anteil der unbeweglichen Spermien war bei INRA 96 nach 48 h am niedrigsten ( $p < 0,05$ ).

Bei einer Lagerung in Gent war die Gesamt- und Vorwärtsmotilität nach 24 h signifikant höher und der Anteil unbeweglicher Spermien signifikant niedriger als bei Lagerung in EquiPro ( $p < 0,05$ ).

Der Anteil der ortsbeweglichen Spermien wurde durch den Verdüner nicht beeinflusst.

INRA 96 eignete sich somit sehr gut für diese Form der hochkonzentrierten Lagerung und war allen anderen Verdünnern, insbesondere EquiPro und BotuSemen, überlegen (Tabelle 15).

*Tabelle 15: Vergleich von Gesamtmotilität (GM), Vorwärtsmotilität (V), Ortsmotilität (O) und dem Anteil unbeweglicher Spermien (U) bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektio- nierung „HZ 333 0 % SP“ nach 0 h (H0), 24 h (H24) und 48 h (H48) gekühlter Lagerung. Angabe der Medianwerte sowie Minimum- und Maximumwerte in Klammern (Min-Max) aus 48 gewonnenen Samenproben. Identische hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Spalte zeigen an, dass es keine signifikanten Motilitätsunterschiede zwischen den Verdünnern gab.*

<b>H0</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	50 (5-80) <sup>a,b</sup>	45 (5-75) <sup>a,b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	50 (20-95) <sup>a,b</sup>
<b>EquiPro</b>	45 (2-75) <sup>a</sup>	40 (1-70) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	55 (25-98) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	57,5 (5-80) <sup>a,b</sup>	47,5 (5-70) <sup>a,b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	42,5 (20-95) <sup>a,b</sup>
<b>INRA 96</b>	65 (10-85) <sup>b</sup>	55 (10-70) <sup>b</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	35 (15-90) <sup>b</sup>

<b>H24</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	35 (4-80) <sup>a,b</sup>	27,5 (2-75) <sup>a,b</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	65 (20-96) <sup>a,b</sup>
<b>EquiPro</b>	25 (0-75) <sup>a</sup>	20 (0-70) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	75 (25-100) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	37,5 (2-75) <sup>b,c</sup>	30 (1-70) <sup>b,c</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	62,5 (25-98) <sup>b,c</sup>
<b>INRA 96</b>	50 (2-80) <sup>c</sup>	40 (1-75) <sup>c</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	50 (20-98) <sup>c</sup>

<b>H48</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	22,5 (2-70) <sup>a</sup>	17,5 (1-65) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	77,5 (30-98) <sup>a</sup>
<b>EquiPro</b>	25 (0-65) <sup>a</sup>	20 (0-60) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	75 (35-100) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	30 (2-65) <sup>a</sup>	22,5 (1-60) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	70 (35-98) <sup>a</sup>
<b>INRA 96</b>	45 (1-80) <sup>b</sup>	35 (0-75) <sup>b</sup>	10 (0-20) <sup>a</sup>	55 (20-99) <sup>b</sup>

#### **4.3.4 Konfektionierung 3 (HZ 333 5 % SP)**

Bei dieser Konfektionierung wurde nach einer hochkonzentrierten Lagerung der Verdüner mit einem Anteil von 5 % autologem SP hinzugeben, so dass eine Konzentration von 25 Mio. Spermien/ml entstand. Zum Zeitpunkt 0 war lediglich festzustellen, dass INRA 96 zu einer signifikant besseren Vorwärtsmotilität ( $p = 0,0193$ ) und tendenziell besseren Gesamtmotilität ( $p = 0,0577$ ) führte als EquiPro. Sonst zeigten sich noch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verdünnern.

Nach 24 und 48 h führte die Verwendung von INRA 96 zu einer signifikant höheren Gesamt- und Vorwärtsmotilität als die Verwendung von EquiPro ( $p < 0,05$ ).

Nach 24 h führte Gent ebenfalls zu einer besseren Gesamt- und Vorwärtsmotilität sowie zu weniger unbeweglichen Spermien als EquiPro ( $p < 0,05$ ). Auch nach 48 h war bei Gent die Vorwärtsmotilität signifikant höher ( $p = 0,0446$ ) und der Anteil der unbeweglichen Spermien tendenziell niedriger ( $p = 0,0708$ ) als bei EquiPro.

Nach 24 h führte INRA 96 tendenziell zu einer besseren Gesamtmotilität ( $p = 0,0924$ ) und Vorwärtsmotilität ( $p = 0,0912$ ) als BotuSemen. Nach 48 h waren die Gesamtmotilität ( $p = 0,0186$ ) und die Vorwärtsmotilität ( $p = 0,0137$ ) bei INRA 96 signifikant besser als bei Verwendung von BotuSemen. Der Anteil unbeweglicher Spermien war bei BotuSemen nach 48 h signifikant höher als bei INRA 96 ( $p = 0,0186$ ).

Der Anteil der ortsbeweglichen Spermien wurde im gesamten Untersuchungszeitraum nicht durch den Verdüner beeinflusst.

Für diese Art der Samenaufbereitung erwies sich INRA 96 als besonders geeignet, jedoch ließ sich auch mit Gent die Motilität gut erhalten (Tabelle 16).

*Tabelle 16: Vergleich von Gesamtmotilität (GM), Vorwärtsmotilität (V), Ortsmotilität (O) und dem Anteil unbeweglicher Spermien (U) bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektio- nierung „HZ 333 5 % SP“ nach 0 h (H0), 24 h (H24) und 48 h (H48) gekühlter Lagerung. Angabe der Medianwerte sowie Minimum- und Maximumwerte in Klammern (Min-Max) aus 48 gewonnenen Samenproben. Identische hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Spalte zeigen an, dass es keine signifikanten Motilitätsunterschiede zwischen den Verdünnern gab.*

<b>H0</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	55 (5-80) <sup>a</sup>	42,5 (4-75) <sup>a,b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	45 (20-95) <sup>a</sup>
<b>EquiPro</b>	50 (2-80) <sup>a</sup>	40 (1-70) <sup>a</sup>	5 (0-30) <sup>a</sup>	50 (20-98) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	55 (5-80) <sup>a</sup>	45 (5-70) <sup>a,b</sup>	5 (0-25) <sup>a</sup>	45 (20-95) <sup>a</sup>
<b>INRA 96</b>	65 (10-85) <sup>a</sup>	55 (10-75) <sup>b</sup>	5 (0-15) <sup>a</sup>	35 (15-90) <sup>a</sup>

<b>H24</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	37,5 (5-80) <sup>a,b</sup>	27,5 (3-75) <sup>a,b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	62,5 (20-95) <sup>a,b</sup>
<b>EquiPro</b>	30 (0-75) <sup>a</sup>	20 (0-70) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	70 (25-100) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	47,5 (3-80) <sup>b</sup>	30 (2-75) <sup>b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	52,5 (20-97) <sup>b</sup>
<b>INRA 96</b>	50 (3-80) <sup>b</sup>	40 (2-75) <sup>b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	50 (20-97) <sup>b</sup>

<b>H48</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	25 (3-75) <sup>a</sup>	20 (2-70) <sup>a,b</sup>	5 (1-20) <sup>a</sup>	75 (25-97) <sup>a</sup>
<b>EquiPro</b>	20 (0-70) <sup>a</sup>	15 (0-65) <sup>a</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	80 (30-100) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	30 (2-70) <sup>a,b</sup>	25 (0-60) <sup>b,c</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	70 (30-98) <sup>a,b</sup>
<b>INRA 96</b>	40 (1-80) <sup>b</sup>	35 (0-75) <sup>c</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	60 (20-99) <sup>b</sup>

#### **4.3.5 Konfektionierung 3 (HZ 333 20 % SP)**

Bei dieser Konfektionierung wurde nach einer hochkonzentrierten Lagerung der Verdünner mit einem Anteil von 20 % autologem SP hinzugefügt, so dass eine Konzentration von 25 Mio. Spermien/ml entstand. Zum Zeitpunkt 0 war bloß festzustellen, dass INRA 96 zu einer signifikant besseren Vorwärtsmotilität ( $p = 0,0089$ ) und tendenziell besseren Gesamtmotilität ( $p = 0,0582$ ) führte als EquiPro. Andere signifikante Unterschiede zeigten sich bei der ersten Analyse noch nicht.

Nach einer 24-stündigen Lagerung führte INRA 96 zu einer signifikant höheren Gesamtmotilität ( $p = 0,0073$ ) und Vorwärtsmotilität ( $p = 0,0026$ ) sowie zu einem niedrigeren Anteil unbeweglicher Spermien ( $p = 0,0073$ ) als EquiPro. Nach 48 h waren die Gesamt- und Vorwärtsmotilität bei INRA 96 signifikant höher als bei Gent und EquiPro ( $p < 0,05$ ) sowie tendenziell höher als bei BotuSemen (GM:  $p = 0,0558$ , V:  $p = 0,0501$ ). Der Anteil unbeweglicher Spermien war nach 48 h bei INRA 96 signifikant niedriger als bei Gent ( $p = 0,0439$ ) und EquiPro ( $p = 0,0028$ ) sowie tendenziell niedriger als bei BotuSemen ( $p = 0,0519$ ).

Gent führte nach 24 h zu einer signifikant besseren Vorwärtsmotilität ( $p = 0,0241$ ) und tendenziell weniger unbeweglichen Spermien als EquiPro ( $p = 0,0594$ ).

Der Anteil der ortsbeweglichen Spermien wurde durch den Verdünner nicht beeinflusst.

Bei dieser Art der Konfektionierung war INRA 96 von allen getesteten Verdünnern am besten in der Lage, die Spermienmotilität über 48 h zu erhalten (Tabelle 17).



*Tabelle 17: Vergleich von Gesamtmotilität (GM), Vorwärtsmotilität (V), Ortsmotilität (O) und dem Anteil unbeweglicher Spermien (U) bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektio- nierung „HZ 333 20 % SP“ nach 0 h (H0), 24 h (H24) und 48 h (H48) gekühlter Lagerung. Angabe der Medianwerte sowie Minimum- und Maximumwerte in Klammern (Min-Max) aus 48 gewonnenen Samenproben. Identische hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Spalte zeigen an, dass es keine signifikanten Motilitätsunterschiede zwischen den Verdünnern gab.*

<b>H0</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	52,5 (5-80) <sup>a</sup>	40 (5-70) <sup>a,b</sup>	10 (0-30) <sup>a</sup>	47,5 (20-95) <sup>a</sup>
<b>EquiPro</b>	50 (3-80) <sup>a</sup>	40 (2-70) <sup>a</sup>	10 (0-30) <sup>a</sup>	50 (20-97) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	50 (5-80) <sup>a</sup>	45 (5-75) <sup>a,b</sup>	5 (0-25) <sup>a</sup>	50 (20-95) <sup>a</sup>
<b>INRA 96</b>	65 (10-85) <sup>a</sup>	50 (10-75) <sup>b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	35 (15-90) <sup>a</sup>

<b>H24</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	32,5 (5-75) <sup>a,b</sup>	25 (3-70) <sup>a,b</sup>	5 (0-20) <sup>a</sup>	67,5 (25-95) <sup>a,b</sup>
<b>EquiPro</b>	30 (0-70) <sup>a</sup>	20 (0-65) <sup>a</sup>	5 (0-30) <sup>a</sup>	70 (30-100) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	50 (2-80) <sup>a,b</sup>	30 (1-75) <sup>b</sup>	5 (0-25) <sup>a</sup>	50 (20-98) <sup>a,b</sup>
<b>INRA 96</b>	50 (3-75) <sup>b</sup>	40 (1-70) <sup>b</sup>	10 (0-25) <sup>a</sup>	50 (25-97) <sup>b</sup>

<b>H48</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	27,5 (3-75) <sup>a,b</sup>	20 (2-70) <sup>a,b</sup>	5 (1-20) <sup>a</sup>	72,5 (25-97) <sup>a,b</sup>
<b>EquiPro</b>	25 (0-70) <sup>a</sup>	15 (0-65) <sup>a</sup>	5 (0-30) <sup>a</sup>	75 (30-100) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	30 (2-70) <sup>a</sup>	20 (0-65) <sup>a</sup>	7,5 (0-30) <sup>a</sup>	70 (30-98) <sup>a</sup>
<b>INRA 96</b>	40 (1-80) <sup>b</sup>	30 (0-70) <sup>b</sup>	10 (0-25) <sup>a</sup>	60 (20-99) <sup>b</sup>

#### **4.3.6 Konfektionierung 3 (HZ 333 80 % SP)**

Bei dieser Konfektionierung wurde nach einer hochkonzentrierten Lagerung der Verdüner mit einem Anteil von 80 % autologem SP hinzugeben, so dass eine Konzentration von 25 Mio. Spermien/ml entstand. Direkt nach der Verdünnung (H0) waren die Unterschiede zwischen den Verdünnern gering. Es fiel nur auf, dass INRA 96 zu einer signifikant besseren Vorwärtsmotilität führte als EquiPro ( $p = 0,0174$ ).

Nach 24 und 48 h Lagerung war sowohl die Gesamt- als auch die Vorwärtsmotilität bei Verwendung von INRA 96 signifikant höher als bei Verwendung von EquiPro ( $p < 0,05$ ). Die Anzahl der unbeweglichen Spermien war bei EquiPro nach 24 und 48 h signifikant größer als bei INRA 96 ( $p < 0,05$ ).

Bei einer 48-stündigen Lagerung führte INRA 96 auch zu einer signifikant besseren Gesamtmotilität ( $p = 0,0127$ ) und Vorwärtsmotilität ( $p = 0,0046$ ) als Gent. Die Anzahl der unbeweglichen Spermien war bei Gent signifikant höher nach 48 h im Vergleich zu INRA 96 ( $p = 0,0127$ ).

BotuSemen führte nach einer 48-stündigen Lagerung ebenfalls zu einer signifikant besseren Gesamtmotilität als Gent ( $p = 0,0284$ ). Auch bei der Vorwärtsmotilität ließ sich eine deutliche Tendenz erkennen ( $p = 0,0639$ ). Der Anteil der unbeweglichen Spermien war bei Gent zu diesem Zeitpunkt signifikant höher als bei BotuSemen ( $p = 0,0284$ ).

Die Ergebnisse zeigen, dass INRA 96 und BotuSemen bei einer 48-stündigen Lagerung besser die Motilität erhalten als Gent und EquiPro (Tabelle 18).

*Tabelle 18: Vergleich von Gesamtmotilität (GM), Vorwärtsmotilität (V), Ortsmotilität (O) und dem Anteil unbeweglicher Spermien (U) bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektio- nierung „HZ 333 80 % SP“ nach 0 h (H0), 24 h (H24) und 48 h (H48) gekühlter Lagerung. Angabe der Medianwerte sowie Minimum- und Maximumwerte in Klammern (Min-Max) aus 48 gewonnenen Samenproben. Identische hochgestellte Kleinbuchstaben in einer Spalte zeigen an, dass es keine signifikanten Motilitätsunterschiede zwischen den Verdünnern gab.*

<b>H0</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	50 (5-75) <sup>a</sup>	20 (2-60) <sup>a,b</sup>	20 (2-50) <sup>a</sup>	50 (25-95) <sup>a</sup>
<b>EquiPro</b>	45 (5-70) <sup>a</sup>	20 (2-60) <sup>a</sup>	20 (2-50) <sup>a</sup>	55 (30-95) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	50 (5-80) <sup>a</sup>	20 (1-65) <sup>a,b</sup>	20 (3-50) <sup>a</sup>	50 (20-95) <sup>a</sup>
<b>INRA 96</b>	55 (7-80) <sup>a</sup>	30 (2-65) <sup>b</sup>	20 (5-40) <sup>a</sup>	45 (20-93) <sup>a</sup>

<b>H24</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	32,5 (5-70) <sup>a,b</sup>	15 (2-55) <sup>a,b</sup>	15 (3-40) <sup>a</sup>	67,5 (30-95) <sup>a,b</sup>
<b>EquiPro</b>	25 (0-60) <sup>a</sup>	10 (0-45) <sup>a</sup>	15 (0-40) <sup>a</sup>	75 (40-100) <sup>a</sup>
<b>Gent</b>	30 (1-80) <sup>a,b</sup>	20 (0-65) <sup>a,b</sup>	15 (1-50) <sup>a</sup>	70 (20-99) <sup>a,b</sup>
<b>INRA 96</b>	40 (1-70) <sup>b</sup>	15 (0-50) <sup>b</sup>	15 (1-40) <sup>a</sup>	60 (30-99) <sup>b</sup>

<b>H48</b>	<b>GM (%)</b>	<b>V (%)</b>	<b>O (%)</b>	<b>U (%)</b>
<b>BotuSemen</b>	25 (3-65) <sup>a</sup>	10 (1-50) <sup>a,b</sup>	15 (2-35) <sup>a</sup>	75 (35-97) <sup>a</sup>
<b>EquiPro</b>	20 (0-50) <sup>b</sup>	5 (0-40) <sup>a</sup>	10 (0-30) <sup>a,b</sup>	80 (50-100) <sup>b</sup>
<b>Gent</b>	15 (1-70) <sup>b</sup>	5 (0-60) <sup>a</sup>	7,5 (1-50) <sup>b</sup>	85 (30-99) <sup>b</sup>
<b>INRA 96</b>	30 (0-70) <sup>a</sup>	10 (0-60) <sup>b</sup>	15 (0-30) <sup>a</sup>	70 (30-100) <sup>a</sup>

#### **4.3.7 Zusammenfassung Verdünner**

Direkt nach der Verdünnung (H0) führten alle Verdünner zu einer etwa gleich guten Spermienmotilität. Erst nach 24 bzw. 48 h wurden größere Unterschiede zwischen den Verdünnern deutlich. Dabei fiel auf, dass INRA 96 bei allen Konfektionierungsformen am besten in der Lage war, die Spermienmotilität zu bewahren. Gent hat sich ebenfalls als guter motilitätserhaltender Verdünner herausgestellt. Einzige Ausnahme stellte die hochkonzentrierte Lagerung mit dem Hinzufügen von 80 % SP im Verdünner dar. Hier sollte Gent nicht als Verdünner erster Wahl eingesetzt werden, sondern INRA 96 oder BotuSemen vorgezogen werden. EquiPro war bei allen durchgeführten Konfektionierungen am wenigsten für die Herstellung von Kühltaschen geeignet.

#### 4.4 Hengstspezifische Einflüsse auf die Spermienmotilität

In den nachfolgenden Abbildungen (Abbildung 5 - 12) ist die Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen der einzelnen Hengste nach einer 48-stündigen Lagerung bei 5 °C dargestellt. Die Vorwärtsmotilität nach dieser längeren Lagerung lässt einen Rückschluss zu über die Eignung des Spermas für den Kühlsamenversand. Die Vorwärts- und auch die Gesamtmotilität zu den übrigen Untersuchungszeitpunkten sind in den Tab. 19 – 34 (Anhang) dargestellt.

Zwischen den Hengsten ließen sich deutliche Unterschiede in der Spermienmotilität feststellen. Diese waren bereits nach der Samenentnahme im Nativejakulat vorhanden (s. 4.1.2.1) und blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum von 48 h bestehen.

Trotz unterschiedlicher Spermaqualität bei den einzelnen Hengsten war bei allen getesteten Tieren eine hochkonzentrierte Lagerung ohne Motilitätsverlust im Vergleich zu den Standardmethoden möglich. Ein Versand der Spermien bei 333 Mio./ml kann daher sowohl bei Hengsten mit guter als auch bei Hengsten mit schlechter Samenqualität durchgeführt werden.

Der Einfluss der SP-Konzentration im Rahmen der hochkonzentrierten Lagerung wirkte sich bei allen Hengsten ähnlich aus. Meistens gab es keine signifikanten Unterschiede in Portionen ohne SP und Portionen mit einem geringen Anteil von 5 oder 20 %. Nur bei einzelnen Hengsten und unter Verwendung bestimmter Verdünner ließen sich geringgradige Unterschiede feststellen. So eignete sich bei Hengst 3 und Verwendung von EquiPro eine Konzentration von 0 oder 5 % besser als 20 % SP. Bei Hengst 6 und Verwendung von INRA 96 war die Motilität nach 48 h ebenfalls höher, wenn kein SP anstatt 20 % SP verwendet wurde. Diese Unterschiede sind jedoch nur minimal, so dass bei allen Hengsten eine Konzentration von 0 - 20 % als optimal betrachtet werden kann.

Zudem konnte beobachtet werden, dass bei allen Hengsten eine hohe SP-Konzentration von 80 % einen negativen Einfluss auf die Spermienmotilität ausübte. Unabhängig von der Samenqualität sollte daher ein zu großer SP-Anteil in der Besamungsportion vermieden werden.

Bei Vergleich der einzelnen Verdünner fiel auf, dass INRA 96 bei allen Hengsten die Spermienmotilität besonders gut erhielt, während EquiPro zu deutlich schlechteren Ergebnissen führte. Die Zusammensetzung von INRA 96 erfüllt daher die Ansprüche aller Hengste, unabhängig von deren Samenqualität, sehr gut.

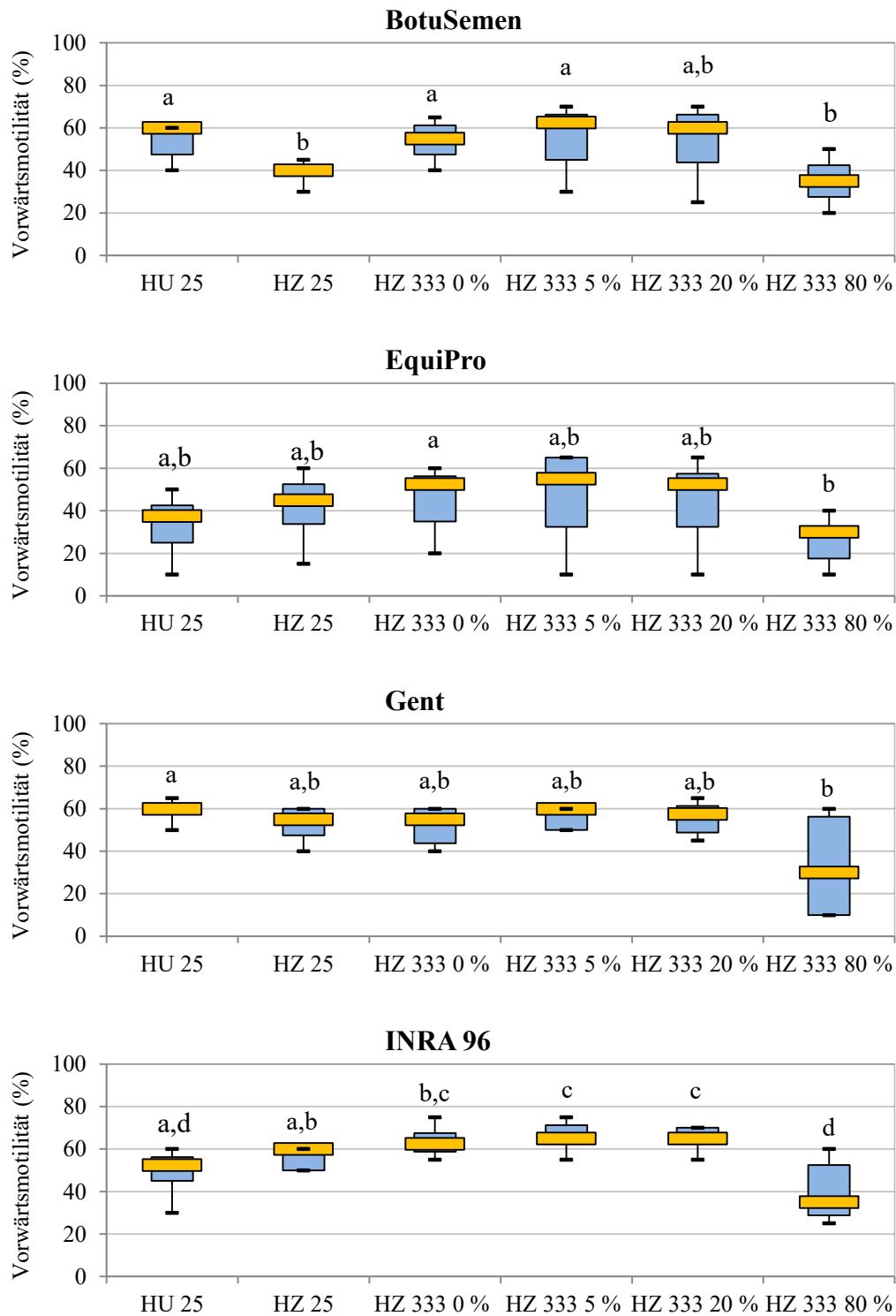


Abbildung 5: Vorwärtsmotilität von **Hengst 1** in 6 Samenproben nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. Identische Kleinbuchstaben zeigen an, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.

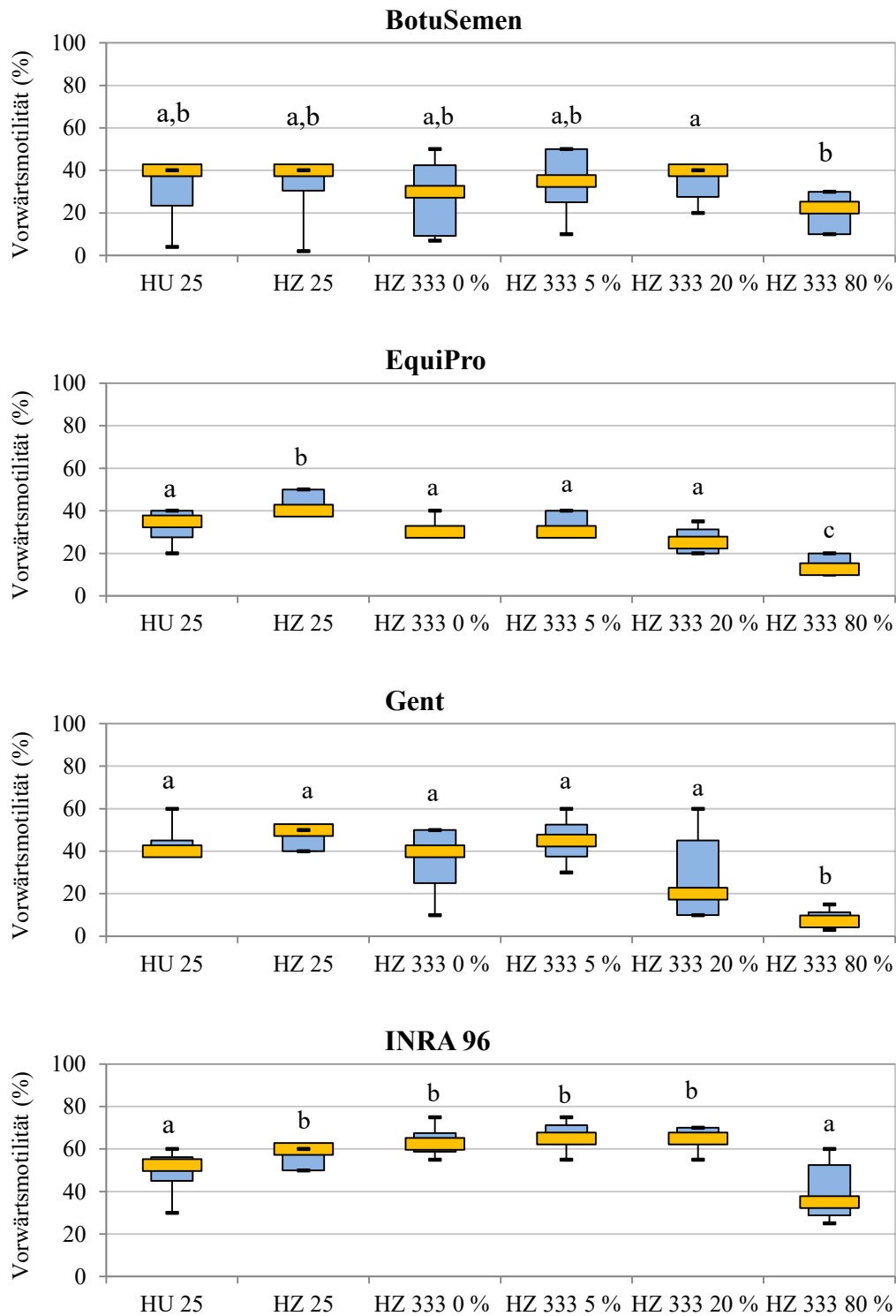


Abbildung 6: Vorwärtsmotilität von **Hengst 2** in 6 Samenproben nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. Identische Kleinbuchstaben zeigen an, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.

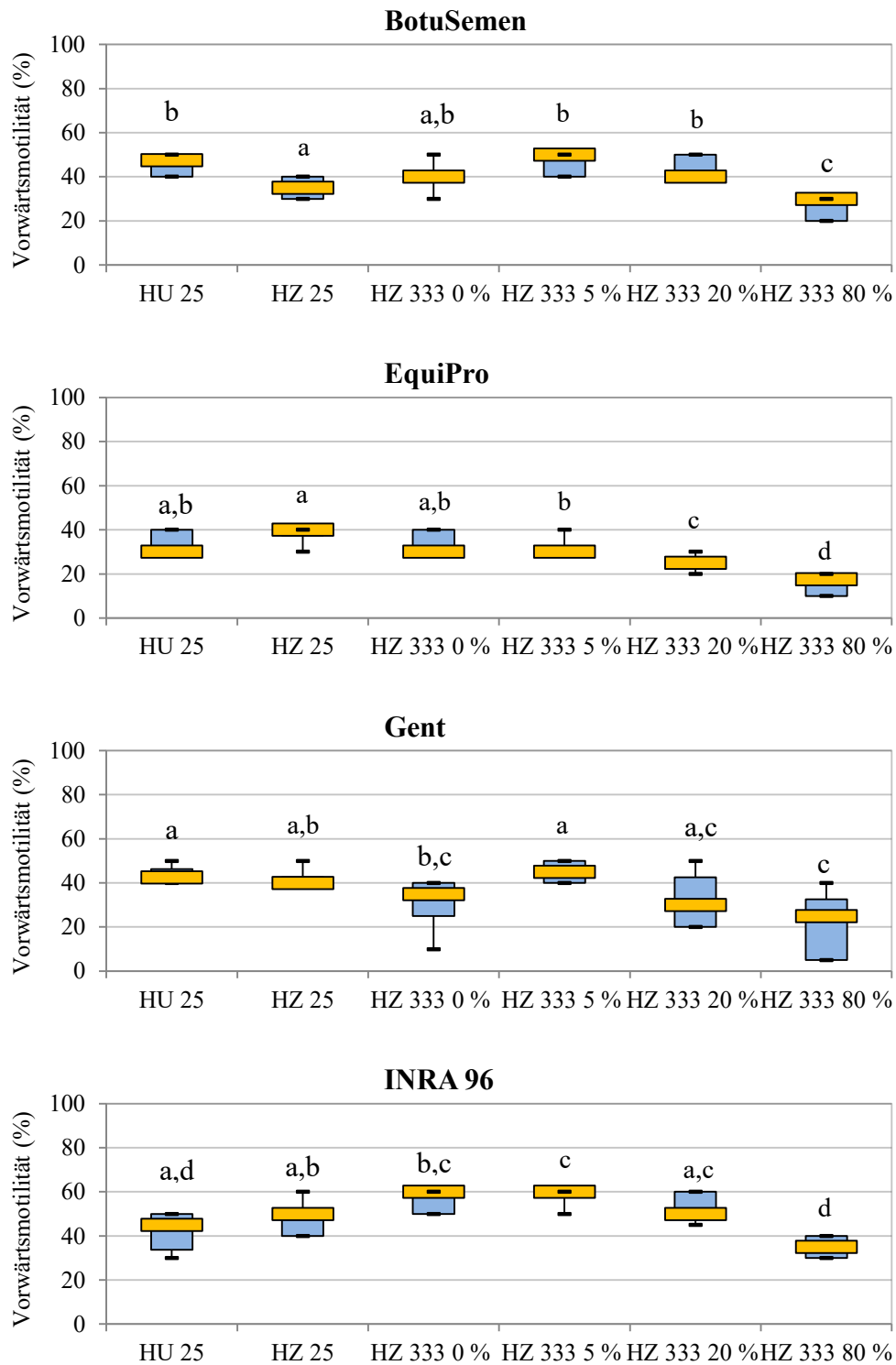


Abbildung 7: Vorwärtsmotilität von **Hengst 3** in 6 Samenproben nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. Identische Kleinbuchstaben zeigen an, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.



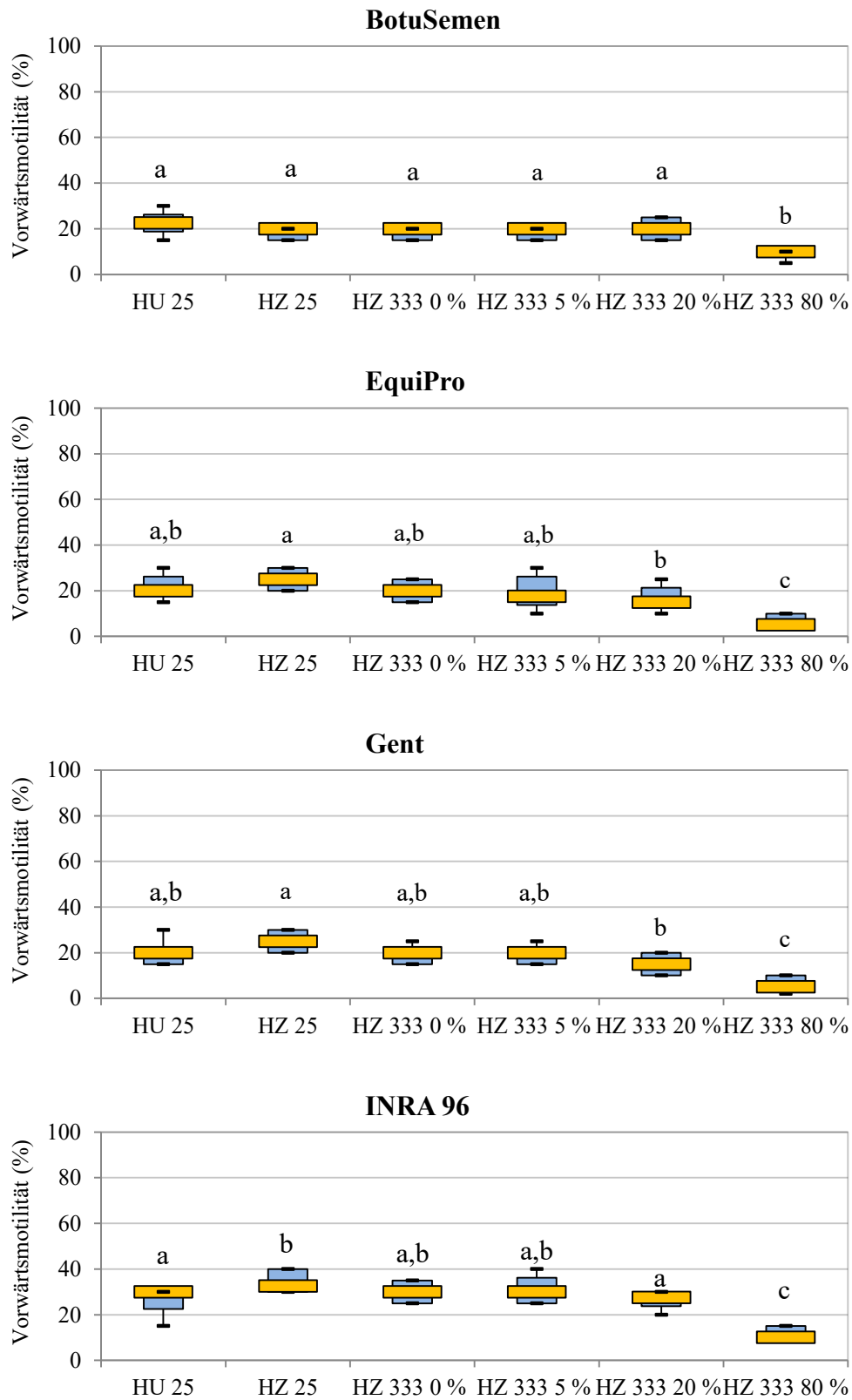


Abbildung 8: Vorwärtsmotilität von **Hengst 4** in 6 Samenproben nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. Identische Kleinbuchstaben zeigen an, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.

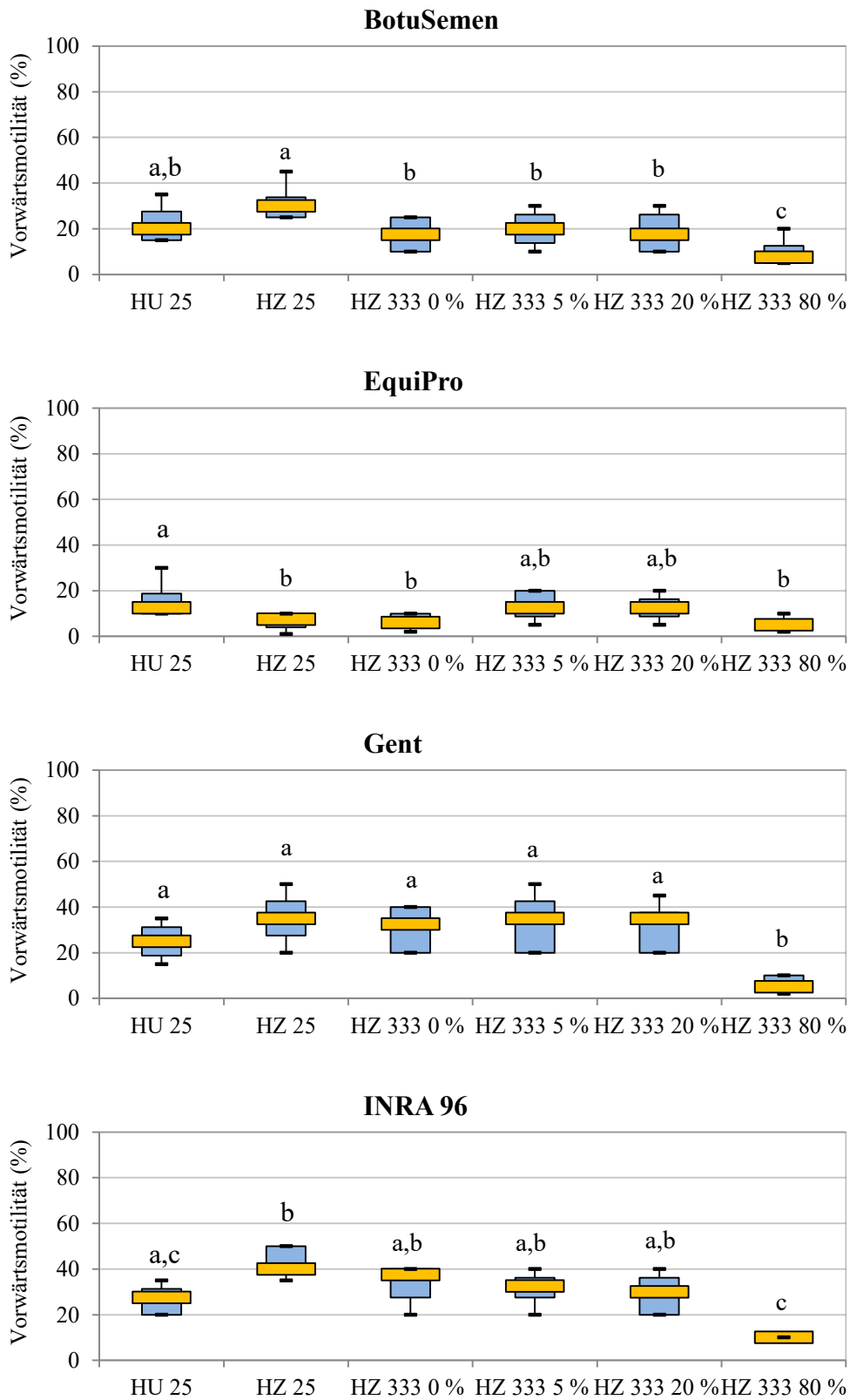


Abbildung 9: Vorwärtsmotilität von **Hengst 5** in 6 Samenproben nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. Identische Kleinbuchstaben zeigen an, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.

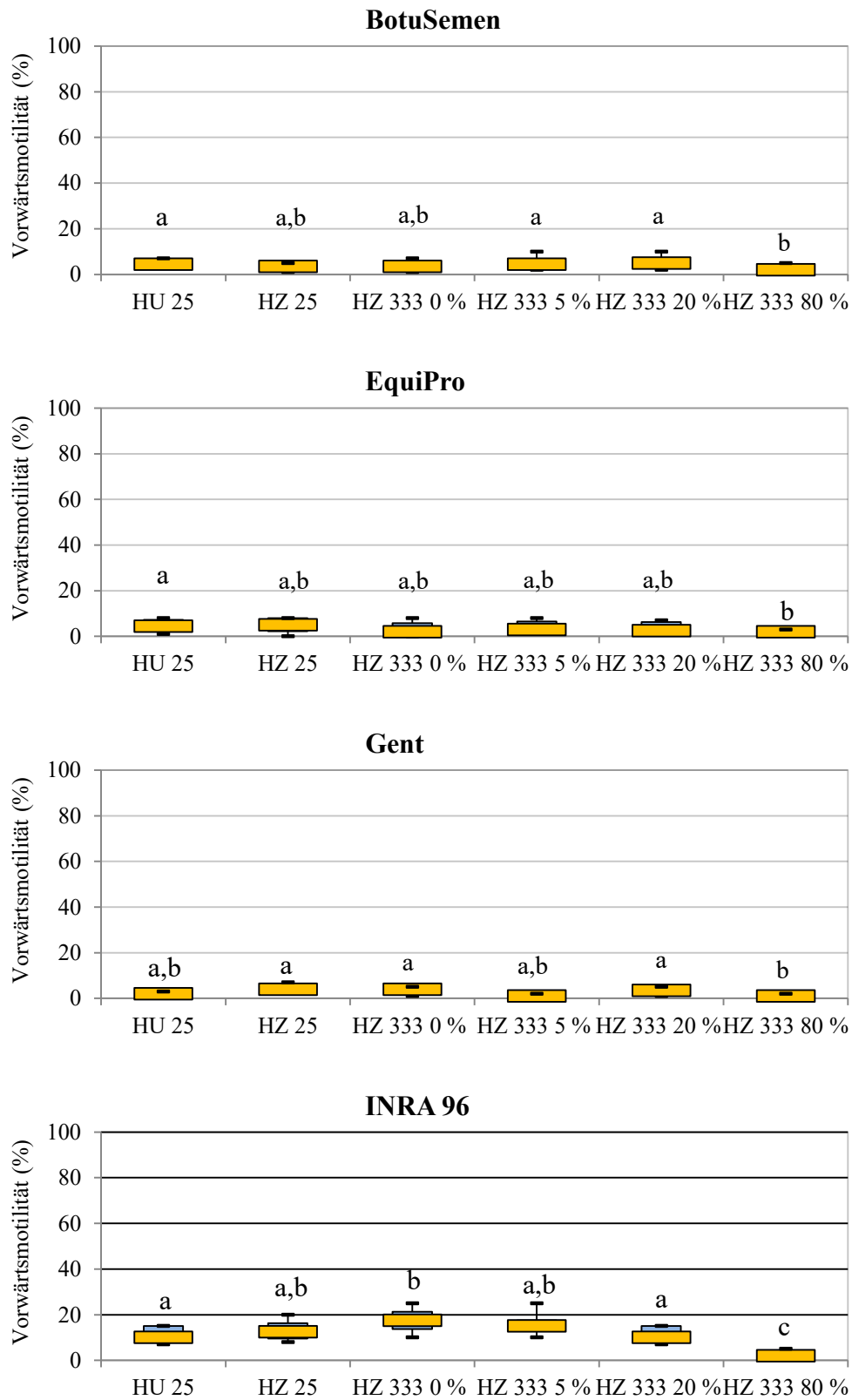


Abbildung 10: Vorwärtsmotilität von **Hengst 6** in 6 Samenproben nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. Identische Kleinbuchstaben zeigen an, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.

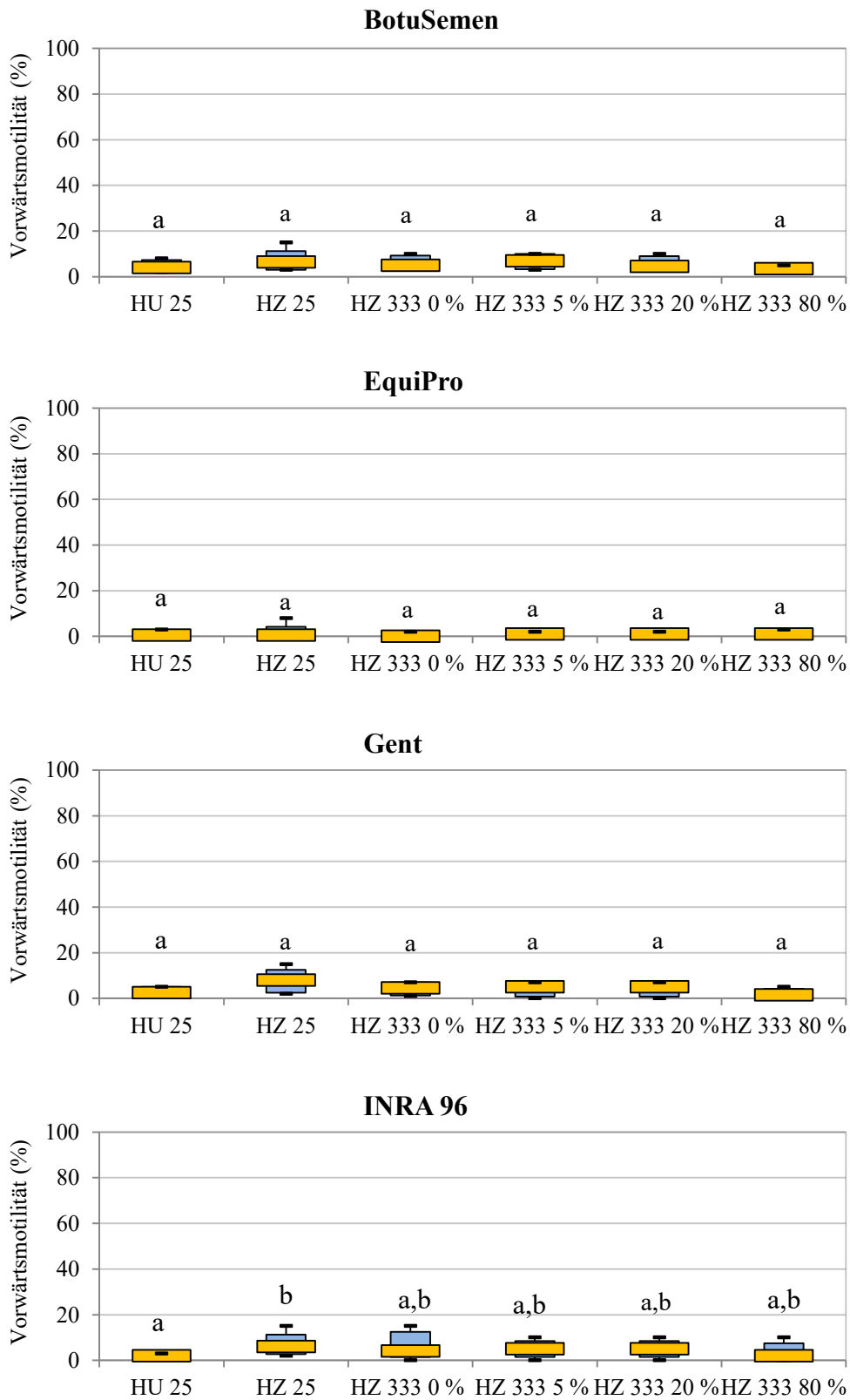


Abbildung 11: Vorwärtsmotilität von **Hengst 7** in 6 Samenproben nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. Identische Kleinbuchstaben zeigen an, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.

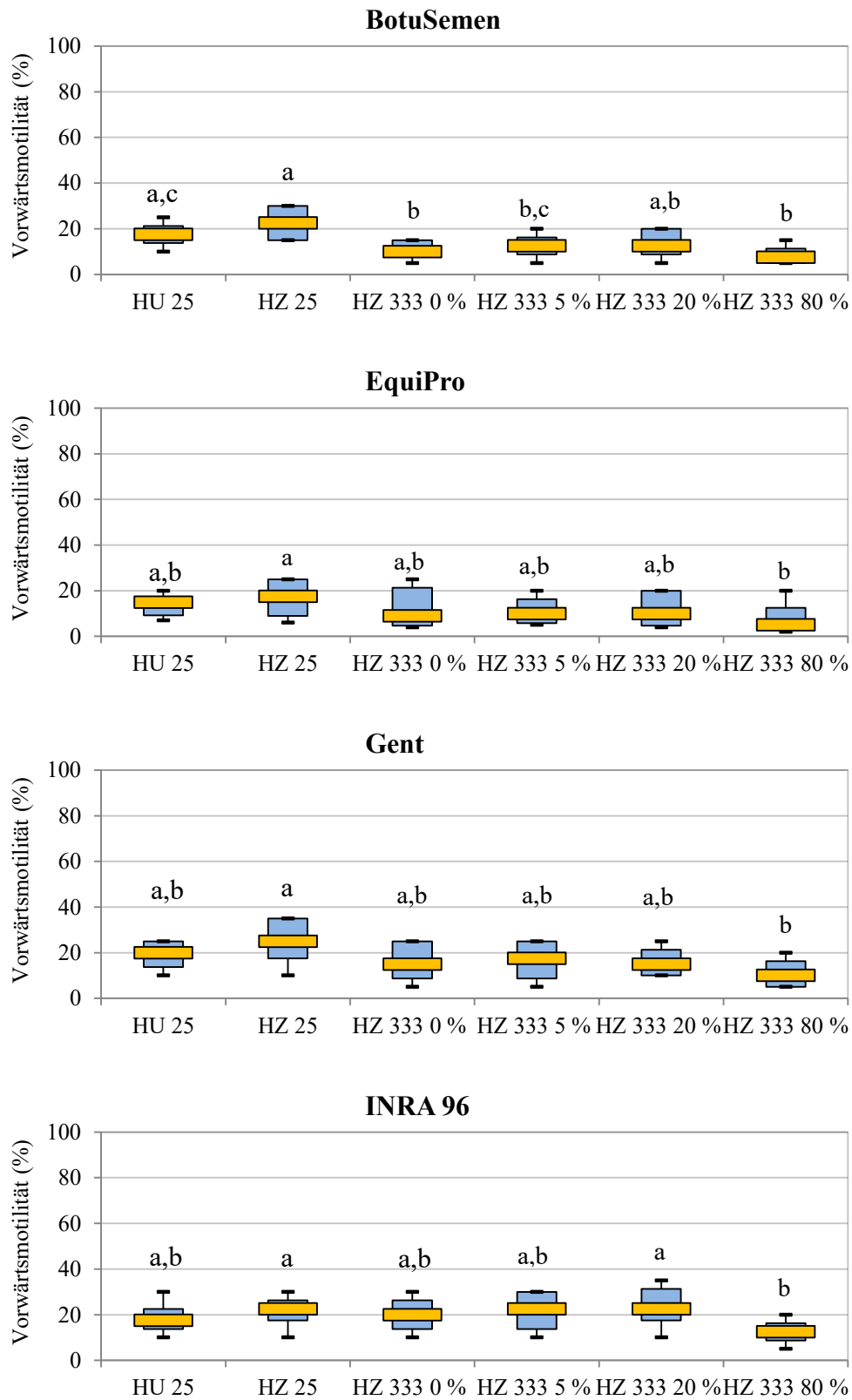


Abbildung 12: Vorwärtsmotilität von **Hengst 8** in 6 Samenproben nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. Identische Kleinbuchstaben zeigen an, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konfektionierungen gab.

## 5. Diskussion

### 5.1 Einfluss der Konfektionierung auf die Spermienmotilität

Die vorliegende Studie zeigt, dass die starke Konzentrierung von Hengstsamen auf 333 Mio. Spermien/ml eine geeignete Methode zur volumensparenden Kühltaschenlagerung darstellt. Die Spermienmotilität bleibt genauso gut erhalten wie bei konventionell gelagertem Samen mit niedrigerer Dichte. Diese neue Erkenntnis könnte in Zukunft dazu beitragen, den Kühltaschenversand platzsparender und somit kostengünstiger zu gestalten.

Die Herstellung einer hochkonzentrierten Besamungsportion ist einfach durchzuführen bei Beachtung einiger Regeln. Nach den Mindestanforderungen für Kühltaschen muss eine Besamungsportion 500 Mio. vorwärtsbewegliche Spermien enthalten (AURICH, 2009). Würden alle Spermien eine Vorwärtsbewegung zeigen, müsste bei einer Konzentration von 333 Mio. Spermien/ml lediglich ein Volumen von 1,5 ml versandt werden. Dies bedeutet eine Volumeneinsparung von 92,5 % im Vergleich zu Konfektionierung 1 und 2, wo bei gleicher Spermienanzahl ein Volumen von 20 ml verschickt werden müsste. Da in der Regel aber nicht alle Spermien vorwärtsbeweglich sind, muss das Volumen je nach Samenqualität etwas erhöht werden. Bei einer Samenportion, die gerade eben noch die Mindestanforderungen von 50 % progressiv beweglichen Spermien erfüllt, wäre eine Verdopplung des Volumens empfehlenswert. 500 Mio. vorwärtsbewegliche Spermien wären dann in einer Portion von 3 ml enthalten, so dass immer noch eine deutliche Volumeneinsparung im Verhältnis zu den traditionellen Samenaufbereitungsmethoden erreicht wird.

Kurz vor der Besamung müsste lediglich so viel Verdünner hinzugefügt werden, dass ein besamungsübliches Gesamtvolumen von 20 ml entsteht. Zu bedenken ist jedoch, dass bei Versand eines höheren Volumens als 1,5 ml die Dichte nach der Verdünnung größer ist als 25 Mio. Spermien/ml. Wird beispielsweise eine Portion mit 3 ml verschickt, die anschließend auf 20 ml verdünnt wird, so beträgt die Endkonzentration 50 Mio. Spermien/ml. Dies sollte jedoch eine qualitativ genauso hochwertige Besamungsportion ergeben, da sich diese höhere Dichte ebenfalls vielfach bewährt hat und routinemäßig häufig zum Einsatz kommt.

Der Verdünner, der nach der Lagerung hinzugefügt wurde, ist in dieser Studie mit unterschiedlichen SP-Konzentrationen zur Ermittlung des optimalen SP-Gehalts in einer Besamungsportion versetzt worden. Bei den meisten Hengsten ließ sich kein signifikanter Motilitätsunterschied zwischen 0, 5 und 20 % SP feststellen. Der Anteil von 80 % SP führte hingegen zu einer signifikant schlechteren Vorwärtsmotilität bei gleichzeitigem Anstieg der

ortsbeweglichen Spermien. Auch in früheren Studien erhielten geringe SP-Konzentrationen von 5 - 20 % die Motilität am besten, während höhere SP-Anteile die Beweglichkeit negativ beeinflussten (PICKETT et al., 1975, JASKO et al., 1992a, PRUITT et al., 1993, BRINSKO et al., 2000).

Es sei erwähnt, dass in der vorliegenden Arbeit auch die Proben mit 0 % SP im Verdünner einen geringen SP-Anteil besaßen. Dieser stammte aus dem Überstand, der nach der Zentrifugation bei den Spermien belassen wurde, um die Spermienverluste beim Absaugvorgang zu minimieren. Somit enthielten alle Proben bereits vor der Lagerung eine sehr geringe SP-Konzentration. Eine vollständige Entfernung des SP wäre zum einen technisch sehr aufwendig und zum anderen auch nicht erstrebenswert gewesen, da ein kleiner SP-Gehalt während der Lagerung die Spermiovitalität fördert (SIEME, 2009). Dafür verantwortlich sind unter anderem proteinöse Komponenten im SP, die durch ihre Wirkung als Dekapazitationsfaktoren eine prämatüre Kapazitation während der Lagerung verhindern (MUINO-BLANCO et al., 2008). Zudem stellen die Proteine einen guten Schutz vor Kälteschäden während der Kühlung dar (BARRIOS et al., 2000). Da das SP aber auch schädliche Faktoren beinhaltet und die Zahl an reaktiven Sauerstoffspezies und Chromatinschäden erhöhen kann, sollte der SP-Gehalt während des Versands nur minimal sein (MORRELL et al., 2014).

Aufgrund von vielen nützlichen Eigenschaften des SP im weiblichen Genitaltrakt und der Fähigkeit zur Optimierung der Trächtigkeitsergebnisse beizutragen, wurde in der vorliegenden Arbeit der SP-Anteil nach der Lagerung erhöht. Die seminalen Proteine üben beispielsweise einen positiven Einfluss auf den Verlauf der uterinen Immunantwort aus durch eine Verkürzung der besamungsinduzierten Entzündung (TROEDSSON et al., 2001). Auch bei der Etablierung eines Spermienreservoirs im Eileiter sowie der Interaktion der Gameten und deren Fusion spielt das SP eine Rolle (TÖPFER-PETERSEN, 1999). Eine Beeinflussung des Ovulationszeitpunktes durch einen „ovulationsinduzierenden Faktor“ im equinen SP wird ebenfalls vermutet (BOGLE et al., 2011). Infolge dieser vielfältigen positiven Eigenschaften und der Ergebnisse der vorliegenden Studie kann ein SP-Anteil von bis zu 20 % in der Besamungsportion empfohlen werden.

Sehr hohe SP-Anteile von 80 % sollten hingegen vermieden werden, da diese die Vorwärtsmotilität mindern. Eine Ursache für den negativen Einfluss eines großen SP-Anteils ist der damit einhergehende hohe Gehalt an schädlichen SP-Faktoren. Ein Enzym im SP, das die Motilität der Spermien hemmen kann und daher nicht in hoher Konzentration vorkommen sollte, ist beispielsweise die Lipase (CARVER und BALL, 2002). Auch bestimmte Proteine,

wie Kallikrein-1E2 (KLK2), Clusterin, seminal plasma protein 1 (SP-1) und seminal plasma protein 2 (SP-2) können die Fertilität negativ beeinflussen (NOVAK et al., 2010).

Neben der SP-Konzentration spielt auch der Zeitpunkt der SP-Zugabe und somit die Kontaktdauer zwischen Spermien und SP eine Rolle für die Qualität einer Besamungsportion. Während in früheren Studien das SP meist vor der Lagerung hinzugegeben wurde (PICKETT et al., 1975, JASKO et al., 1992a, BRINSKO et al., 2000), empfehlen aktuellere Studien das SP erst kurz vor der Besamung hinzuzufügen (MORRELL et al., 2010, MORRELL et al., 2014). Laut MORRELL et al. (2010) übt das SP insbesondere in den ersten Stunden einen motilitätssteigernden Einfluss auf die Spermien aus, weshalb in der Studie empfohlen wird das SP spätmöglichst zu den Spermien zu geben. Da auch die Stabilität der Plasmamembran höher (BARRIER-BATTUT et al., 2013) und die Zahl der Chromatinschäden geringer ist bei Entfernung des SP vor dem Versand (MORRELL et al., 2014), wurde die Kontaktzeit zwischen Spermien und SP in der vorliegenden Arbeit sehr kurz gehalten und der Großteil des SP nur 10 min vor der Motilitätsanalyse hinzugegeben.

Eine Steigerung der Motilität durch das Hinzufügen von SP nach der Lagerung, wie es von MORRELL et al. (2010) vermutet wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit nur vereinzelt in geringfügigem Umfang beobachtet werden. Meist gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen Proben, denen kein SP zugefügt wurde und denen mit einem geringen SP-Anteil von 5 oder 20 %. Ursache für die unterschiedlichen Beobachtungen könnte die Anwendung eines spermienselektiven Aufbereitungsverfahrens bei MORRELL et al. (2010) gewesen sein. Das auch als „single layer centrifugation (SLC)“ bezeichnete Verfahren führt zur Selektion der besonders vitalen Samenzellen mit guter Motilität und Chromatinintegrität, die möglicherweise anders auf das Hinzufügen von SP reagieren als die gesamte Spermienpopulation, die in dieser Studie untersucht wurde.

Obwohl in dem vorliegenden Versuch und auch in der Arbeit von BARRIER-BATTUT et al. (2013) kein unmittelbarer Anstieg der Motilität durch das Hinzufügen von SP nach der Lagerung beobachtet werden konnte, kann die späte SP-Zugabe dennoch sinnvoll sein, um Volumen während des Versandes zu reduzieren und eine bessere DNA-Integrität sowie weniger Chromatinschäden zu erzielen (MORRELL et al., 2014). Der vermehrte Aufwand vor der Besamung durch das Hinzufügen von SP zum Verdünner und die nicht eindeutig nachweisbaren Motilitätsvorteile bei einer späten SP-Zugabe rechtfertigen jedoch eventuell auch das Belassen eines gewissen SP-Anteils bereits vor dem Versand.



Nach der Diskussion einer geeigneten SP-Konzentration und dem besten Zeitpunkt für die SP-Zugabe stellt sich auch für den Verdünner die Frage, welches Volumen wann hinzugegeben werden sollte. Das Verdünnervolumen korreliert in dieser Studie negativ mit der SP-Konzentration. So führt ein hoher Anteil von 80 % SP zwangsläufig zu einem geringen Verdünner-Gehalt von nur 20 %. Ein Grund für die schlechte Motilität der Proben mit 80 % SP kann, neben dem hohen Anteil schädlicher SP-Faktoren, auch ein zu geringes Verdünnervolumen sein. Wird nur sehr wenig Verdünner hinzugefügt, so kommt es in der Besamungsportion zu einem Mangel an Spermien ernährenden Substanzen. Ein Energiedefizit in den Samenzellen führt ebenfalls zu einer verminderten Beweglichkeit (PONGLOWHAPAN et al., 2004). Das Hinzufügen eines ausreichenden Verdünnervolumens ist daher ein wichtiges zu erfüllendes Kriterium für die Erhaltung der Spermiovitalität. Bei der Konservierung von Hengstsamen auf traditionelle Weise wird mindestens eine 1 + 2 Verdünnung (1 Teil Ejakulat + 2 Teile Verdünner) oder eine Verdünnung auf 25 Mio. Spermien/ml empfohlen (JASKO et al., 1991, VARNER et al. 1987). Diese Verdünnungsverhältnisse müssen offenbar jedoch noch nicht zwangsläufig während der Lagerung erfüllt werden. In der vorliegenden Studie blieb die Lebensfähigkeit der Spermien auch mit einer deutlich geringeren Verdünnerkonzentration erhalten. Die Begründung hierfür kann in der reversiblen Verlangsamung des Stoffwechsels und der Motilität während der Kühlung liegen. Die Spermien verharren durch die Temperaturenniedrigung auf 5 °C in einer Form der Anabiose (Kältestarre), in der sie nur wenig Energie verbrauchen (SIEME, 2009). Dies legt nahe, dass die Samenzellen erst nach der Kühlung den Großteil der Nährstoffe zur Reaktivierung aus dem Ruhezustand benötigen und somit das Hinzufügen von einem Großteil des Verdünners nach der Lagerung ausreichend ist.

Ein weiterer Grund für den Erhalt der Spermiovitalität trotz wenig Verdünner bzw. Energie während der Lagerung kann die hohe Konzentration des Samens sein. Diese versetzt die Spermien möglicherweise in einen ähnlichen Zustand wie im Nebenhoden. Dort werden die Samenzellen ebenfalls sehr dicht in kleinem Volumen gelagert und verharren zur Schonung der begrenzten Energiereserven in einem bewegungslosen Ruhestadium.

Im Idealfall sollte die Konfektionierungsmethode auch in Abhängigkeit vom verwendeten Verdünner gewählt werden, da Interaktionen zwischen dem SP und den verschiedenen Verdünnern auftreten. Bei einigen Verdünnern kann durch die Entfernung des SP vor der Lagerung die Motilität verbessert werden, während dies bei anderen Verdünnern keinen Vorteil birgt. Dies stellten schon PADILLA und FOOTE (1991) in einem Versuch fest, wo sich die Zentrifugation bei Verwendung von Kenney's Verdünner positiv und bei Verwendung eines modifizierten

Kenney's Verdünners (mit Tyrodes Medium) negativ auswirkte. Auch in dieser Arbeit ist die Auswirkung der Zentrifugation in Abhängigkeit vom Verdünner deutlich geworden. Von allen getesteten Verdünnern kam es durch die Zentrifugation nur bei INRA 96 zu einer signifikanten Verbesserung der Motilität. Sowohl die zentrifugierte Lagerung bei niedriger Dichte (HZ 25) als auch die hochkonzentrierte Lagerung (HZ 333 mit 0 und 5 % SP) waren bei INRA 96 der unzentrifugierten Lagerung (HU 25) vorzuziehen. Auch SACHER (2011) kam in seiner Arbeit zu dem Schluss, dass bei Verwendung von INRA 96 das SP vor der Lagerung zum Großteil entfernt werden sollte.

## **5.2 Einfluss des Verdünners auf die Spermienmotilität**

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht den großen Einfluss der Verdünner-Zusammensetzung auf die Erhaltung der Spermienmotilität im Rahmen der Kühlkonservierung. Insbesondere bei einer längeren Lagerung über 24 bzw. 48 h ließen sich deutliche Unterschiede zwischen den Verdünnern BotuSemen, EquiPro, Gent und INRA 96 feststellen. Bei der ersten Motilitätsbeurteilung (H0) hingegen führten alle Verdüner etwa zu der gleichen Beweglichkeit. Der Grund hierfür können die intrazellulären Energiereserven der Samenzellen sein, die dazu beitragen, dass die Spermien kurz nach der Samenentnahme noch nicht auf die Inhaltsstoffe im Verdünner angewiesen sind. Erst mit zunehmender Lagerungsdauer, wenn die limitierten internen Energiereserven zur Neige gehen, werden externe Energiequellen zur Aufrechterhaltung der Motilität immer wichtiger. Zum Erhalt der Spermiovitalität muss ein Verdünner daher über adäquate Energiesubstrate in Form verschiedener Zucker (z.B. Glukose, Fruktose) verfügen (PONGLOWHAPAN et al, 2004). Zudem muss er eine Stabilisierung von pH-Wert und Osmolalität, eine Hemmung des Keimwachstums, Schutz vor Temperaturveränderungen und die Neutralisation toxischer Stoffwechsel- und Autolyseprodukte gewährleisten (SIEME, 2009). Je besser ein Verdünner diese Kriterien erfüllt, umso höher ist der Anteil der lebens- und befruchtungsfähigen Spermien nach dem Versand. Qualitative Unterschiede zwischen Verdünnern können daher erst nach einer Lagerung über 24 oder besser 48 h beurteilt werden. Diese Beobachtung stimmt auch mit den Ergebnissen einer Studie von PAPA et al. (2014) überein, in der ebenfalls erst nach 24 h Motilitätsunterschiede zwischen den Verdünnern BotuSemen und INRA 96 auftraten.

INRA 96 hat sich als empfehlenswerter Verdünner herausgestellt, der bei jeder Form der Konfektionierung die Motilität über 48 h am besten erhalten hat. Bereits in anderen Studien war

INRA 96 sehr gut in der Lage die Spermienmotilität aufrecht zu erhalten (BATELLIER et al., 2001, LeFRAPPER et al., 2010, SACHER, 2011). Grund für die hohe Qualität des Verdünners ist unter anderem die Fraktionierung der Milch bei der Herstellung des Verdünners. Nur die für die Spermien protektiven Milchbestandteile (z.B. native Phosphocaseinate) gelangen in den Verdünner, während die schädlichen Bestandteile der Milch (z.B.  $\alpha$ -Lactalbumin) keine Verwendung finden (BATELLIER et al., 1997). Ein weiterer Vorteil des Verdünners besteht in der Möglichkeit den Samenversand auch bei einer Temperatur von 15 °C vornehmen zu können. Dies kann insbesondere bei Hengsten von Vorteil sein, deren Spermien sehr kälteschockempfindlich beim Herunterkühlen auf 5 °C reagieren (BATELLIER et al., 2001).

Gent war der einzige getestete eigelbhaltige Verdünner in dieser Studie. Er stellte sich neben INRA 96 als guter motilitätserhaltender Verdünner heraus. Ein positiver Einfluss von eigelbhaltigen Verdünnern auf die Spermienmotilität wurde schon in früheren Studien nachgewiesen (JASKO et al., 1992a, BEDFORD et al., 1995). Ursache hierfür sind die im Eigelb enthaltenen Low-Density Lipoproteins (LDL), die zu einer Stabilisierung der Spermienmembran und somit zu einem Schutz vor Kälteschäden beitragen (BERGERON und MANJUNATH, 2006). Es gibt jedoch eine Interaktion zwischen Eigelb und SP, die sich bei längerer Lagerung negativ auf die Spermienbeweglichkeit auswirkt (JASKO et al., 1992a). BEDFORD et al. (1995) stellten vor allem bei der Kombination von hohen Eigelb- und SP-Konzentrationen einen negativen Einfluss auf die Spermienmotilität fest. Der negative Einfluss eines großen SP-Anteils wurde auch in der vorliegenden Arbeit deutlich, wo das Hinzufügen von 80 % SP zu einer stark verminderten Spermienbeweglichkeit sowie zur Bildung von zahlreichen, kleinen Partikeln führte. Die Ursache für die Entstehung der Partikel konnte in dieser Studie noch nicht geklärt werden, jedoch scheinen die Partikel die Bewegung der Spermien einzuschränken und zu behindern. Um die negative Interaktion von Eigelb und SP zu verhindern, ist es bei Gent daher von besonderer Wichtigkeit nur geringe SP-Konzentrationen einzusetzen.

BotuSemen eignete sich ebenfalls für alle getesteten Methoden der Samenaufbereitung. Er erhielt die Motilität besser als EquiPro, war jedoch INRA 96 in der Regel unterlegen. Bisher gibt es nur wenige Studien über die Qualität von BotuSemen als Verdünner. In einer Studie von PAPA et al. (2014) war die Gesamt- und Vorwärtsmotilität nach 24 h bei BotuSemen besser als bei INRA 96. Dieses Ergebnis weicht von den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit ab, jedoch wurde der Samen dort nur unzentrifugiert bei einer Dichte von 40 Mio. Spermien/ml gelagert. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Studien ist daher limitiert.

EquiPro war in der vorliegenden Studie den übrigen Verdünnern deutlich unterlegen. Insbesondere der große Qualitätsunterschied zu INRA 96 war unerwartet, da die Verdüner eine sehr ähnliche Zusammensetzung aufweisen. Beide beinhalten spezifische Caseinate, die den wichtigsten Milchbestandteil zur Erhaltung der Spermienmotilität darstellen (BERGERON und MANJUNATH, 2006). Früher durchgeführte Studien kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen über die Eignung von EquiPro als Verdüner. In einer Studie von LeFRAPPER et al. (2010), in der allerdings nur zwei Hengste eingesetzt wurden, erhielt EquiPro die Spermienmotilität über 72 h genauso gut wie INRA 96. AURICH et al. (2007) berichten ebenfalls von guten Motilitäten bei Verwendung von EquiPro, jedoch verglichen sie EquiPro mit anderen Verdünnern als die vorliegende Studie. Dort führte EquiPro zu einer besseren Motilität als AndroMed-E und EquiPro TM, einem Verdüner mit der gleichen chemischen Zusammensetzung wie EquiPro, der bei Erwerb jedoch in gebrauchsfertiger, flüssig-steriler Form vorliegt. SACHER (2011) kam zu dem gleichen Schluss wie die vorliegende Studie und stellte sowohl mit als auch ohne Zentrifugation eine Unterlegenheit von EquiPro gegenüber INRA 96 fest.

Die Wahl des Samenverdünners ist insbesondere bei Hengsten mit einer geringen Toleranz gegenüber Lagerung und Kühlung von Bedeutung, da hier ein schlechter Verdüner zu nicht-versandfähigen Besamungsportionen führen kann. Bei diesen Hengsten sollte daher in jedem Fall ein hochwertiger Verdüner, wie z.B. INRA 96, gewählt werden. Hengstsamen, der ohnehin eine sehr gute Qualität auch nach der Lagerung aufweist, kann auch mit Gent oder BotuSemen gut aufbereitet werden.

### **5.3 Hengstspezifische Einflüsse auf die Spermienmotilität**

Die vorliegende Studie verdeutlicht die starke Beeinflussung der Samenparameter durch den Hengst selbst. Obwohl die Konfektionierung und der Verdüner eine nicht zu unterschätzende Rolle für die Qualität der Besamungsportion spielen, so stellt der Faktor Hengst den Parameter mit dem größten Einfluss auf die Spermienmotilität dar.

Ursache für die großen Motilitätsunterschiede zwischen den Hengsten ist neben der Qualität des Nativsamens auch die Zusammensetzung des SP (AURICH, 2008). Das SP besteht aus vielen verschiedenen Komponenten, deren Vorkommen bei den einzelnen Hengsten variiert. Dies wird deutlich bei der Durchführung einer Elektrophorese, in der sich eine große Vielfalt an Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht im equinen SP darstellt. Zeitgleich wird

auch ersichtlich, dass nur sieben Proteinbanden bei allen Hengsten identisch sind (ZAHN et al., 2006). Die unterschiedliche Proteinzusammensetzung hat auch einen Einfluss auf die Fertilität. So kommen CRISP-Moleküle in großer Menge bei Hengsten mit guter Fruchtbarkeit vor (REINEKE et al., 1999, SCHAMBONY et al., 1997), während KLK2, Clusterin, HSP-1 und HSP-2 insbesondere bei Hengsten mit schlechter Fertilität zu finden sind (NOVAK, 2010).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Beschaffenheit des SP kann bei einigen Hengsten eine Entfernung des SP vor der Lagerung sinnvoll sein, um die Überlebensrate der Spermien zu erhöhen. Laut BRINSKO et al. (2000) kann insbesondere bei Hengsten, deren Samen sich unzentrifugiert nur schlecht konservieren lässt („bad coolers“), eine Entfernung des SP die Motilität verbessern. Die vorliegende Studie zeigt jedoch auch, dass nicht nur der Hengst selbst bei der Entscheidung über die Durchführung einer Zentrifugation eine Rolle spielt. Vielmehr entscheidend in dieser Arbeit war der verwendete Verdünner. Während bei Einsatz von INRA 96 eine Zentrifugation bei fast allen Hengsten sinnvoll war, brachte die Zentrifugation bei den übrigen Verdünnern nur vereinzelt einen Vorteil. Es kann daher nicht pauschal entschieden werden, ob die Entfernung des SP bei einem Hengst sinnvoll ist, sondern nur unter Berücksichtigung des verwendeten Verdünners.

Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass sich eine hochkonzentrierte Samenlagerung bei 333 Mio. Spermien/ml sowohl für Hengste mit guter als auch für Hengste mit schlechter Samenqualität eignet. Grundsätzlich kann die Methode daher unabhängig von der Motilität des Nativsamens Anwendung finden. Dennoch sollte im Einzelfall überprüft werden, ob die gewählte Konfektionierungsform zu einer qualitativ zufriedenstellenden Besamungsportion führt. Insbesondere bei Hengsten mit einer schlechten Spermienmotilität ist die individuelle Überprüfung und Anpassung der Samenaufbereitung von Bedeutung, um Besamungsportionen zu erhalten, die die Mindestanforderungen erfüllen.

Um Kühsamen mit einer guten Qualität zu erhalten ist, neben der Art der Samenaufbereitung, auch die Berücksichtigung von Umwelt- und genetischen Faktoren von Bedeutung. Eine mangelhafte Ernährung oder Intoxikationen können ebenso die Samenqualität negativ beeinflussen wie eine zu geringe Ejakulationsfrequenz (FOOTE, 1978). Da die Spermaqualität auch eine vererbare Komponente darstellt (FOOTE, 1978, LABITZKE et al., 2014), ist

langfristig eine Berücksichtigung dieses Merkmals bei der Selektion der Zuchthengste erstrebenswert.

Kann trotz individuell angepasster Samenaufbereitung und optimierter Umweltbedingungen keine ausreichende Zahl vorwärtsbeweglicher Spermien in einer Besamungsportion erreicht werden, ist es ratsam, Alternativen zum Kühlsamenversand in Betracht zu ziehen. Teilweise können Hengste, deren Samen sich nur schlecht konservieren lässt, noch erfolgreich in der Frischsamenübertragung eingesetzt werden. Da bei dieser Form der künstlichen Besamung aufgrund des schnellen Transfers keine Kühlung erforderlich ist, eignet sich diese Methode besonders für kälteschockempfindliche Samenzellen. Zudem reichen bereits 300 Mio. vorwärtsbewegliche Samenzellen pro Besamungsportion aus (SIEME, 2009), so dass die Nativsamenübertragung auch für Hengste mit nur einem geringen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im Ejakulat eine gute Option darstellt.

## 5.4 Ausblick

Der vorliegende Versuch hat gezeigt, dass eine Samenlagerung bei 333 Mio. Spermien/ml mit dem Hinzufügen eines geringen SP-Anteils eine Alternative zu den konventionellen Methoden darstellen kann in Hinblick auf die Erhaltung der Motilität.

Die Motilität stellt einen der relevanten prognostischen Faktoren zur Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit einer Samenzelle dar. Sie gilt als Ausdruck von Vitalität und struktureller Integrität einer Samenzelle (VERSTEGEN et al., 2002). Hengste mit einer niedrigeren Fertilität als der Durchschnitt weisen eine geringere Anzahl an motilen und vorwärtsmotilen Spermien auf als Hengste mit einer guten Fruchtbarkeit (JASKO et al., 1992b). Auch LOVE (2011) und BARRIER-BATTUT (2013) wiesen einen Zusammenhang zwischen der Trächtigkeitsrate und der Motilität von Hengstspermien nach. Die Motilität ist jedoch nur eines der Kriterien, die ein Spermium zur Befruchtung einer Eizelle erfüllen muss. Viele weitere Eigenschaften der Samenzelle bestimmen, ob eine erfolgreiche Fusion mit der Eizelle möglich ist. Die alleinige Beurteilung der Motilität ist daher nicht hinreichend für eine zufriedenstellende Fertilitätsprognose. Die Untersuchung der hochkonzentrierten Samenlagerung mithilfe von weiteren prognostischen Fertilitätskriterien wäre demnach sinnvoll. Verschiedene Färbungen, die Durchflusszytometrie und insbesondere Besamungsversuche wären eine gute Ergänzung zu der in dieser Studie durchgeführten Motilitätsanalyse.

Ein weiterer interessanter Aspekt wäre die praktische Gestaltung des Versandes einer hochkonzentrierten Besamungsportion. Bisher stehen für den Versand bei 5 °C eine Reihe kommerzieller Versandcontainer zur Verfügung. Häufig eingesetzt werden bei den konventionellen Konfektionierungen verschiedene Styroporbehältnisse mit Kühlelementen oder der Equitainer® mit besonders guten Kühleigenschaften. Die zurzeit verfügbaren Versandbehältnisse können zwar ebenfalls für den Transport einer hochkonzentrierten Besamungsportion genutzt werden, sie sind jedoch für das geringe Versandvolumen recht groß. Die Entwicklung einer kleineren Thermotransportverpackung wäre daher eine sinnvolle Investition, um in Zukunft Volumen, Gewicht und somit letztlich Kosten zu sparen.

## 6. Zusammenfassung

### Julia Lübke (2016): **Einfluss von Seminalplasma auf die Motilität von gekühltem Hengst-samen nach einer hochkonzentrierten Lagerung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung einer Konfektionierungsform, die durch eine hohe Konzentrierung des Spermias auf 333 Mio. Spermien/ml einen volumensparenden Kühlsamenversand ermöglicht. Zum Erreichen einer optimalen Spermienmotilität wurden bei der Konfektionierung verschiedene SP-Konzentrationen getestet. Die Qualitätsbeurteilung der neuen Konfektionierung (Konfektionierung 3) erfolgte durch Vergleich mit zwei Standardmethoden der Samenaufbereitung (Konfektionierung 1 + 2). Konfektionierung 1 gehört aufgrund ihrer Simplizität in der Durchführung zu den am meisten angewendeten Samenaufbereitungsmethoden. Hier wurde der Samen nach der Gewinnung direkt auf 25 Mio. Spermien/ml verdünnt. Konfektionierung 2 gehört ebenfalls zu den traditionell häufig durchgeführten Methoden. Nach einer 1 + 1 Verdünnung mit einem Frischsamenverdünner und einer Zentrifugation des Samens bei 600 g für 10 min wurde der Großteil des Seminalplasmas entfernt. Das Spermienpellet wurde anschließend resuspendiert und auf 25 Mio. Spermien/ml verdünnt. Konfektionierung 3 stellt eine nach unserem Kenntnisstand bisher nicht beschriebene Methode der Samenaufbereitung dar. Wie auch bei der zweiten Konfektionierung wurde der Samen zunächst 1 + 1 verdünnt, bei 600 g für 10 min zentrifugiert und das SP größtenteils entfernt. Anschließend fand eine Resuspension des Spermienpellets und eine Verdünnung auf 333 Mio. Spermien/ml statt. Diese hohe Konzentration ermöglicht eine Volumeneinsparung beim Versand von bis zu 92,5 % im Vergleich zu den zwei herkömmlichen Methoden. Erst nach der Lagerung wurde der Verdünner hinzugegeben, so dass eine besamungsübliche Konzentration von 25 Mio. Spermien/ml entstand. Im zugefügten Verdünner waren verschiedene Seminalplasma-Konzentrationen enthalten, deren Einfluss auf die Spermienmotilität untersucht wurde.

Das Probandenkollektiv umfasste 8 Hengste verschiedener Rassen mit einem Alter von 3 - 12 Jahren, von denen jeweils 6 Samenproben für den Versuch aufbereitet wurden. Alle Konfektionierungen wurden parallel mit vier unterschiedlichen Frischsamenverdünnern durchgeführt. Die Lagerung der aufbereiteten Proben erfolgte, wie es für Versand sperma üblich ist, bei einer Temperatur von 5 °C. Nach 0, 24 und 48 h wurde die Spermienmotilität subjektiv beurteilt.

Die Untersuchungen belegen, dass die hochkonzentrierte Lagerung bei 333 Mio. Spermien/ml zur Konservierung von Hengst sperma geeignet ist und somit eine Alternative zu den



herkömmlichen Samenaufbereitungsmethoden darstellt. Ein geringer Anteil an autologem Seminalplasma in der Besamungsportion kann von Vorteil sein in Hinblick auf die vielfältigen Funktionen des Seminalplasmas im weiblichen Genitaltrakt. In Bezug auf die Motilität hingegen lässt sich bei den meisten Hengsten kein Unterschied zwischen Proben ohne Seminalplasma im Verdünner und Proben mit einer geringen Seminalplasma-Konzentration von 5 oder 20 % feststellen. Nur ein hoher Seminalplasma-Anteil von 80 % führt zu einer negativen Beeinflussung der Spermienmotilität und sollte daher vermieden werden.

Von den im Versuch getesteten Verdünnern ist INRA 96 bei allen durchgeführten Konfektionierungen am besten in der Lage, die Spermienmotilität zu erhalten. Auch BotuSemen und Gent sind für die Kühlkonservierung gut geeignet, jedoch sind sie INRA 96 in der Regel etwas unterlegen. EquiPro führt von den vier Verdünnern nach 24 und 48 h zu der niedrigsten Spermienbeweglichkeit.

Die vorliegende Studie zeigt große Unterschiede in der Samenqualität zwischen den Hengsten. Zur Erzielung einer optimalen Spermienmotilität nach dem Versand ist eine Anpassung von Konfektionierungsmethode, SP-Anteil und Verdünner an die individuellen Bedürfnisse der einzelnen Hengste empfehlenswert.

## 7. Summary

### Julia Lübke (2016): **Influence of seminal plasma on the motility of cooled stallion semen after a highly concentrated storage**

The aim of the present study has been the development of a semen processing method allowing the storage of equine semen at a high concentration of 333 million sperm/ml and low volume. Different seminal plasma concentrations were tested to achieve optimum spermatozoal motility. The quality of the new semen processing method (protocol 3) was evaluated by comparison with two standard conservation methods often used in the routine laboratory (protocol 1 + 2). Protocol 1 is one of the most commonly used semen processing methods due to its simplicity in implementation. The native semen was diluted directly after collection to 25 million sperm/ml. Protocol 2 is also a frequently applied standard semen conservation method. After dilution 1 + 1 with a semen extender and centrifugation at a force of 600 g for 10 min the bulk of the seminal plasma was removed. The sperm pellet was resuspended and diluted to a concentration of 25 million sperm/ml. Protocol 3 represents the new semen preservation method. The first steps were identical with protocol 2 and included a dilution 1 + 1, semen centrifugation at 600 g for 10 min and the removal of seminal plasma. Unlike protocol 2 the sperm pellet was then diluted to 333 million sperm/ml. Semen storage at that high concentration saves a volume up to 92.5 % compared with the two conventional semen processing methods. After storage the highly concentrated semen was diluted to a final concentration of 25 million sperm/ml. Various concentrations of seminal plasma were added to the extender to investigate the influence of seminal plasma on spermatozoal motility.

The study was conducted with 8 stallions of different breeds aged from 3 - 12 years. Six ejaculates of each stallion were used for the experiment. All semen preservation methods were performed with four different extenders. Semen storage took place at the standard temperature for cooled stallion semen at 5 °C. Sperm motility was evaluated subjectively after 0, 24 and 48 h of storage.

The present study demonstrates that highly concentrated semen can be used for artificial insemination. The new method is a suitable volume-saving alternative to the conventional semen preservation protocols. A small proportion of autologous seminal plasma in the insemination dose may be beneficial in regard to the multiple functions of seminal plasma in the female reproductive tract. Concerning the spermatozoal movement, there is in the majority of cases no difference between portions without seminal plasma and portions with a small

amount of 5 or 20 %. Only a high concentration of 80 % seminal plasma should be avoided because of its negative influence on sperm motility.

From the extenders tested in this study, INRA 96 yielded the best results with regard to sperm motility. BotuSemen and Gent are also well suited for the shipment of equine semen, however they were most times inferior to INRA 96. EquiPro is the extender that preserves spermatozoal movement worst over a period of 48 h.

The study revealed great differences in semen quality among the individual stallions. Therefore it is recommendable to adapt the conservation method, the seminal plasma concentration and the extender type to the individual sire.

## 8. Literaturverzeichnis

- Abdehl-Rahman HA, El-Belely MS, Al-Qarawi AA, El-Mougy SA (2000). The relationships between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. *Small Ruminant Research* 38, S. 45-49
- Abou-Ahmed MM, El-Belely MS, Ismail ST, El-Baghdady YRM, Hemeida NA (1993). Influence of age and season on certain biochemical constituents of seminal plasma of Arabian horses. *Animal Reproduction Science* 32, S. 237-244
- Adams GP, Ratto MH, Huanca W, Singh J (2005). Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction* 73, S.452-457
- Alghamdi A, Troedsson MHT, Laschkewitsch T, Xue JL (2001). Uterine secretion from mares with post-breeding endometritis alters sperm motion characteristics in vitro. *Theriogenology* 55, S.1019-1028
- Alghamdi AS, Foster DN, Troedsson MHT (2004). Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorph-nuclear neutrophils (PMN) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction* 127, S. 593-600
- Alghamdi AS, Foster DN (2005). Seminal DNase Frees Spermatozoa Entangled in Neutrophil Extracellular Traps. *Biology of Reproduction* 73, S. 1174-1181
- Almadhidi J, Seralini GE, Fresnel J, Silberzhan P, Gaillard JL (1995). Immunohistochemical localization of cytochrome P450 aromatase in equine gonads. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 43, S. 571-577
- Amann RP und Waberski W (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81, S. 5-17
- Arver S, Sjöberg SE (1983). Ionized Calcium in human seminal plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Suppl* 165, S. 123-126
- Asadpour R (2012). Relationship between mineral composition of seminal plasma and semen quality in various ram breeds. *Acta Scientiae Veterinariae* 40, S. 1027-1034
- Asari M, Sasaki K, Miura K, Ichihara N, Nishita T (1996). Immunohistolocalization of the carbonic anhydrase isoenzymes (CA-I, CA-II, and CA-III) in the reproductive tract of male horses. *American Journal of Veterinary Research* 57, S. 439-443
- Aurich C, Seeber P, Müller-Schlösser F (2007). Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 °C. *Reproduction in Domestic Animals* 42, S. 445-448
- Aurich C (2008). Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* 107, S.268-275
- Aurich C (2009). Physiologie der Fortpflanzungsfunktionen beim Hengst. In: Aurich C (Hrsg.), *Reproduktionsmedizin beim Pferd*. Parey-Verlag, Stuttgart, S. 235-248
- Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, Aitken RJ (2004). Analysis of the mechanisms by which calcium negatively regulates the tyrosine phosphorylation cascade associated with sperm capacitation. *Journal of Cell Science* 117, S. 211-222
- Barrier-Battut I, Delajarraud H, Legrand E, Bruyas JF, Fiéni F, Tainturier D, Thorin C, Pouliquen H (2002). Calcium, magnesium, copper, and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. *Theriogenology* 58, S. 229-232
- Barrier- Battut I, Bonnet C, Giraudo A, Dubois C, Caillaud M, Vidament M (2013). Removal of Seminal Plasma Enhances Membrane Stability on Fresh and Cooled Stallion Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 48, S. 64-71

- Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T, Cebrián-Pérez JA (2000). Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. *Biology of Reproduction* 63, S. 1531-1537
- Batellier F, Magistrini M, Fauquant J, Palmer E (1997). Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. *Theriogenology* 48, S. 391-410
- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M (2001). Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science* 68, S. 181-190
- Bedford SJ, Graham JK, Amann RP, Squires EL, Pickett BW (1995). Use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5°C with and without seminal plasma. *Theriogenology* 43, S. 939-953
- Bergeron A, Manjunath P (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproductions and Development* 73, S. 1338-1344
- Bertelsmann H, Keppler S, Höltershinken M, Bollwein H, Behne D, Alber D, Bukalis G, Kyriakopoulos A, Sieme H (2010). Selenium in blood, semen, seminal plasma and spermatozoa of stallions and its relationship to sperm quality. *Reproduction, Fertility and Development* 22, S. 886-891
- Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R (1982). Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *Journal of Anatomy* 135, S. 191-209
- Bielanski W, Rzasa J, Okólski A (1982). Prostaglandins in stallion semen. *Theriogenology* 17, S. 167-173
- Bittmar A und Kosiniak K (1992). The role of selected biochemical components of equine seminal plasma in determining suitability for deep-freezing. *Archivum Veterinarium Polonicum* 32, S. 17-29
- Bogle OA, Ratto MH, Adams GP (2011). Evidence for the conservation of biological activity of ovulation-inducing factor in seminal plasma. *Reproduction* 142, S. 277-283
- Brandelli A, Miranda PV, Tezon JG (1994). Participation of glycosylated residues in the human sperm acrosome reaction: possible role of N-acetylglucosaminidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 17, S. 299-304
- Braun J, Sakai M, Hochi S, Oguri N (1994). Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. *Theriogenology* 41, S.809-818
- Brinsko SP, Crockett EC, Squires EL (2000). Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology* 54, S. 129-136
- Burkman LJ, Overstreet JW, Katz DF (1984). A possible role for potassium and pyruvate in the modulation of sperm motility in the rabbit oviductal isthmus. *Journal of Reproduction and Fertility* 71, S. 367-376
- Caballero I, Parrilla I, Alminana C, del Olmo D, Roca J, Martínez EA, Vázquez JM (2012). Seminal Plasma Proteins as Modulators of the Sperm Function and Their Application in Sperm Biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals* 47, S. 12-21
- Calvete JJ, Sanz L (2007). Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. *Society for Reproduction and Fertility Suppl* 65, S. 201-215
- Carver DA, Ball BA (2002). Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* 58, S. 1587-1595
- Chen BX, Yuen ZX, Pan GW (1985). Semen-induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Journal of Reproduction and Fertility* 73, S. 335-339

- Claus R, Meyer HD, Gimenez T, Hoang-Vu C, Münster E (1990). Effect of seminal oestrogens of the boar on prostaglandin F<sub>2α</sub> release from the uterus of the sow. *Animal Reproduction Science* 23, S. 143-156
- Claus R, Dimmick MA, Gimenez T, Hudson LW (1992). Estrogens and prostaglandin F<sub>2α</sub> in the semen and blood plasma of stallions. *Theriogenology* 38, S. 687-693
- Cochran JD, Amann RP, Froman DP, Pickett BW (1984). Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine semen. *Theriogenology* 22, S. 25-38
- Cohen DJ, Ellerman DA, Cuasnicú PS (2000). Mammalian sperm-egg fusion: evidence that epididymal protein DE plays a role in mouse gamete fusion. *Biology of Reproduction* 63, S. 462-468
- Colenbrander B, Fazeli AR, van Buiten A, Parlevliet J, Gadella BM (1992). Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Acta Veterinaria Scandinavica Suppl* 88, S. 89-117
- Corrales JJ, Burgo RM, Miralles JM, Villar E (2000). Abnormalities in sperm acid glycosidases from infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Fertility and Sterility* 73, S. 470-478
- Corrales JJ, Burgo RM, Galindo P, Muñoz-Barroso I, Miralles JM, Villar E (2002). Abnormal expression of acid glycosidases in seminal plasma and spermatozoa from infertile men with varicocele. *Reproduction* 123, S. 411-417
- Darin-Bennett A, Poulos A, White IG (1973). The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull, and boar spermatozoa. *Australian Journal of Biological Sciences* 26, S. 1409-1420
- Dias AJ, Maia MS, Retamal CA, López ML (2004). Identification and partial characterization of alpha-1,4-glucosidase activity in equine epididymal fluid. *Theriogenology* 61, S. 1545-1558
- Doty A, Buhi WC, Benson S, Scoggin KE, Pozor M, Macpherson M, Mutz M, Troedsson MHT (2011). Equine CRISP3 Modulates Interaction Between Spermatozoa and Polymorphonuclear Neutrophils. *Biology of Reproduction* 85, S.157-164
- Eberspaecher U, Roosterman D, Krätzschar J, Haendler B, Habenicht UF, Becker A, Quensel C, Petri T, Schleuning WD, Donner P (1995). Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. *Molecular Reproduction and Development* 42, S. 157-172
- Ekhlesi-Hundrieser M, Schäfer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P, Töpfer-Petersen E (2005). Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Molecular Reproduction and Development* 70, S. 45-57
- Fiala SM, Pimentel CA, Mattos ALG, Gregory RM, Mattos RC (2007). Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology* 67, S. 556-562
- Foote RH (1978). Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. *Journal of Animal Science* 47, S. 1-11
- Fraser LR (1984). Mouse sperm capacitation in vitro involves loss of a surface-associated inhibitory component. *Journal of Reproduction and Fertility* 72, S. 373-384
- Gebauer MR, Pickett BW, Faulkner LC, Remmenga EE, Berndtson WE (1976). Chemical Characteristics of Seminal Plasma and Spermatozoa. *Journal of Animal Science* 43, S.626-632
- Hamann H, Jude R, Sieme H, Mertens U, Töpfer-Petersen E, Distl O, Leeb T (2007). A polymorphism within the equine CRISP3 gene is associated with stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. *Animal Genetics* 38, S. 259-264

- Heiskanen ML, Huhtinen M, Pirhonen A, Mäenpää PH (1994). Insemination results with slow-cooled stallion semen stored for 70 to 80 hours. *Theriogenology* 42, S. 1043-1051
- Hinton BT, Lan ZJ, Rudolph DB, Labus JC, Lye RJ (1998). Testicular regulation of epididymal gene expression. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 53, S. 47-57
- Hoffmann B und Landeck A (1999). Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Animal Reproduction Science* 57, S. 89-98
- Hough SR, Parks JE (1994). Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Activity in Seminal Plasma from the Bull, Stallion, Rabbit, and Rooster. *Biology of Reproduction* 50, S. 912-916
- Hoogewijs M, Rijsselaere T, De Vlieghe S, Vanhaesebrouck E, De Schauwer C, Govaere J, Thys M, Hoflack G, Van Soom A, de Kruif A (2010). Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology* 74, S. 118.126
- James RW, Heywood R, Street AE (1979). Biochemical observations on beagle dog semen. *Veterinary Record* 104, S. 480-482
- Janett F, Thun R, Bettschen S, Burger D, Hassig M (2003). Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches- Montagnes stallions. *Animal Reproduction Science* 77, S. 213-221
- Jasko DJ, Moran DM, Farlin ME, Squires EL (1991). Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology* 35, S. 1059-1067
- Jasko DA, Hathaway JA, Schaltenbrand VL, Simper WD, Squires EL (1992a). Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 37, S. 1241-1252
- Jasko DJ, Little TV, Lein DH, Foote RH (1992b). Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 200 (7), S. 979-985
- Johnson L, Thompson DL (1987). Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* 81, S. 227-232
- Kareskoski AM, Reilas T, Sankari S, Andersson M, Güvenc K, Katila T (2010). Alkaline and Acid Phosphatase,  $\beta$ -Glucuronidase and Electrolyte Levels in Fractionated Stallion Ejaculates. *Reproduction in Domestic Animals* 45, S. 369-374
- Kareskoski M, Sankari S, Johannisson A, Kindahl H, Andersson M, Katila T (2011). The Association of the Presence of Seminal Plasma and Its Components with Sperm Longevity in Fractionated Stallion Ejaculates. *Reproduction in Domestic Animals* 46, S. 1073-1081
- Katila T (1995). Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biology of Reproduction Mono* 1, S. 515-517
- Katila T (1997). Interactions of the uterus and semen. *Pferdeheilkunde* 13, S. 508-511
- Katila T, Reilas T, Güvenc K, Alm K, Andersson M (2004). The effect of seminal plasma on motility characteristics and viability of spermatozoa after cooled storage. *Havemeyer Foundation Monograph* 13, S. 3-5
- Kershaw-Young CM, Druart X, Vaughan J, Maxwell WM (2012).  $\beta$ -Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reproduction, Fertility and Development* 24, S.1093-1097

- Kosiniak K (1975). Characteristics of the successive jets of ejaculated semen of stallions. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 23, S. 59-61
- Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T (1994). Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology* 41, S.629-636
- Krätzschmar J, Haendler B, Eberspaecher U, Roosterman D, Donner P, Schleuning W (1996). The Human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *European Journal of Biochemistry* 236, S. 827-836
- Labitzke D, Sieme H, Martinsson G, Distl O (2014). Genetic parameters and breeding values for semen characteristics in Hanoverian Stallions. *Reproduction in Domestic Animals* 49, S. 584-587
- LeFrappier L, Walson MSL, Whisnant CS (2010). Comparison of various extenders for storage of cooled stallion spermatozoa for 72 hours. *Journal of Equine Veterinary Science* 30, S. 200-204
- Lemazurier E, Moslemi S, Sourdain P, Desjardins I, Plainfosse B, Seralini GE (2002). Free and Conjugated Estrogens and Androgens in Stallion Semen. *General and Comparative Endocrinology* 125, S. 272-282
- Len JA, Beehan DP, Lyle SK, Eilts BE (2013). Cushioned versus noncushioned centrifugation: Sperm recovery rate and integrity. *Theriogenology* 80, S. 648-653
- Loomis PR (2006). Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. Equine* 22, S. 663-676.
- Love CC (2011). Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* 76, S. 547-557
- Maeda T, Nishida J, Nakanishi Y (1999). Expression pattern, subcellular localization and structure–function relationship of rat Tpx-1, a spermatogenic cell adhesion molecule responsible for association with Sertoli cells. *Development, Growth & Differentiation* 41, S. 715-722
- Magistrini M, Seguin F, Beau P, Akoka S, Le Pape A, Palmer E (1995). 1H Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Stallion Genital Tract Fluids and Seminal Plasma: Contribution of the Accessory Sex Glands to the Ejaculate. *Biology of Reproduction Mono* 1, S. 599-607
- Magistrini M, Lindeberg H, Koskinen E, Beau P, Seguin F (2000). Biophysical and 1H magnetic resonance spectroscopy characteristics of fractionated stallion ejaculates. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl* 56, S. 101-110
- Manjunath P, Sairam MR (1987). Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochemical Journal* 241, S. 685-692
- Manjunath P, Thérien I (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology* 53, S. 109-119
- Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J., Fan J (2007). Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Society for Reproduction and Fertility Suppl* 64, S. 217-228
- Mann T (1975). Biochemistry of stallion semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 23, S. 47-52
- Mari G, Castagnetti C, Rizzato G, Mislei B, Iacono E, Merlo B (2011). Density gradient centrifugation of sperm from a subfertile stallion and effect of seminal plasma addition on fertility. *Animal Reproduction Science* 126, S. 96-100
- Marquez B und Suarez SS (2004). Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of Reproduction* 70, S. 1626-1633



- Martin JC, Klug E, Günzel AR (1979). Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 27, S. 47-51
- Meinecke B (2005). Reproduktion. In: Engelhardt W, Breves G (Hrsg.) *Physiologie der Haustiere*. MVS Medizinverlage Stuttgart, S. 495-551
- Melo LM, Teixeira DJ, Havt A, da Cunha RM, Martins DB, Castelletti CH, de Souza PR, Filho JL, Freitas VJ, Cavada BS, Rádis-Baptista G (2008). Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. *Molecular Reproduction and Development* 75, S. 8-16
- Metz KW, Berger T, Clegg ED (1990). Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. *Theriogenology* 34, S. 691-700
- Morrell JM, Rodríguez- Martínez H, Johannisson A (2010). Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing. *Reproductive BioMedicine Online* 21, S. 429-436
- Morrell JM, Georgakas A, Lundeheim N, Nash D, Davies Morel MC, Johannisson A (2014). Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality. *Theriogenology* 82, S. 176-183
- Muino-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA (2008). Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reproduction in Domestic Animals* 43, S. 18-31
- Nessau S (1994). Structural and functional characterization of the major proteins in stallion seminal plasma. Dissertation.
- Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR, Dixon WT (2010). Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology* 74, S. 956-967
- Padilla AW, Foote RH (1991). Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. *Journal of Animal Science* 69, S. 3308-3313
- Paolicchi F, Urquieta B, Del Valle L, Bustos- Obregón E (1999). Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Animal Reproduction Science* 54, S. 203-210
- Papa PM, Ramires- Neto C, Monteiro GA, Sancler-Silva YFR, Resende HL, Freitas-Dell'aqua CP, Dell'aqua JA, Alvarenga MA, Papa FO (2014). Sperm parameters and fertility of stallion semen cooled with different extenders. *Journal of Equine Veterinary Science* 34, S. 79-79
- Pesch S (2005). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen am Hengstjakulat sowie biochemische Analysen des Seminalplasmas. Dissertation. Justus- Liebig- Universität Gießen, Deutschland
- Pesch S, Bergmann M, Bostedt H (2006). Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlation to semen quality. *Theriogenology* 66, S. 307-313
- Pickett BW, Faulkner LC, Sutherland TM (1970). Effect of Month and Stallion on Seminal Characteristics and Sexual Behaviour. *Journal of Animal Science* 31, S. 713-728
- Pickett BW, Sullivan JJ, Byers WW, Pace MM, Remmenga EE (1975). Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertility and Sterility* 26, S. 167-174
- Pickett BW, Shiner KA (1994). Recent developments in artificial insemination in horses. *Livestock Production Science* 40, S. 31-36
- Polak B, Daunter B (1984). Osmolarity of human seminal plasma. *Andrologia* 16, S. 224-227
- Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde Forsberg C (2004). Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62, S. 1498-1517

- Portus BJ, Reilas T, Katila T (2005). Effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. *Equine Veterinary Journal* 37, S. 515-519
- Pruitt JA, Arns MJ, Pool KC (1993). Seminal plasma influences recovery of equine spermatozoa following in vitro culture (37°C) and cooled storage. *Theriogenology* 39, S. 291-296
- Raeside JJ, Christie HL (1997). Estrogen concentrations in semen of the stallion. *Animal Reproduction Science* 48, S. 293-300
- Ramires Neto C, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'aqua JA Jr, Papa FO, Castro-Chaves MM, Alvarenga MA (2013). New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology* 79, S. 1120-1123
- Ratto MH, Huanca W, Singh J, Adams GP (2006). Comparison of the effect of ovulation-inducing factor (OIF) in the seminal plasma of llamas, alpacas, and bulls. *Theriogenology* 66, S.1102-1106
- Ratto MH, Huanca W, Adams GP (2010). Ovulation-inducing factor: a protein component of llama seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8, S.1-7
- Ratto MH, Delbaere LTJ, Leduc YA, Pierson RA, Adams GP (2011). Biochemical isolation and purification of ovulation-inducing factor (OIF) in seminal plasma of llamas. *Reproductive Biology and Endocrinology* 9, S. 1-8
- Reineke A, Heß O, Schambony A, Petrounkina AM, Bader H, Sieme H, Töpfer-Petersen E (1999). Sperm-associated seminal plasma proteins - a novel approach for the evaluation of sperm fertilizing ability of stallions? *Pferdeheilkunde* 15, S. 531-537
- Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Töpfer-Petersen E (1996). Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *European Journal of Biochemistry* 242, S. 636-640
- Robertson SA (2005). Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell and Tissue Research* 322, S.43-52
- Roberts KP, Ensrud KM, Wooters JL, Nolan MA, Johnston DS, Hamilton DW (2006). Epididymal secreted protein CRISP-1 and sperm function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 250, S. 122-127
- Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ (2011). Seminal Plasma Proteins: What Role Do They Play? *American Journal of Reproductive Immunology* 66, S. 11-22
- Rossato M, Balercia G, Lucarelli G, Foresta C, Mantero F (2002). Role of seminal osmolarity in the regulation of human sperm motility. *International journal of andrology* 25, S. 230-235
- Sacher K (2011). Einfluss von Verdünner und Zentrifugation auf die Qualität von Kühsamen bei Isländer Hengsten. Dissertation, Vetsuisse- Fakultät Zürich
- Schambony A, Hess O, Calvete JJ, Neumann U, Töpfer-Petersen E (1997). Horse seminal plasma protein 3: Isolation, biochemical characterization, immunohistological localization and sperm coating characteristics. *Reproduction in Domestic Animals* 32, S.46
- Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U, Töpfer-Petersen E (1998a). Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochimica et Biophysica Acta* 1387, S. 206-216
- Schambony A, Hess O, Gentzel M, Töpfer-Petersen E (1998b). Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 53, S. 67-72
- Schembri MA, Major DA, Suttie JJ, Maxwell WMC, Evans G (2002). Capacitation- like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Reproduction, Fertility and Development* 14, S. 225-233

- Sieme H (2009). Instrumentelle Besamung in der Pferdezucht. In: Aurich C (Hrsg.). Reproduktionsmedizin beim Pferd. Gynäkologie – Andrologie – Geburtshilfe. Parey- Verlag, Stuttgart, S.299-330
- Sorensen MB, Bergdahl IA, Hjollund NH, Bonde JP, Stoltenberg M, Ernst E (1999). Zinc, magnesium and calcium in human seminal fluid: relations to other semen parameters and fertility. *Molecular Human Reproduction* 5, S. 331-337
- Tanco VM, Ratto MH, Lazzarotto M, Adams GP (2011). Dose-Response of Female Llamas to Ovulation-Inducing Factor from Seminal Plasma. *Biology of Reproduction* 85, S. 452-456
- Tischner M, Kosiniak K, Bielanski W (1974). Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* 41, S. 329-335
- Töpfer-Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlesi-Hundrieser M, Dostálová Z, Sanz L, Calvete JJ (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia* 30, S. 217-224
- Töpfer-Petersen E (1999). Molecules on the sperm's route to fertilization. *Journal of Experimental Zoology* 285, S. 259-266
- Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H (2005). The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *Animal Reproduction Science* 89, S. 159-170
- Troedsson MHT (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* 52, S. 461-471
- Troedsson MHT, Loset K, Alghamdi AM, Dahms B, Crabo BG (2001). Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science* 68, S. 273-278
- Troedsson MHT, Desvousges A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi WC (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science* 89, S. 171-186
- Tulsiani DRP, Abou-Haila A, Loese CR, Pereir BMJ (1998). The Biological and Functional Significance of the Sperm Acrosome and Acrosomal Enzymes in Mammalian Fertilization. *Experimental cell research* 240, S. 151-164
- Turner RMO und McDonnell SM (2003). Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. *Theriogenology* 60, S. 1-10
- Udby L, Cowland JB, Johnson AH, Sorensen OE, Borregaard N, Kjeldsen L (2002). An ELISA for SGP28/CRISP-3, a cysteine-rich secretory protein in human neutrophils, plasma, and exocrine secretions. *Journal of Immunological Methods* 263, S. 43-55
- Vadnais ML, Foster DN, Roberts KP (2008). Molecular Cloning and Expression of the CRISP Family of Proteins in the Boar. *Biology of Reproduction* 79, S. 1129-1134
- Varner DD, Blanchard TL, Love CL, Garcia MC, Kenney RM (1987). Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* 28, S. 709-723
- Varner DD (2008). Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70, S. 448-462
- Verstegen J, Iguer-Quada M, Onclin K (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, S. 149-179
- Waberski D, Claassen R, Hahn T, Jungblut PW, Parvizi N, Kallweit E, Weitze KF (1997). LH profile and advancement of ovulation after transcervical infusion of seminal plasma at different stages of oestrus in gilts. *Journal of Reproduction and Fertility* 109, S. 29-34

- Waberski D, Sieme H (2009). Andrologische und spermatologische Untersuchung (Zuchttauglichkeitsuntersuchung) beim Hengst. In: Aurich C. Reproduktionsmedizin beim Pferd. Parey- Verlag, Stuttgart, S. 249-266
- Watson ED (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development* 7, S.871-891
- Watson ED, Nikolakopoulos E, Gilbert C, Goode J (1999). Oxytocin in the semen and gonads of the stallion. *Theriogenology* 51, S. 855-865
- Watson ED (2000). Post-breeding endometritis in the mare. *Animal Reproduction Science* 60-61, S. 221-232
- Webb RL, Evans JW, Arns MJ, Webb GW, Taylor TS, Potter GD (1990). Effects of vesiculectomy on stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 10, S. 218-223
- Weiss S, Janett F, Burger D, Hässig M, Thun R (2004). The influence of centrifugation on quality and freezability of stallion semen. *Schweiz Arch Tierheilkunde* 146, S.285-293
- Weitze KF (2001). Assistierte Techniken. In Busch W & Holzmann A (Hrsg.) *Veterinärmedizinische Andrologie*, Schattauer, Stuttgart, S. 511-517
- Witte TS, Schäfer-Somi S (2007). Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 102, S. 181–193
- Wrench N, Pinto CRF, Klinefelter GR, Dix DJ, Flowers WL, Farin CE (2010). Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Animal Reproduction Science* 119, S. 219-227
- Zahn FS, Papa FO, Melo CM (2006). Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: are they correlated to semen freezability? *Animal Reproduction Science* 94, S. 64-66

## 9. Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studiendesign im Überblick. ....	39
Abbildung 2: Verteilung des Ejakulatvolumens von 48 gewonnenen Samenproben.....	41
Abbildung 3: Darstellung von Gesamtmotilität und Vorwärtsmotilität in den Nativejakulaten der 8 Hengste .....	42
Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahme der Spermien bei einer Verdünnung mit Gent und Konfektionierung auf 333 Mio. Spermien/ml mit 80 % SP .....	49
Abbildung 5: Vorwärtsmotilität von Hengst 1 nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. ....	68
Abbildung 6: Vorwärtsmotilität von Hengst 2 nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern.. ....	69
Abbildung 7: Vorwärtsmotilität von Hengst 3 nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. ....	70
Abbildung 8: Vorwärtsmotilität von Hengst 4 nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. ....	71
Abbildung 9: Vorwärtsmotilität von Hengst 5 nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. ....	72
Abbildung 10: Vorwärtsmotilität von Hengst 6 nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern.. ....	73
Abbildung 11: Vorwärtsmotilität von Hengst 7 nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern.. ....	74
Abbildung 12: Vorwärtsmotilität von Hengst 8 nach 48 h bei unterschiedlicher Konfektionierung und unter Verwendung von verschiedenen Verdünnern. ....	75

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Median-, Minimum- und Maximumwerte von Enzymaktivitäten.....	7
Tabelle 2: Median-, Minimum- und Maximumwerte der Mengen- und Spurenelemente.....	11
Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der Hormonkonzentrationen im SP bzw. Samen des Hengstes .....	14
Tabelle 4: Empfehlungen für die Zentrifugationskraft und -dauer zur Reduktion/ Entfernung des SP-Anteils.....	18
Tabelle 5: Rasse, Alter, Fertilität und Spermienmotilität der Versuchshengste.....	27
Tabelle 6: Mischungsverhältnisse von SP und Verdünner zur Herstellung von 1 ml Verdünner mit einem Anteil von 0, 5, 20 und 80 % SP .....	38
Tabelle 7: Dichte und Spermiengesamtzahl aus 48 Ejakulaten.....	44
Tabelle 8: Darstellung des pH-Wertes von 48 Ejakulaten.....	44
Tabelle 9: Vergleich von Gesamtmotilität, Vorwärtsmotilität, Ortsmotilität und dem Anteil unbeweglicher Spermien bei unterschiedlichen Konfektionierungsformen unter Verwendung von BotuSemen .....	46
Tabelle 10: Vergleich von Gesamtmotilität, Vorwärtsmotilität, Ortsmotilität und dem Anteil unbeweglicher Spermien bei unterschiedlichen Konfektionierungsformen unter Verwendung von EquiPro.....	48
Tabelle 11: Vergleich von Gesamtmotilität, Vorwärtsmotilität, Ortsmotilität und dem Anteil unbeweglicher Spermien bei unterschiedlichen Konfektionierungsformen unter Verwendung von Gent. ....	50
Tabelle 12: Vergleich von Gesamtmotilität, Vorwärtsmotilität, Ortsmotilität und dem Anteil unbeweglicher Spermien bei unterschiedlichen Konfektionierungsformen unter Verwendung von INRA 96 .....	52
Tabelle 13: Vergleich von Gesamtmotilität, Vorwärtsmotilität, Ortsmotilität und dem Anteil unbeweglicher Spermien bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektionierung „HU 25“ .....	55
Tabelle 14: Vergleich von Gesamtmotilität, Vorwärtsmotilität, Ortsmotilität und dem Anteil unbeweglicher Spermien bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektionierung „HZ 25“ .....	57
Tabelle 15: Vergleich von Gesamtmotilität, Vorwärtsmotilität, Ortsmotilität und dem Anteil unbeweglicher Spermien bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektionierung „HZ 333 0 % SP“ .....	59
Tabelle 16: Vergleich von Gesamtmotilität, Vorwärtsmotilität, Ortsmotilität und dem Anteil unbeweglicher Spermien bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektionierung „HZ 333 5 % SP“ .....	61

Tabelle 17: Vergleich von Gesamtmotilität, Vorwärtsmotilität, Ortsmotilität und dem Anteil unbeweglicher Spermien bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektionierung „HZ 333 20 % SP“ .....	63
Tabelle 18: Vergleich von Gesamtmotilität, Vorwärtsmotilität, Ortsmotilität und dem Anteil unbeweglicher Spermien bei unterschiedlichen Verdünnern und der Konfektionierung „HZ 333 80 % SP“ .....	65
Tabelle 19: Gesamtmotilität von Hengst 1 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	102
Tabelle 20: Vorwärtsmotilität von Hengst 1 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	102
Tabelle 21: Gesamtmotilität von Hengst 2 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	103
Tabelle 22: Vorwärtsmotilität von Hengst 2 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	103
Tabelle 23: Gesamtmotilität von Hengst 3 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	104
Tabelle 24: Vorwärtsmotilität von Hengst 3 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	104
Tabelle 25: Gesamtmotilität von Hengst 4 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	105
Tabelle 26: Vorwärtsmotilität von Hengst 4 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	105
Tabelle 27: Gesamtmotilität von Hengst 5 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	106
Tabelle 28: Vorwärtsmotilität von Hengst 5 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	106
Tabelle 29: Gesamtmotilität von Hengst 6 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	107
Tabelle 30: Vorwärtsmotilität von Hengst 6 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	107
Tabelle 31: Gesamtmotilität von Hengst 7 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	108
Tabelle 32: Vorwärtsmotilität von Hengst 7 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	108
Tabelle 33: Gesamtmotilität von Hengst 8 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	109
Tabelle 34: Vorwärtsmotilität von Hengst 8 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung .....	109



### 9.3 Gesamt- und Vorwärtmotilitäten der einzelnen Hengste

Tabelle 19: **Gesamtmotilität von Hengst 1** bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern

Verdün- ner	Halte- dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	70 (60-80)	70 (70-75)	70 (70-80)	70 (65-80)	72,5 (70-80)	70 (60-75)
	H24	67,5 (50-70)	65 (60-65)	65 (60-80)	70 (65-80)	70 (65-75)	62,5 (60-70)
	H48	65 (45-70)	50 (40-50)	60 (45-70)	67,5 (35-75)	65 (35-75)	55 (35-65)
EP	HO	70 (65-80)	70 (65-75)	75 (70-75)	70 (70-75)	70 (70-80)	70 (40-70)
	H24	52,5 (30-60)	60 (60-70)	60 (60-75)	65 (60-75)	70 (55-70)	50 (40-60)
	H48	45 (15-55)	55 (30-70)	60 (25-65)	60 (20-70)	57,5 (15-70)	45 (15-50)
Gent	HO	77,5 (70-90)	72,5 (65-80)	70 (70-80)	75 (65-80)	75 (70-80)	70 (60-70)
	H24	72,5 (70-80)	65 (60-80)	70 (65-75)	75 (70-80)	77,5 (70-80)	65 (30-80)
	H48	70 (60-70)	65 (50-70)	60 (45-65)	65 (55-65)	62,5 (50-70)	55 (40-70)
INRA 96	HO	77,5 (60-85)	70 (65-80)	75 (70-80)	75 (70-80)	75 (70-80)	70 (60-75)
	H24	62,5 (50-70)	70 (50-70)	75 (65-80)	72,5 (60-80)	70 (60-75)	60 (45-65)
	H48	60 (40-65)	65 (60-70)	70 (60-80)	70 (60-80)	70 (60-80)	60 (50-70)

Tabelle 20: **Vorwärtmotilität von Hengst 1** bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern

Verdün- ner	Halte- dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	60 (40-75)	65 (60-70)	65 (60-75)	65 (60-75)	67,5 (60-70)	45 (30-60)
	H24	60 (40-65)	60 (50-60)	60 (55-75)	65 (60-75)	65 (60-70)	50 (30-55)
	H48	60 (40-60)	40 (30-45)	55 (40-65)	62,5 (30-70)	60 (25-70)	35 (20-50)
EP	HO	60 (55-75)	65 (60-70)	70 (65-70)	65 (65-70)	62,5 (60-70)	30 (20-60)
	H24	45 (25-50)	55 (50-60)	55 (55-70)	60 (55-70)	65 (45-65)	25 (20-45)
	H48	37,5 (10-50)	45 (15-60)	52,5 (20-60)	55 (10-65)	52,5 (10-65)	30 (10-40)
Gent	HO	70 (60-80)	67,5 (55-75)	65 (60-70)	70 (60-70)	70 (65-75)	42,5 (30-65)
	H24	67,5 (50-70)	60 (50-70)	65 (60-70)	70 (65-75)	70 (65-75)	30 (20-65)
	H48	60 (50-65)	55 (40-60)	55 (40-60)	60 (50-60)	57,5 (45-65)	30 (10-60)
INRA 96	HO	70 (50-80)	62,5 (60-75)	67,5 (65-70)	70 (65-75)	70 (65-75)	50 (30-65)
	H24	57,5 (40-60)	62,5 (45-65)	70 (60-75)	67,5 (55-75)	65 (55-70)	45 (40-50)
	H48	52,5 (30-60)	60 (50-60)	62,5 (55-75)	65 (55-75)	65 (55-70)	35 (25-60)



Tabelle 21: **Gesamtmotilität von Hengst 2** bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	75 (15-80)	70 (10-80)	70 (10-75)	70 (15-75)	70 (40-80)	70 (50-70)
	H24	52,5 (7-60)	60 (5-70)	65 (40-70)	65 (60-70)	62,5 (50-70)	60 (40-60)
	H48	50 (8-50)	55 (4-60)	40 (10-60)	50 (15-60)	50 (30-60)	45 (15-50)
EP	HO	70 (65-80)	70 (60-70)	70 (60-75)	70 (70-80)	70 (70-70)	70 (60-70)
	H24	50 (35-60)	60 (55-60)	60 (55-60)	60 (60-60)	60 (50-60)	60 (50-60)
	H48	42,5 (30-50)	55 (50-65)	50 (40-50)	50 (40-50)	45 (40-50)	35 (25-40)
Gent	HO	80 (80-80)	70 (60-80)	70 (70-80)	77,5 (70-80)	70 (50-80)	70 (70-80)
	H24	60 (60-70)	60 (60-70)	60 (50-60)	65 (60-70)	60 (50-65)	45 (30-60)
	H48	55 (45-60)	57,5 (50-60)	50 (15-60)	55 (50-70)	40 (20-70)	12,5 (6-30)
INRA 96	HO	80 (70-80)	75 (70-80)	75 (70-85)	70 (70-85)	75 (65-85)	70 (70-80)
	H24	60 (50-60)	65 (60-70)	70 (70-75)	70 (70-75)	70 (60-75)	65 (60-70)
	H48	47,5 (40-50)	67,5 (50-70)	70 (60-70)	67,5 (60-70)	60 (50-65)	50 (50-60)

Tabelle 22: **Vorwärtsmotilität von Hengst 2** bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	60 (10-70)	60 (5-70)	60 (5-70)	60 (10-70)	62,5 (30-70)	50 (30-50)
	H24	45 (5-50)	50 (3-60)	60 (30-60)	60 (40-60)	55 (30-60)	30 (20-40)
	H48	40 (4-40)	40 (2-40)	30 (7-50)	35 (10-50)	40 (20-40)	22,5 (10-30)
EP	HO	60 (55-70)	60 (50-70)	60 (50-70)	60 (50-70)	60 (50-60)	50 (30-60)
	H24	40 (25-50)	47,5 (40-50)	50 (40-50)	50 (40-50)	42,5 (40-50)	30 (20-30)
	H48	35 (20-40)	40 (40-50)	30 (30-40)	30 (30-40)	25 (20-35)	12,5 (10-20)
Gent	HO	70 (70-75)	60 (50-70)	60 (50-70)	65 (60-70)	60 (30-70)	50 (40-50)
	H24	50 (40-60)	50 (50-60)	50 (40-50)	60 (50-60)	50 (40-50)	25 (15-40)
	H48	40 (40-60)	50 (40-50)	40 (10-50)	45 (30-60)	20 (10-60)	7 (3-15)
INRA 96	HO	60 (50-70)	65 (60-70)	65 (60-70)	67,5 (60-75)	65 (50-75)	50 (50-60)
	H24	50 (40-50)	55 (50-60)	60 (60-70)	60 (60-70)	60 (40-65)	40 (30-50)
	H48	30 (30-40)	55 (40-60)	60 (50-60)	60 (50-60)	50 (40-60)	35 (20-40)

*Tabelle 23: Gesamtmotilität von Hengst 3 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern*

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	70 (70-75)	70 (60-75)	70 (65-75)	70 (65-75)	75 (65-75)	70 (65-70)
	H24	62,5 (60-70)	57,5 (50-65)	60 (55-70)	65 (65-70)	65 (60-70)	60 (60-70)
	H48	60 (50-65)	47,5 (40-50)	52,5 (50-60)	60 (50-60)	60 (50-60)	50 (40-60)
EP	HO	67,5 (65-70)	67,5 (65-75)	67,5 (65-70)	65 (65-70)	65 (60-70)	65 (60-70)
	H24	50 (50-60)	50 (50-60)	50 (50-60)	52,5 (50-60)	52,5 (50-60)	50 (50-60)
	H48	45 (40-50)	50 (50-50)	50 (50-50)	50 (50-50)	50 (50-50)	40 (30-50)
Gent	HO	72,5 (70-75)	70 (60-75)	70 (65-75)	75 (70-80)	75 (70-75)	75 (70-75)
	H24	65 (60-70)	62,5 (60-70)	62,5 (60-65)	65 (60-70)	67,5 (60-70)	65 (50-70)
	H48	60 (60-65)	60 (50-60)	50 (20-50)	57,5 (50-60)	45 (40-65)	45 (10-60)
INRA 96	HO	70 (70-70)	72,5 (65-75)	75 (70-75)	75 (75-75)	75 (70-80)	70 (70-75)
	H24	65 (60-70)	70 (65-70)	72,5 (70-75)	72,5 (70-75)	75 (70-75)	70 (50-70)
	H48	62,5 (50-70)	70 (60-70)	70 (70-70)	70 (65-70)	70 (65-75)	60 (50-70)

*Tabelle 24: Vorwärtsmotilität von Hengst 3 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern*

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	60 (50-65)	60 (50-70)	57,5 (50-70)	60 (50-70)	55 (50-65)	40 (30-40)
	H24	50 (50-60)	47,5 (40-55)	50 (50-60)	57,5 (50-60)	52,5 (50-60)	40 (30-50)
	H48	47,5 (40-50)	35 (30-40)	40 (30-50)	50 (40-50)	40 (40-50)	30 (20-30)
EP	HO	50 (50-60)	50 (45-60)	50 (50-55)	50 (45-50)	42,5 (40-50)	30 (20-40)
	H24	40 (30-50)	40 (35-50)	40 (30-50)	40 (30-50)	30 (20-40)	20 (20-30)
	H48	30 (30-40)	40 (30-40)	30 (30-40)	30 (30-40)	25 (20-30)	17,5 (10-20)
Gent	HO	60 (60-70)	55 (50-60)	52,5 (50-65)	55 (50-70)	55 (50-65)	30 (30-35)
	H24	50 (50-50)	50 (50-60)	50 (50-60)	50 (50-55)	50 (40-60)	30 (20-40)
	H48	42,5 (40-50)	40 (40-50)	35 (10-40)	45 (40-50)	30 (20-50)	25 (5-40)
INRA 96	HO	60 (50-65)	62,5 (60-70)	62,5 (60-70)	65 (60-70)	62,5 (60-65)	50 (40-55)
	H24	50 (40-55)	60 (50-65)	62,5 (60-70)	65 (50-70)	60 (50-65)	45 (30-50)
	H48	45 (30-50)	50 (40-60)	60 (50-60)	60 (50-60)	45-60)	35 (30-40)

*Tabelle 25: Gesamtmotilität von Hengst 4 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern*

Verdüner	Halte- dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	52,5 (40-60)	47,5 (35-50)	42,5 (30-50)	40 (35-45)	40 (35-50)	42,5 (35-50)
	H24	32,5 (20-40)	30 (25-40)	25 (25-35)	25 (25-35)	27,5 (25-30)	27,5 (25-35)
	H48	27,5 (25-35)	25 (20-30)	25 (20-25)	25 (20-25)	25 (20-30)	25 (20-30)
EP	HO	50 (40-65)	47,5 (35-55)	40 (30-50)	40 (25-50)	40 (30-50)	37,5 (30-40)
	H24	35 (25-40)	32,5 (30-40)	25 (20-35)	25 (20-35)	30 (20-35)	27,5 (20-30)
	H48	25 (20-35)	32,5 (25-35)	25 (20-35)	22,5 (15-35)	25 (15-30)	20 (10-30)
Gent	HO	50 (35-60)	52,5 (35-60)	47,5 (35-55)	45 (35-50)	42,5 (35-55)	42,5 (40-60)
	H24	35 (30-45)	37,5 (35-50)	32,5 (25-35)	32,5 (25-35)	32,5 (25-35)	30 (20-40)
	H48	25 (20-40)	30 (25-35)	25 (20-30)	25 (20-30)	22,5 (20-25)	15 (5-35)
INRA 96	HO	57,5 (50-65)	55 (50-60)	52,5 (50-60)	50 (45-65)	52,5 (40-60)	45 (30-50)
	H24	42,5 (35-50)	50 (40-50)	42,5 (35-50)	40 (40-55)	45 (35-55)	32,5 (30-40)
	H48	35 (20-35)	42,5 (35-45)	37,5 (30-45)	35 (30-45)	32,5 (30-40)	25 (20-30)

*Tabelle 26: Vorwärtsmotilität von Hengst 4 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern*

Verdüner	Halte- dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	45 (30-50)	40 (30-45)	37,5 (20-45)	32,5 (30-40)	32,5 (30-40)	20 (10-20)
	H24	25 (15-30)	25 (20-30)	20 (20-30)	20 (20-30)	22,5 (20-25)	10 (10-15)
	H48	22,5 (15-30)	20 (15-20)	20 (15-20)	20 (15—20)	20 (15-25)	10 (5-10)
EP	HO	42,5 (35-60)	42,5 (30-50)	35 (25-45)	35 (20-40)	35 (15-40)	15 (10-20)
	H24	30 (20-35)	27,5 (25-35)	20 (15-30)	20 (15-30)	22,5 (15-25)	15 (10-15)
	H48	20 (15-30)	25 (20-30)	20 (15-25)	17,5 (10-30)	15 (10-25)	5 (5-10)
Gent	HO	40 (30-55)	47,5 (30-55)	42,5 (30-50)	40 (30-45)	37,5 (30-50)	20 (20-20)
	H24	30 (25-35)	32,5 (25-45)	27,5 (20-30)	27,5 (20-30)	27,5 (20-30)	17,5 (5-20)
	H48	20 (15-30)	25 (20-30)	20 (15-25)	20 (15-25)	15 (10-20)	5 (2-10)
INRA 96	HO	50 (40-55)	50 (40-55)	47,5 (40-55)	45 (40-60)	42,5 (35-55)	20 (15-30)
	H24	35 (30-40)	40 (30-45)	35 (30-45)	35 (30-50)	35 (25-45)	15 (15-20)
	H48	30 (15-30)	32,5 (30-40)	30 (25-35)	30 (25-40)	27,5 (20-30)	10 (10-15)

*Tabelle 27: Gesamtmotilität von Hengst 5 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern*

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	65 (40-70)	62,5 (50-70)	62,5 (55-65)	60 (55-70)	60 (55-65)	60 (50-60)
	H24	35 (30-50)	50 (50-60)	40 (35-50)	40 (35-55)	37,5 (30-50)	35 (30-50)
	H48	25 (20-45)	50 (40-55)	25 (15-35)	30 (20-40)	27,5 (25-40)	25 (15-40)
EP	HO	60 (60-70)	50 (20-60)	47,5 (30-55)	55 (45-60)	60 (45-60)	50 (50-60)
	H24	22,5 (20-45)	20 (5-35)	22,5 (15-30)	25 (20-40)	27,5 (25-40)	22,5 (15-40)
	H48	17,5 (15-40)	12,5 (3-30)	10 (5-15)	20 (15-30)	20 (15-30)	12,5 (5-20)
Gent	HO	70 (50-75)	65 (50-75)	60 (50-70)	55 (50-70)	57,5 (50-65)	55 (50-60)
	H24	50 (40-70)	55 (40-70)	47,5 (35-60)	60 (45-70)	55 (50-65)	30 (20-40)
	H48	37,5 (30-50)	47,5 (35-60)	42,5 (30-50)	57,5 (45-65)	45 (30-55)	10 (5-20)
INRA 96	HO	67,5 (60-70)	70 (65-70)	67,5 (65-70)	67,5 (65-70)	67,5 (65-70)	60 (50-60)
	H24	42,5 (35-60)	60 (40-65)	50 (50-60)	52,5 (40-60)	50 (40-55)	40 (30-50)
	H48	37,5 (25-50)	52,5 (50-60)	47,5 (30-50)	40 (30-50)	40 (30-50)	27,5 (20-40)

*Tabelle 28: Vorwärtsmotilität von Hengst 5 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern*

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	50 (30-60)	50 (45-60)	50 (50-55)	45 (40-60)	45 (30-50)	10 (10-50)
	H24	25 (20-45)	40 (30-50)	30 (20-40)	30 (25-45)	25 (15-40)	10 (10-20)
	H48	20 (15-35)	30 (25-45)	17,5 (10-25)	20 (10-30)	17,5 (10-30)	7,5 (5-20)
EP	HO	45 (30-55)	35 (10-50)	32,5 (15-45)	42,5 (20-50)	35 (15-50)	15 (10-20)
	H24	17,5 (15-40)	10 (2-25)	15 (10-25)	17,5 (15-35)	17,5 (15-30)	10 (5-10)
	H48	12,5 (10-30)	7,5 (1-10)	6 (2-10)	12,5 (5-20)	12,5 (5-20)	5 (2-10)
Gent	HO	55 (40-60)	45 (40-60)	45 (40-60)	45 (35-60)	42,5 (30-55)	10 (10-25)
	H24	35 (20-50)	37,5 (30-60)	40 (25-50)	40 (30-55)	40 (25-50)	10 (10-20)
	H48	25 (15-35)	35 (20-50)	32,5 (20-40)	35 (20-50)	35 (20-45)	5 (2-10)
INRA 96	HO	60 (50-65)	60 (50-65)	60 (50-60)	60 (50-60)	50 (45-60)	25 (10-30)
	H24	30 (25-50)	50 (40-55)	40 (40-50)	42,5 (30-50)	40 (30-45)	15 (10-20)
	H48	27,5 (20-35)	40 (35-50)	37,5 (20-40)	32,5 (20-40)	30 (20-40)	10 (10-10)

Tabelle 29: **Gesamtmotilität von Hengst 6** bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	10 (5-20)	10 (5-20)	10 (5-20)	10 (5-20)	10 (5-20)	9 (5-20)
	H24	7,5 (5-12)	6 (3-10)	6 (4-10)	7 (5-12)	7,5 (5-10)	9 (5-10)
	H48	6 (5-10)	5 (2-10)	5 (2-10)	6 (3-15)	7 (3-15)	6 (3-15)
EP	HO	10 (5-20)	10 (2-20)	10 (2-20)	10 (2-20)	11 (3-20)	10 (5-20)
	H24	9 (3-10)	8 (2-10)	9 (2-10)	10 (3-10)	10 (2-10)	6 (4-10)
	H48	6 (2-10)	8 (1-10)	3,5 (1-10)	4,5 (2-10)	3 (3-10)	5 (2-10)
Gent	HO	10 (5-20)	10 (7-30)	10 (5-20)	10 (5-20)	10 (5-20)	10 (5-15)
	H24	9 (5-15)	8,5 (5-20)	7 (3-12)	6,5 (3-13)	5 (2-10)	5 (1-10)
	H48	3 (2-5)	5,5 (3-10)	5 (2-7)	5 (2-7)	5 (2-7)	4 (1-6)
INRA 96	HO	20 (15-30)	25 (10-30)	20 (10-25)	20 (10-25)	20 (10-25)	15 (7-20)
	H24	15 (10-25)	20 (10-30)	20 (12-30)	20 (12-30)	17,5 (10-25)	12,5 (5-20)
	H48	13,5 (10-20)	15 (10-20)	20 (10-30)	20 (10-30)	15 (10-25)	5,5 (2-15)

Tabelle 30: **Vorwärtsmotilität von Hengst 6** bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	10 (2-15)	10 (5-20)	10 (5-20)	10 (4-20)	10 (5-20)	4 (2-10)
	H24	6 (3-10)	4 (2-8)	5 (2-8)	5 (5-10)	7,5 (5-10)	2,5 (2-4)
	H48	4,5 (3-7)	3,5 (1-5)	3,5 (1-7)	4,5 (2-10)	5 (2-10)	2 (1-5)
EP	HO	10 (5-15)	10 (1-15)	10 (1-15)	10 (1-15)	10 (2-15)	5 (2-8)
	H24	7 (1-10)	6,5 (1-8)	7 (1-10)	8 (1-10)	7,5 (1-10)	2 (1-5)
	H48	4,5 (1-8)	5 (0-8)	2 (0-8)	3 (1-8)	2,5 (2-7)	2 (1-3)
Gent	HO	10 (3-15)	10 (5-25)	10 (5-15)	10 (5-20)	10 (5-15)	4 (1-5)
	H24	6,5 (3-10)	6,5 (4-15)	6 (2-10)	4 (2-10)	4 (1-8)	2 (0-2)
	H48	2 (1-3)	4 (2-7)	4 (1-5)	4,5 (1-5)	3,5 (1-5)	1 (0-2)
INRA 96	HO	20 (10-25)	20 (8-25)	20 (10-20)	20 (10-25)	20 (10-25)	15 (7-20)
	H24	12,5 (10-20)	15 (8-25)	17,5 (10-25)	20 (12-30)	17,5 (10-25)	12,5 (5-20)
	H48	10 (7-15)	12,5 (8-20)	17,5 (10-25)	20 (10-30)	15 (10-25)	5,5 (2-15)

*Tabelle 31: Gesamtmotilität von Hengst 7 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern*

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	17,5 (15-25)	17,5 (15-25)	20 (13-25)	17,5 (15-25)	17,5 (15-25)	15 (10-25)
	H24	12,5 (10-15)	12,5 (7-20)	12,5 (10-20)	12,5 (7-20)	10 (7-20)	8 (5-20)
	H48	10 (6-10)	10 (7-20)	9 (6-15)	10 (5-15)	6,5 (6-15)	8,5 (5-10)
EP	HO	15 (10-20)	7,5 (1-20)	8 (2-20)	10 (4-20)	10 (0-20)	10 (5-20)
	H24	2 (0-10)	2,5 (0-15)	0 (0-5)	2 (0-5)	3 (0-5)	3 (0-7)
	H48	1 (0-6)	1,5 (0-10)	0 (0-5)	2 (0-5)	2 (0-5)	2 (0-6)
Gent	HO	17,5 (15-25)	20 (15-30)	17,5 (15-25)	20 (10-25)	20 (12-25)	15 (10-20)
	H24	12,5 (10-20)	15 (10-25)	10,5 (2-15)	14 (5-20)	12,5 (5-20)	10 (5-10)
	H48	9 (7-15)	10 (8-20)	7,5 (2-10)	8,5 (2-10)	8,5 (2-10)	3,5 (1-10)
INRA 96	HO	17,5 (15-30)	17,5 (15-25)	15 (15-25)	15 (15-25)	15 (15-25)	10 (10-25)
	H24	10 (7-15)	12,5 (10-20)	10 (2-20)	10 (3-20)	10 (3-20)	10 (1-20)
	H48	5 (2-7)	10 (7-20)	10 (1-20)	7 (1-20)	7 (1-20)	5 (0-15)

*Tabelle 32: Vorwärtsmotilität von Hengst 7 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern*

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	12,5 (10-20)	12,5 (10-20)	15 (8-20)	12,5 (10-20)	12,5 (10-20)	7,5 (2-15)
	H24	7,5 (5-10)	7,5 (5-15)	7,5 (5-15)	7,5 (3-15)	6 (3-15)	3,5 (2-10)
	H48	4 (2-8)	6,5 (3-15)	5 (3-15)	7 (3-10)	4,5 (3-10)	3,5 (2-5)
EP	HO	10 (5-15)	3,5 (0-15)	6 (1-15)	7 (2-15)	5 (2-15)	3 (2-10)
	H24	0,5 (0-5)	1 (0-10)	0 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-3)
	H48	0,5 (0-3)	0,5 (0-8)	0 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-3)
Gent	HO	12,5 (10-20)	15 (10-25)	12,5 (10-20)	15 (8-20)	15 (10-20)	10 (2-15)
	H24	7,5 (3-10)	10 (3-20)	6,5 (1-10)	6,5 (3-15)	7,5 (2-15)	5 (1-5)
	H48	2,5 (2-5)	8 (2-15)	4,5 (1-7)	5 (0-7)	5 (0-7)	1,5 (0-5)
INRA 96	HO	12,5 (10-25)	12,5 (10-20)	10 (10-20)	10 (10-20)	10 (10-20)	5 (3-15)
	H24	5 (3-10)	7,5 (5-15)	5 (1-15)	5 (2-15)	5 (1-15)	2 (0-10)
	H48	2 (1-3)	6 (2-15)	4 (0-15)	5 (0-10)	5 (0-10)	1 (0-10)

*Tabelle 33: Gesamtmotilität von Hengst 8 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern*

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	50 (45-50)	42,5 (35-50)	40 (35-50)	42,5 (35-55)	40 (35-50)	37,5 (30-50)
	H24	25 (15-35)	30 (25-40)	25 (10-30)	25 (10-35)	25 (10-30)	27,5 (15-35)
	H48	22,5 (15-30)	27,5 (20-35)	17,5 (10-20)	20 (10-25)	20 (15-25)	17,5 (10-25)
EP	HO	47,5 (45-50)	40 (30-55)	37,5 (25-45)	40 (30-50)	40 (30-50)	40 (30-45)
	H24	27,5 (15-35)	25 (15-35)	17,5 (10-30)	20 (10-30)	22,5 (10-30)	20 (10-30)
	H48	20 (10-30)	22,5 (10-30)	12,5 (7-30)	15 (7-25)	15 (6-30)	15 (5-30)
Gent	HO	50 (45-55)	47,5 (40-55)	42,5 (25-55)	47,5 (30-55)	45 (30-50)	40 (30-45)
	H24	35 (30-40)	32,5 (25-45)	30 (20-35)	30 (20-35)	27,5 (20-35)	27,5 (20-30)
	H48	30 (20-35)	30 (20-45)	20 (10-30)	22,5 (10-30)	22,5 (15-30)	22,5 (15-30)
INRA 96	HO	50 (50-55)	45 (40-50)	45 (40-50)	45 (40-55)	47,5 (40-55)	45 (40-55)
	H24	35 (30-40)	35 (30-40)	30 (20-40)	32,5 (25-40)	32,5 (25-40)	25 (20-40)
	H48	25 (15-40)	27,5 (20-40)	25 (20-35)	27,5 (20-35)	27,5 (20-40)	22,5 (10-30)

*Tabelle 34: Vorwärtsmotilität von Hengst 8 bei unterschiedlicher Konfektionierung nach 0, 24 und 48 h gekühlter Lagerung. Angabe von Medianwerten sowie Minimum und Maximum in Klammern*

Verdün- ner	Halte dauer	HU 25	HZ 25	HZ 333 0% SP	HZ 333 5 % SP	HZ 333 20 % SP	HZ 333 80 % SP
BS	HO	45 (40-45)	37,5 (30-45)	35 (30-45)	37,5 (30-50)	35 (30-45)	22,5 (15-30)
	H24	20 (10-30)	25 (15-30)	17,5 (8-25)	17,5 (8-25)	20 (7-25)	17,5 (5-20)
	H48	17,5 (10-25)	22,5 (15-30)	10 (5-15)	12,5 (5-20)	12,5 (5-20)	7,5 (5-15)
EP	HO	40 (40-45)	32,5 (25-45)	32,5 (20-40)	35 (25-40)	32,5 (25-45)	20 (15-30)
	H24	22,5 (10-30)	20 (10-30)	12,5 (7-25)	12,5 (8-25)	15 (6-25)	10 (5-20)
	H48	15 (7-20)	17,5 (6-25)	9 (4-25)	10 (5-20)	10 (4-20)	5 (2-20)
Gent	HO	45 (40-50)	42,5 (35-50)	37,5 (20-50)	42,5 (25-50)	40 (25-45)	25 (15-35)
	H24	30 (20-35)	27,5 (20-40)	25 (15-30)	25 (15-30)	22,5 (15-30)	17,5 (10-20)
	H48	20 (10-25)	25 (10-35)	15 (5-25)	17,5 (5-25)	15 (10-25)	10 (5-20)
INRA 96	HO	45 (40-45)	37,5 (35-45)	40 (35-45)	40 (35-50)	40 (35-50)	35 (30-45)
	H24	30 (25-35)	30 (25-35)	25 (15-35)	27,5 (20-35)	27,5 (20-35)	15 (10-35)
	H48	17,5 (10-30)	22,5 (10-30)	20 (10-30)	22,5 (10-30)	22,5 (10-35)	12,5 (5-20)

## **Selbstständigkeitserklärung**

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

Berlin, den 11.11.2016

Julia Lübke



## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Johannes Handler gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die abwechslungsreiche und lehrreiche Doktorandenzeit. Vielen Dank für die ausgezeichnete Betreuung und den tatkräftigen Einsatz bei der Auswertung der statistischen Ergebnisse.

An dieser Stelle möchte ich auch Frau Dr. Stefanie Neuhauser für die kompetente Hilfe bei der Planung und Durchführung der Versuche sowie für die Unterstützung bei allen kleineren und größeren Problemen danken.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Pfleger Thomas, Ralf und Eike, die mir bei der Gewinnung der Ejakulate geholfen haben und ohne die meine Arbeit nicht hätte durchgeführt werden können. Auch Susi und Kay danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die stets fröhliche Zusammenarbeit, nicht nur im Labor. Es war eine lustige und schöne Zeit, an die ich gerne zurückdenke.

Von ganzem Herzen möchte ich mich auch bei meinen lieben Eltern bedanken, die während des Studiums und der Zeit der Dissertation immer für mich da waren und an mich geglaubt haben. Diese große Unterstützung, die bei Weitem nicht selbstverständlich ist, weiß ich sehr zu schätzen. Danke auch an meine beiden Geschwister Jan und Svenja, die immer für ein bisschen Aufmunterung und Abwechslung sorgten.

Schließlich danke ich meinem Freund Andi, der mir in allen Phasen dieser Arbeit verständnisvoll und unterstützend zur Seite stand. Ohne den Rückhalt und die fortwährende Motivation wäre ich heute nicht „Frau Doktor“.