

Aus der Chirurgischen Tierklinik  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. U. Matis

Angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. J. Braun

# **Künstliche Besamung beim Hund - Eine Literaturstudie und die Vorstellung zweier mit dem CASUS-System erstellten Lernfälle**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Ulrike Mittermeier  
München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Braun

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Zerbe

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literatur</b>	<b>2</b>
2.1	Spermagewinnung . . . . .	2
2.1.1	Untersuchung . . . . .	2
2.1.2	Möglichkeiten der Spermagewinnung . . . . .	3
2.2	Spermauntersuchung . . . . .	6
2.2.1	Parameter . . . . .	6
2.2.2	Konventionelle Untersuchungsmethoden . . . . .	9
2.2.3	Weiterführende Untersuchungsmethoden . . . . .	10
2.2.4	Funktionelle Tests . . . . .	19
2.3	Spermakonservierung . . . . .	21
2.3.1	Zentrifugation . . . . .	21
2.3.2	Verdüner . . . . .	22
2.3.3	Arten der Konservierung . . . . .	24
2.4	Künstliche Besamung . . . . .	29
2.4.1	Festlegung des Besamungszeitpunktes . . . . .	29
2.4.2	Besamungsdosis und Spermadeponierung . . . . .	31
2.4.3	Einfluss von Verdünnerzusätzen auf die Besamung mit kryokonservier- tem Sperma . . . . .	33
2.4.4	Besamungstechniken . . . . .	35
2.4.5	Nach der Besamung . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Lernfälle</b>	<b>38</b>
3.1	Allgemeines . . . . .	38
3.1.1	Erwartungen an die Lernfälle . . . . .	38
3.1.2	Lernfälle im Allgemeinen . . . . .	38
3.1.3	Der klinische Lernfall . . . . .	40
3.2	CASUS . . . . .	42
3.2.1	Autorensystem . . . . .	42
3.2.2	Abspielsystem . . . . .	46
3.2.3	Kursverwaltungs- und Evaluationssystem . . . . .	50
3.3	Zwei Lernfälle über die Künstliche Besamung beim Hund . . . . .	52

3.3.1	Spermagewinnung und Konservierung . . . . .	52
3.3.2	Intrauterinbesamung mit kryokonserviertem Sperma . . . . .	53
<b>4</b>	<b>Evaluierung</b>	<b>55</b>
4.1	Ziel der Evaluierung . . . . .	55
4.2	Fragebogen . . . . .	56
4.3	Durchführung der Evaluierung . . . . .	57
4.4	Auswertung . . . . .	57
4.4.1	Allgemeine Beurteilung des Lernfalles als Lehrmedium . . . . .	57
4.4.2	Beurteilung der fachlichen und didaktischen Aspekte der Lernfälle . .	62
4.4.3	Bedienbarkeit des Programms . . . . .	67
4.5	Fazit . . . . .	68
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>77</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>99</b>

# 1 Einleitung

Die Künstliche Besamung (KB) besitzt beim Nutztier schon lange Zeit eine große Bedeutung. Beim Hund hat sich die KB bis jetzt noch nicht durchgesetzt. Dies liegt zum Teil an dem Reglement der nationalen Hundezuchtverbänden und Vereinen, die den Einsatz der Besamung ablehnen oder stark reglementieren. Aus der Erfahrung mit anderen Tierarten kann man aber erwarten, dass sich langfristig auch beim Hund die KB durchsetzen wird.

Ziel dieser Arbeit war es, den momentanen Stand der Wissenschaft auf allen Teilgebieten der KB beim Hund aufzuzeigen. Dazu zählen die Spermagewinnung und- untersuchung, die Möglichkeiten der Samenkonservierung, die Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes bei der Hündin und die Techniken der Sameneinführung.

Im zweiten Teil der Arbeit werden zwei Lernfälle als CASUS-Programm zur Aus-, Fort- und Weiterbildung von Studenten der Tiermedizin und praktischen Tierärzten präsentiert. CASUS-Lernfälle stellen eine Form des E-Learnings dar, das der reinen Wissensvermittlung und Wissensüberprüfung dient. Hier sollte ein Lernfall die Teilschritte der KB auf der männlichen Seite (Spermagewinnung, -untersuchung und -konservierung) erklären, der zweite Lernfall beschäftigt sich mit der Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes und der Technik der Sameneinführung beim weiblichen Tieren.

## 2 Literatur

Die künstliche Besamung besitzt seit Jahren einen hohen Stellenwert in der Fortpflanzung von Menschen und Haustieren. Während sie beim Menschen dazu dient, die Unfruchtbarkeit zu umgehen, wird sie beim Haustier gezielt zur Zucht verwendet. In der Rinder-, und Pferdezucht gehört die künstliche Besamung schon lange zur täglichen Arbeit eines Tierarztes. Beim Hund überwiegt bisher der Natursprung. Deshalb wurden die verschiedenen Bereiche der künstlichen Besamung bei Rindern, Schweinen und Menschen im Gegensatz zum Hund bis dato mehr erforscht. Einige der Ergebnisse anderer Gattungen können für den Hund übernommen werden. Doch jede Tierart hat ihre Besonderheiten. Die folgenden Kapitel werden auf die Erkenntnisse der Forschung über die künstliche Besamung beim Hund der vergangenen zehn Jahre eingehen. Sie sollen einen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung geben.

### 2.1 Spermagewinnung

Die gewünschte Verbindung zwischen Zuchttieren zu schaffen, ist oft aus logistischen oder Sympathiegründen nicht möglich. Die künstliche Besamung ist meist die einzige Möglichkeit, diese Probleme zu umgehen. Der erste Schritt einer jeden künstlichen Besamung ist die Spermagewinnung. Im Gegensatz zu anderen männlichen Caniden, die ein saisonales Zuchtgeschehen aufweisen, kann der Rüde jederzeit abgesamt werden. Lediglich in den Sommermonaten wurde ein leichter Rückgang der Spermaproduktion festgestellt [120].

#### 2.1.1 Untersuchung

Vor der Spermagewinnung sollte der Rüde auf gesundheitliche und geschlechtliche Zuchttauglichkeit untersucht werden. Wichtig sind dabei Erbgesundheit, allgemeine Gesundheit, Geschlechtsgesundheit, Begattungs- und Befruchtungsfähigkeit [86].

Einer kurzen Allgemeinuntersuchung folgt die andrologische Untersuchung. Mit dieser wird das Freisein von Erkrankungen der Genitale einschließlich Genitalinfektionen durch Adspektion und Palpation von Hoden, Nebenhoden, Skrotum, Prostata, Penis und Präputium überprüft. Da sich auch im Genitaltrakt gesunder Rüden vor allem im Präputium und an der Glans penis, eine Vielzahl an Bakterien (z.B. *Staphylococcus intermedius*, *E. coli*, *Brucella canis*,...) befinden, ist zusätzlich eine mikrobiologische Untersuchung zu empfehlen. Einige

dieser Bakterien können auf die Hündin übertragen werden und zu klinischen Krankheitssymptomen und Fortpflanzungsstörungen führen [86]. Ein Beispiel hierfür ist das gramnegative Bakterium *Brucella canis*. Die Brucellose verläuft beim Rüden oft symptomlos. Sie kann aber auch zur ein- oder beidseitigen Testitis führen. Selbst bei symptomfreien Verläufen jedoch, wird es mit dem Sperma übertragen, und führt bei der Hündin zum Abort um den 50.Tag [208].

Durch die Beobachtung der Paarungsreflexkette kann die Begattungsfähigkeit des Rüden beurteilt werden. Die Paarungsreflexkette wird durch bestimmte Reize, vor allem aber durch die Anwesenheit einer läufigen Hündin induziert. Sie setzt sich aus der Libido (Reaktionszeit zwischen Kontaktaufnahme und Aufsprungversuch) und dem Ablauf der Paarungsreflexe (Vorspiel, Erektion, Aufsprung,...) zusammen [86]. Eine hier beobachtete verringerte Libido kann innere und äußere Ursachen haben. Innere Ursachen können Störungen des Allgemeinbefindens, Veränderungen des Hormonhaushaltes oder psychische Ursachen (z.B. Angst) sein. Als äußere Ursachen wirken die vorgegebenen Räumlichkeiten, die anwesenden Personen und die Hündin (Dominanzverhalten) auf den Rüden ein. Deshalb sind ein ruhiger, etwas abgedunkelter Raum, sowie ein stressfreier Umgang mit dem Rüden Voraussetzung für eine erfolgreiche Spermagewinnung. Der Spermagewinnung folgt eine ausführliche Untersuchung des Ejakulats und der einzelnen Samenzellen. Erst dieses Ergebnis erlaubt eine Aussage über die zu erwartende Befruchtungsfähigkeit des Spermas [86].

## 2.1.2 Möglichkeiten der Spermagewinnung

Allgemein unterscheidet man zwei grundlegende Möglichkeiten der Spermagewinnung. Zum einen kann Sperma durch Kastration epididymal gewonnen, zum anderen während der Ejakulation aufgefangen werden. Schon in den 50er Jahren beschäftigten sich Foote [68] und andere Wissenschaftler mit den Möglichkeiten der Spermagewinnung. Nachdem einige Methoden untersucht und beurteilt wurden, kristallisierte sich die manuelle Spermagewinnung, die zur Gewinnung von Sperma durch Ejakulation zählt, als die vorherrschende Technik heraus. Diese wurde in den vergangenen Jahren lediglich modifiziert. Der folgende Absatz wird einen kurzen Überblick über alle bekannten Techniken geben.

### Epididymale Spermagewinnung

Die epididymale Spermagewinnung erfolgt immer zusammen mit einer Kastration, da dafür die Hoden des Rüden benötigt werden. Nach der Entfernung der Hoden, wird der Nebenhoden abgetrennt. Wenn die Ducti epididymidis freigelegt sind, werden sie mit einer Spritze durchgespült. Das Sperma wird am anderen Ende des Ductus in einem Gefäß aufgefangen. Die epididymale Spermagewinnung erfordert eine Kastration, was eine weitere Verwendung des Rüden zur Zucht unmöglich macht [101]. Außerdem ist das Ejakulat, das in frischem Zustand eine gute Qualität aufweist, besonders kurzlebig und zur Konservierung nur schlecht geeignet. Obwohl diese Art der Spermagewinnung damit zwei große Nachteile besitzt, versuchten Wissenschaftler immer wieder diese Methode, und insbesondere die Nachbereitung

des Spermas zu verbessern.

Ponglowhapan [180] beispielsweise ist der Meinung, dass die epididymale Spermagewinnung bei plötzlich verstorbenen Rüden zur Erhaltung der Art von Bedeutung sein könnte. Deshalb versuchte er in seiner Studie herauszufinden, in wie weit es möglich ist, epididymal gewonnenes Sperma zu konservieren. Er verwendete dafür zwanzig gesunde Hunde und den üblichen Tris-Glucose-Eigelb Verdünner (siehe Abschnitt 2.3). Mit Hilfe der Spermauntersuchung (siehe Abschnitt 2.2) beurteilte er Motilität, Membranintegrität und Akrosomenreaktion. Im Vergleich zu ejakuliertem Sperma, dessen Gewinnung im nächsten Abschnitt erklärt wird, erhielt er folgende Ergebnisse. Beim Epididymalsperma nahm die Motilität schon in den ersten Tagen schnell ab. Das Ejakulat dagegen behielt bis zu acht [180, 222] oder zehn [236] Tagen eine ausreichende Qualität. Die Kryokonservierung von Epididymalsperma führte zu schlechten Ergebnissen. Sowohl Motilität als auch Membranintegrität waren mindestens auf ein Drittel reduziert. Die Kryokonservierung eines Ejakulats war jedoch gut möglich. Dabei machte es wiederum keinen Unterschied, ob das Sperma sofort nach der Gewinnung oder nach zwei bis vier Tagen Kühlung kryokonserviert wurde. Trotz dieser Ergebnisse bestrebte Ponglowhapan die Wiederholung seiner Versuche unter optimalen Bedingungen mit dem Einschluss von *in vitro* Experimenten, um einen Eindruck von der Funktionalität des konservierten Spermas zu gewinnen.

### **Spermagewinnung durch Ejakulation**

Eine Ejakulation kann beim Natursprung, oder mittels Stimulation durch Elektroden, durch eine künstliche Vagina, oder manuell erfolgen.

Nach Foote [68] kann die Elektroejakulation bei Hunden eingesetzt werden, die auf keinem anderen Wege zu einer Ejakulation angeregt werden können. Da diese jedoch eine Anästhesie des Rüden erfordert, ist sie für eine Verwendung in der Zucht mit häufiger Spermagewinnung nicht geeignet.

Ebenfalls bei Foote [68] ist die Verwendung einer künstlichen Vagina beschrieben. Diese erfordert allerdings einen hohen Aufwand an Gerätschaften, die wegen den verschiedenen Hunderassen in unterschiedlichen Größen vorliegen müssen.

Bis heute hat sich die Spermagewinnung mit manueller Stimulation durchgesetzt. Sie benötigt nur wenig Hilfsmittel, ist einfach mit einer sauberen Trennung der drei Fraktionen durchzuführen, hygienisch einwandfrei und wiederholbar [86].

Für einen erfolgreichen Ablauf der manuellen Samengewinnung ist ein ruhiger, abgedunkelter Untersuchungsraum von Vorteil. Der Rüde muss sich wohl fühlen, und darf nicht durch eine unnötig hohe Anzahl an Personen beunruhigt werden. Benötigt werden drei auf 38°C vorgewärmte Gläser, Papiertücher für die Reinigung des Präputiums und nicht spermizide Handschuhe [7, 86]. Besonders beim unerfahrenen Rüden ist die Anwesenheit einer Hündin

im Proöstrus oder besser noch im Östrus notwendig, um die Libido des Rüden zu erregen [121].

Die manuelle Spermagewinnung wurde bereits von verschiedenen Wissenschaftlern beschrieben [207, 86, 127]. Kutzler [121] fasste diese, sich sehr ähnelnden Verfahren in einem Review zusammen. Für die Spermagewinnung wird der Rüde mit einer läufigen Hündin zusammengebracht. Sobald der Rüde Interesse an der Hündin zeigt, wird die Eichel mit leichtem Druck durch das Präputium hindurch massiert. Beginnt der Bulbus glandis anzuschwellen, muss das Präputium zurückgeschoben werden. Dies ist ein entscheidender Schritt bei der Absamung. Wenn der Operateur diesen Moment verpasst, lässt sich das Präputium wegen des geschwellenen Bulbus nicht mehr zurückschieben. In dem Fall müsste der Rüde von der Hündin entfernt werden. Mit der Spermagewinnung kann dann erst fortgefahren werden, wenn die Erektion des Rüden wieder vollständig abgeklungen ist. Wenn das Präputium rechtzeitig hinter den Bulbus geschoben wurde, wird leichter Druck auf den Penis ausgeübt. Dies geschieht, indem direkt proximal des Bulbus ein Ring aus Daumen und Zeigefinger gebildet wird. Auf diesen Druck hin, beginnt der Rüde mit der Ejakulation. Die ersten Tropfen werden sogleich in einem Gefäß aufgefangen. Beginnt der Hund eines seiner Hinterbeine zu heben, sollte ihm der Operateur beim Umsteigen helfen, und dreht den Penis dabei um 180° nach hinten. Die zweite, trübe und spermienreiche, sowie die dritte, wieder klare Fraktion werden getrennt voneinander in den nächsten beiden Gläsern aufgefangen. Am Ende der Absamung wird der Penis mit einer antibiotikahaltigen Salbe behandelt, um ihn vor Entzündungen zu schützen.

## 2.2 Spermauntersuchung

Die Spermauntersuchung soll dazu dienen, eine Aussage über die Fertilität des jeweiligen Ejakulats treffen zu können. Eine sehr gute Spermaqualität geht in der Regel mit einem zufriedenstellenden Befruchtungsergebnis einher, eine Schlechte dagegen mit einem unbefriedigenden Befruchtungsergebnis [173]. Um Qualität und Funktion eines Ejakulats beurteilen zu können, müssen verschiedene Parameter ermittelt werden. Die Parameter unterscheiden sich zwar in Ihrer Aussagekraft. Keiner der Parameter erlaubt jedoch eine sichere Vorhersage über das Befruchtungsergebnis [9, 173]. Da sich das Sperma durch die Konservierung ändern kann, sollte kurz vor der Besamung noch einmal eine Spermauntersuchung durchgeführt werden, um realistische Vorhersagen für dessen Fertilität treffen zu können [87, 241].

### 2.2.1 Parameter

Die Spermauntersuchung erfolgt in zwei Stufen durch die makroskopische und mikroskopische Untersuchung. Diesen Untersuchungen können sich funktionelle Tests anschließen.

Die makroskopische Untersuchung des gewonnenen Spermias schließt die Beurteilung der Parameter Volumen, Erscheinung und Farbe der drei Fraktionen mit ein. Anschließend erfolgt die mikroskopische Untersuchung der zweiten, spermienreichen Fraktion. Hier werden sämtliche Motilitäts- (siehe Abschnitt 2.2.1.1) und Morphologieparameter (siehe Abschnitt 2.2.1.2) bestimmt. Funktionelle Tests beurteilen schließlich die Verhaltensparameter der Spermien unter in-vitro Bedingungen (siehe Abschnitt 2.2.4). Bei diesen Tests werden Spermien meist auf unterschiedliche Art und Weise in Kontakt mit der Eizelle gebracht, um deren Reaktion zu überprüfen.

Im folgenden Abschnitt wird auf die wichtigsten Parameter eingegangen.

#### 2.2.1.1 Motilität

Die Motilität ist einer der am Häufigsten untersuchten Parameter. Zur Motilitätsbestimmung wird die (Vorwärts-)Beweglichkeit der Spermien untersucht. Sie gilt als einer der aussagekräftigsten Parameter für die Fertilität. Da die Beweglichkeit eines Spermiums eine intakte Struktur und Funktion voraussetzt, korreliert sie positiv mit Morphologie und Membrintegrität [118, 119, 173, 122, 128, 71].

Die (Vorwärts-)Beweglichkeit kann sowohl mit konventionellen Methoden, wie der Lichtmikroskopie, als auch mit modernen Techniken wie den CASA-Systemen, beurteilt werden. Während CASA-Systeme (computer assistierte Samenanalyse - System) mit der Messung verschiedener Bewegungsparameter eine objektive und präzise Beschreibung der Motilität der Samenzellen liefern, gibt die Lichtmikroskopie einen subjektiven Überblick über die Aktivität der Spermprobe.

### 2.2.1.2 Morphologie

Morphologischen Defekten liegen fehlerhafte Vorgänge in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Spermien vor der Ejakulation zu Grunde. Die Defekte finden sich sowohl in der Schwanzregion, als auch im Kopfbereich eines Spermiums. Dementsprechend können die Defekte nach ihrer Lokalisation eingeteilt werden [33, 173]. Ihre Entstehung beruht auf Fehlern in der Spermatogenese, oder pathologischen Vorgängen, die auf dem Weg durch Nebenhoden und Ductus deferens auf die Samenzelle einwirken. Veränderungen, deren Ursache in Spermatogenesefehlern begründet ist, werden als primäre Defekte, Veränderungen, die ihren Ursprung bei der Reifung im Nebenhoden oder Ductus deferens haben, als Sekundäre Defekte bezeichnet [158, 173]. Die Einteilung der Defekte kann folglich nicht nur nach deren Lokalisation im Kopf- oder Schwanzbereich, sondern auch nach ihrer Entstehung in primäre und sekundäre Defekte erfolgen [33, 173].

Es ist möglich, dass sich nicht jeder morphologische Defekt negativ auf die Fertilität auswirkt. Primäre Veränderungen beeinflussen die Qualität des Ejakulats mehr als Sekundäre [173]. So wird von sekundären Defekten, wie dem proximalen Tropfen angenommen, dass sie die Fertilität kaum beeinträchtigen [147, 173]. Liegt der Anteil morphologisch veränderter Spermien jedoch über 40 Prozent, dann ist auch bei sekundären Veränderungen ein deutlich schlechteres Befruchtungsergebnis zu erwarten [158, 173]. Nach Johnston [110, 173] sollten im Hundeejakulat mindestens 80 Prozent morphologisch intakte Spermien sein.

Die Ursachen für die Entstehung morphologischer Defekte sind vielfältiger Natur. Medikamentelle Behandlungen beeinflussen die Entwicklung eines Spermiums ebenso wie Hitze, Stress und hormonelle Imbalancen [173]. Morphologische Veränderungen können mit verschiedenen Untersuchungen erkannt werden. Meistens wird das Ejakulat dabei mit Hilfe verschiedener Färbemethoden untersucht [173]. Neben der subjektiv visuellen Beurteilung des Ejakulats auf morphologische Defekte, bieten sich CASA-Systeme als objektive Untersuchungsmethoden an [173].

### 2.2.1.3 Konzentration

Die Konzentration an Spermien beurteilt als einziger Parameter nicht die Qualität, sondern ausschließlich die Quantität der Spermien im Ejakulat. Sie gehört neben der Motilitäts- und Morphologiebestimmung zu den wichtigsten Parametern der Spermauntersuchung. Die Konzentration wird in den meisten Fällen mit dem Lichtmikroskop unter Verwendung verschiedener Zählkammern gemessen. Eine Auswertung mit CASA-Systemen ist möglich, jedoch oft mit, durch die Bewegung der Spermien verfälschtem Ergebnis.

### 2.2.1.4 Membranintegrität

Die Membranintegrität beschreibt den Zustand der Plasmamembran. Eine intakte Plasmamembran ist essentiell für die Funktion eines Spermiums [119, 83]. Sie ermöglicht seine Kapazitation (Umbauprozess in der Gebärmutter der Hündin, der den Kontakt mit der Eizelle

ermöglicht) und später die Akrosomenreaktion (Reaktion des Spermiums auf den Kontakt mit der Eizelle). Diese sind Voraussetzungen für das Überleben des Spermiums in Gebärmutter und Eileiter, sowie für ein Eindringen des Spermiums in die Eizelle. Nach Check [173] erlaubt die Membranintegrität deshalb Rückschlüsse auf das zu erwartende Befruchtungsergebnis.

Die Plasmamembran reguliert auch die osmotischen Verhältnisse einer Samenzelle [109, 83]. Dies wird beim Hypoosmotischen Schwelltest (HOST) ausgenutzt. Mit diesem funktionellen Test kann die Intaktheit der Membran überprüft werden. Neben dem HOST besteht die Möglichkeit, die Membranintegrität mittels konventioneller, nicht fluoreszierender Färbungen wie der Eosin/Negrosin-Färbung, oder moderneren Fluoreszenzfärbungen mit CFDA (Carboxyfluorescein Diacetet) und PI (Propidium Jodid), zu bestimmen [195, 173].

### 2.2.1.5 Kapazitation

Die Kapazitation ist ein biochemischer Umbauprozess. Bei diesem wird eine Schutzhülle aus Glykoproteinen, die sich an der Kopfmembran der Spermien befindet, entfernt [82]. Wichtige Enzyme und Proteine, die eine Akrosomenreaktion ermöglichen, werden dabei frei [97, 190].

Kapazitierte Spermien zeichnen sich durch Hyperaktivität (siehe 2.2.1.6) aus. Diese Hyperaktivität kann mit dem Lichtmikroskop [113, 173], wie mit CASA-Systemen erkannt werden [235]. Daneben weist auch eine erfolgte Akrosomenreaktion (siehe Abschnitt 2.2.1.6) auf eine bereits geschehene Kapazitation hin, da sie diese voraussetzt [249, 173].

### 2.2.1.6 Akrosomenreaktion

Trifft ein kapazitiertes Spermium auf eine Eizelle, dann verändert sich das Spermium strukturell und funktional. Diese Veränderungen werden unter dem Begriff Akrosomenreaktion zusammengefasst [39, 83]. Das Akrosom besteht aus verschiedenen Proteinen und Enzymen. Eines dieser Proteine an der Oberfläche des Akrosoms nimmt Kontakt mit dem ZP3 (Protein der Eizelle) der Zona pellucida auf. Danach können Enzyme des Akrosoms die Zona Pellucida auflösen. Erst nach dieser sogenannten Akrosomenreaktion kann das Spermium die Zona pellucida durchdringen [112]. Anschließend fusioniert die Plasmamembran der Samenzelle mit der Plasmamembran der Eizelle [83, 112]. Beim Zusammentreffen eines nicht kapazitierten Spermiums und der Eizelle, geschehen keine Veränderungen an der Spermienmembran. Das Spermium kann nicht eindringen.

Die Akrosomenreaktion kann sowohl konventionell mit nicht fluoreszierenden Färbungen wie Giemsa [167], Trypan blue/Bismark brown/Rose Bengal [168], Spermac [97, 159] aber auch auf modernem Wege mit fluoreszierenden Färbungen untersucht werden [39, 190]. Wichtig ist dabei der Ausschluss von toten Zellen, da bei diesen das Akrosom bereits reagiert haben

könnte (siehe Abschnitt 2.2.3.1).

## 2.2.2 Konventionelle Untersuchungsmethoden

Obwohl es inzwischen sehr viele Neuentwicklungen auf dem Gebiet der Spermauntersuchung gibt, sind für die Untersuchung in der Praxis die konventionellen Verfahren (makroskopische und mikroskopische Untersuchung) nach wie vor von entscheidender Bedeutung.

Zu den konventionellen Untersuchungsmethoden zählen makroskopische wie mikroskopische Untersuchungsmethoden. Trotz vieler Neuentwicklungen auf dem Gebiet der Spermauntersuchung, die sich in der Verfügbarkeit von moderneren und objektiveren Techniken äußern, greifen Wissenschaftler wie Praktiker häufig auf konventionelle Techniken zurück. Da für die tierärztliche Praxis CASA-Systeme wegen der hohen Anschaffungskosten und dem großen Aufwand meist unrentabel sind, wird das Sperma dort nach wie vor fast ausschließlich konventionell beurteilt. In der Wissenschaft werden konventionelle Untersuchungsmethoden auch dazu benötigt, den Vergleich von Ergebnissen neuerer Methoden mit vergangenen Ergebnissen herstellen zu können.

Im Folgenden wird auf die wesentlichen makroskopischen und mikroskopischen Untersuchungsmethoden eingegangen.

### 2.2.2.1 Makroskopische Untersuchungen

Die makroskopische Untersuchung des gewonnenen Spermas schließt die Beurteilung von den Parametern Volumen, Erscheinung und Farbe der drei Fraktionen mit ein. Bei der Spermagewinnung werden die Fraktionen getrennt voneinander in Glasgefäßen mit Maßeinheit aufgefangen (siehe Abschnitt 2.1.2). Die erste und dritte Fraktion sollten durchsichtig und klar sein, die zweite Fraktion ist wegen der hohen Anzahl an Spermien weißlich-trüb. Alle drei dürfen keine Fremdbestandteile beinhalten. Mit dieser Untersuchung können bereits grobe Veränderungen, wie Eiterflocken oder Blutspuren, aber auch Sperma mit einer geringen Konzentration an Samenzellen festgestellt werden.

### 2.2.2.2 Mikroskopische Untersuchungen

Die mikroskopische Untersuchung ist eine der ältesten Untersuchungsmethoden. Sie bietet vielfältige Möglichkeiten die Samenzellen zu untersuchen, ist einfach auszuführen und kostengünstig.

Für die Untersuchung der Motilität wird eine Wärmeplatte benutzt, um die Vitalität der Spermien zu fördern. Da man dabei ungefärbte Präparate verwendet, ist ein Phasenkontrastmikroskop sehr hilfreich. Das Phasenkontrastmikroskop ist eine besondere Art des Lichtmikroskops. Bei diesem ist das Mikroskop zusätzlich mit Phasenring und Ringblende ausgestattet. Es erlaubt die Untersuchung von ungefärbten und lebenden Zellen. Mahi [134] beurteilte

damit z.B. auch die Akrosomenreaktion bei lebenden Spermien. Vergleichbare Ergebnisse für die Motilität sind nur bei einer exakten Einstellung der Temperatur (meist auf 37°C) der Platten gewährleistet. Die Auswertung erfolgt nach Einschätzung des Untersuchers, der dazu viel Erfahrung benötigt.

Bei der Beurteilung der Morphologie wird ein gefärbter Ausstrich hergestellt. Je nach zu untersuchendem Parameter stehen verschiedene Färbetechniken zur Verfügung. In der Regel wird eine Anzahl von 100 - 300 Spermien beurteilt und bei diesen der Anteil der verschiedenen morphologischen Anomalien bestimmt. Das sind zum Beispiel die bekannten Lebend-Tot-Färbungen mit Eosin-Aniline Blue, Trypan-Blue und Eosin-Negrosin zur Bestimmung des Anteils lebender Spermien [173]. Letztere ist die am meisten verwendete Lebend-Tot-Färbung [173]. Mit dieser wird der Anteil lebender Spermien bestimmt. Lebend-Tot-Färbungen können auch in Kombination mit Färbungen des Akrosoms dazu dienen, eine Aussage über Aktivität und Morphologie des Ejakulats, sowie spezielle Akrosomendefekte zu treffen. Beispiel dafür ist die Trypan-Blue/Giemsa-Färbung [46]. Allerdings können diese Färbungen nur bei Sperma ohne Verdünner durchgeführt werden, was die Untersuchung von kryokonserviertem oder gekühltem Sperma unmöglich macht.

Neben Motilität und Morphologie der Spermien kann auch die Konzentration der Samenzellen im Ejakulat gut mit dem Lichtmikroskop bestimmt werden. Für die Auswertung stehen verschiedenen Zählkammern wie die Markler- [235] oder die Thomas-Neu-Zählkammern [86] zur Verfügung.

Nachteil der konventionellen Untersuchungsmethoden ist die Subjektivität der Messung [202, 173]. Das Ergebnis hängt stark von den Einschätzungen und der Erfahrung des Untersuchers, sowie den vorhandenen Gerätschaften ab. Da die Zellen von Hand ausgezählt und analysiert werden müssen, ist auch die Anzahl der untersuchten Spermien stark eingeschränkt [190, 167].

### 2.2.3 Weiterführende Untersuchungsmethoden

Moderne Untersuchungsmethoden basieren in der Regel auf Fluoreszenzfärbungen oder computergesteuerten Analyseverfahren. Sie ermöglichen im Vergleich zu konventionellen Untersuchungsmethoden eine objektivere und exaktere Untersuchung des Ejakulats. Oftmals kann mit diesen gleichzeitig eine sehr hohe Anzahl an Spermien untersucht werden, was einen besseren Überblick über das Ejakulat erlaubt.

#### 2.2.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

Mit der Fluoreszenzmikroskopie können der Lebend-Tot-Status von Samenzellen wie auch der akrosomale Status bzw. die Kapazitation erfasst werden.

Fluoreszierende Farbstoffen senden, wenn sie angestrahlt werden, Licht mit einer bestimmten Wellenlänge aus. Sie binden sich an Zellen mit bestimmten Eigenschaften oder an einzelne Strukturen der Zellen (Plasmamembran, Akrosom etc.). PI (Propidium Jodid) kann z.B. nur tote Zellen penetrieren. Diese färben sich daraufhin rot, wodurch eine Unterscheidung von toten und lebenden Zellen möglich wird. In den letzten zehn Jahren wurden einige Fluoreszenzfärbungen für die Untersuchung von Membranintegrität, Kapazitation und Akrosomenreaktion entwickelt [190]. Gegenüber nicht fluoreszierenden Färbungen reagieren sie sensitiver auf den Zustand der Spermien.

Rijsselaere und Chalah [185, 30] verglichen die Doppelfärbung SYBR-14/PI mit der am meisten verwendeten Lebend-Tot-Färbung Eosin Negrosin. Dabei stellte sich heraus, dass der Zustand der Spermamembran durch die Fluoreszenzfärbung deutlich effektiver dargestellt wurde, da diese schon kleine Schäden in der Membran erkannte. Außerdem banden Fluoreszenzfarbstoffe gezielt an die Samenzellen, während die Eosin-Negrosin Färbung nicht zwischen Spermien und Fettpartikeln oder anderen Fremdbestandteilen im Ejakulat unterschied.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie kann, ähnlich wie bei der Beurteilung von gefärbten Ausstrichen nur eine relativ kleine Anzahl von Spermien untersucht werden. Die Durchflusscytometrie dagegen ist ein Analyseverfahren zur quantitativen Auswertung von mit Fluoreszenzfarbstoffen gekennzeichneten Samenzellen. Dabei werden einige Tausend Spermien pro Sekunde vollautomatisch untersucht und das Ergebnis elektronisch ausgewertet. Nach Pena [167, 170] stimmen die Ergebnisse der Durchflusscytometrie gut mit denen der Fluoreszenzmikroskopie überein. Mit diesem quantitativen Verfahren kann eine hohe Anzahl an Zellen in kurzer Zeit mit großer Genauigkeit untersucht werden. Mit der Durchflusscytometrie kann beim Hund in der Regel nur nativer Samen, nicht aber mit Verdünnern versetzte Samenportionen untersucht werden, da die sehr kleinen Hundespermien leicht mit Partikeln aus dem Verdünner verwechselt werden können [168].

Sowohl die Durchflusscytometrie als auch die Fluoreszenzmikroskopie sind objektive Untersuchungsmethoden, die die Ergebnisse der verschiedenen Labore vergleichbar machen und nicht nur auf den Erfahrungen des jeweiligen Untersuchers aufbauen.

**2.2.3.1.1 Doppelfärbung** In vielen Fällen wird bei der Untersuchung mit Fluoreszenzfarbstoffen eine Doppelfärbung durchgeführt. Einer der Farbstoffe grenzt alle toten Spermien ab. Der zweite Farbstoff lagert sich an alle Spermien mit der gesuchten Eigenschaft an. Gezählt werden die Spermien, bei denen ausschließlich der zweite Farbstoff leuchtet. Im folgenden Abschnitt werden drei Parameter dargestellt, die mit Hilfe solcher Doppelfärbungen bestimmt werden können.

Membranintegrität:

Einige Färbungen erlauben eine Aussage über die Membranintegrität. Zur Verfügung stehen beispielsweise Carboxyfluorescein Diacetat/Propidium Jodid CFDA/PI [190, 167], SYBR-

14(ein fluoreszierender Nukleinsäurestrang)/PI, Carboxy-Seminaphthorfluor/Propidium Jodid Carboxy SNARF/PI, Calcein-AM mit Ethidium Homodimer Calcein-AM/Eth-1 und Hoechst (Bisbenzimid). CFDA und SYBR-14 sind anfangs nicht-fluoreszierende Farbstoffe für die die Zellen permeabel sind. Sie dringen in die Zelle ein und senden nach ihrer Veränderung durch zelleigene Esterasen grünes Licht aus [167, 30]. Meist werden sie in Verbindung mit PI verwendet, das ausschließlich die beschädigte Membran toter Zellen penetriert, den grünen Farbstoff verdrängt, und die Zelle rot färbt [167].

Chalah [73] untersuchte 1998 die Fluoreszenzfärbung SYBR-14/PI. Dazu verglich er diese mit der Eosin/Negrosin Färbung. Seine Studie führte er mit 30 Hunden durch, wobei er frisches und tiefgefrorenes Sperma untersuchte. Die SYBR-14/PI Färbung zeigte schon nach kurzer Zeit ein starkes Absinken der Vitalität des frischen Spermas. Nach vier Stunden lag sie nur noch bei 70 Prozent, während die konventionelle Vitalfärbung mit Eosin/Negrosin immer noch einen Anteil lebender Spermien von 90 Prozent über die nächsten 24 Stunden anzeigte. Auch für kryokonserviertes Sperma war das Ergebnis nach 4 Stunden Lagerungsdauer mit beiden Färbungen deutlich unterschiedlich. Erst nach 24 Stunden glichen sich die Werte für beide Färbungen wieder an. Chalah schloss daraus, dass die SYBR-14/PI Färbung im Vergleich zur Eosin/Negrosin Färbung empfindlicher auf Veränderungen der Spermienmembran reagiert und damit eine genauere Aussage über die aktuelle Vitalität und Mortalität der Spermien erlaubt.

Kapazitation:

Die Kapazitation ist ein biochemischer Umbauprozess, bei dem neben wichtigen Enzymen und Proteinen auch Ca-Ionen frei werden [186, 175]. Der Fluoreszenzfarbstoff CTC (Chlortetracylin) bindet an diese freiwerdenden Ca-Ionen. Je mehr Ca-Ionen frei werden, desto größer wird die Intensität des Fluoreszenzsignals, die mit dem Grad der Destabilisierung der Spermienmembran korreliert [85].

Hewitt [97] unterschied mit dieser Färbung drei Funktionszustände der Samenzellen: nicht kapazitiert mit intaktem Akrosom (F-Pattern), kapazitiert mit intaktem Akrosom (B-Pattern) und kapazitiert mit reagiertem Akrosom (AR-Pattern). Um tote Samenzellen abgrenzen zu können, wird diese Färbung in Kombination mit Hoechst 33257 verwendet, das nur in tote Zellen eindringen kann und diese blau färbt [97, 198, 192].

Akrosomenstatus:

Die Akrosomenreaktion ist Voraussetzung für das Eindringen des Spermiums in die Eizelle. Neben nicht-fluoreszierenden Färbungen werden Fluoreszenzfärbungen zur Beurteilung des Akrosoms eingesetzt. Diese gelten allgemein als kontrastreicher als andere Färbungen. Sie spielen daher eine führende Rolle in der Unterscheidung von Spermien mit intaktem oder reagiertem Akrosom [39]. Lektine (z.B. FITC (Fluorescein-Isothiocyant)) mit einem fluoreszierenden Isothiocyant wie Peanut Agglutinin (PNA) binden an Glykoproteine der äußeren Akrosomenmembran [212, 219, 114]. Während Spermien mit intaktem Akrosom nach der Färbung stark fluoreszieren, färbt sich das reagierte Akrosom nicht. Die Zelle fluoresziert

nicht mehr, oder nur teilweise [212, 112, 190]. Auch die FITC-PNA-Färbung kann, wie die CTC-Färbung, mit Hoechst 33258 kombiniert werden, um tote Zellen abzugrenzen [112, 190].

Neben der Fluoreszenzfärbung besteht auch die Möglichkeit der Immunofluoreszenzfärbung über monoklonale oder polyklonale Antikörper [112, 22, 190] oder, wie oben beschrieben, über die CTC-Färbung [85, 190]. Laut Guerin soll die CTC-Färbung sehr verlässliche Angaben über den Akrosomenstatus geben.

Hewitt [97] beschrieb die CTC-Färbung in Kombination mit Hoechst 33258. Für ihn war diese Methode durch die Einteilung in drei Patterns (s.o.) sogar der Triplefärbung überlegen, da mit nur einer Färbung, Akrosomenreaktion und Kapazitation bestimmt werden können [41].

**2.2.3.1.2 Triplefärbung** Die Triplefärbung ist eine Kombination aus drei Fluoreszenzfarbstoffen, die auf die Samenzellen einwirken. Wie schon oben beschrieben, unterscheidet die FITC-PSA (Pisum Sativum Agglutinin) -Färbung zwischen Zellen mit intaktem und reagiertem Akrosom [80, 12, 168]. Diese Färbung kann z.B. mit Carboxy-SNARF/PI kombiniert werden [168, 190]. Während Carboxy-SNARF nur Zellen mit funktionierender Membran anfärbt, kann PI nur in tote Zellen eindringen, und färbt diese rot (s.o.). Diese Färbung unterscheidet also (1) tote Spermien, (2) Lebende mit funktionierender Membran und (3) Lebende mit intaktem Akrosom.

Pena [168] testete die Triplefärbung am Ejakulat von zehn Hunden, die mit zwei unterschiedlichen Kryokonservierungsprotokollen, die dafür bekannt sind, dass sie die Fertilität des Spermas gut erhalten [217], eingefroren worden waren. Nach dem Auftauen wurden die Samenzellen mit Hilfe der Triplefärbung und der CFDA/PI-Färbung auf Membranintegrität und Akrosomenstatus untersucht. Die Auswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop und dem Durchfluscytometer. Ein Vergleich der Färbungen ergab eine große Übereinstimmung. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Ström [217]. Die gute Korrelation zwischen den verschiedenen Färbemethoden lässt darauf schließen, dass die Triplefärbung ebenso gute Ergebnisse liefert wie die bereits erprobte CFDA/PI-Färbung. Sie werden sowohl in Kombination mit der Fluoreszenzmikroskopie als auch mit der Durchfluscytometrie angewandt [168].

### 2.2.3.2 CASA-Systeme

Die subjektive Beurteilung von Motilität und Morphologie ist durch die Erfahrungen des Untersuchers und die Zahl der untersuchten Spermien begrenzt. Eine große Genauigkeit ist an die Untersuchung einer möglichst großen Anzahl an Zellen gekoppelt [8]. Diese ist bei der subjektiven Beurteilung durch eine Person begrenzt. Auf Grund der beiden Aspekte ergeben sich große Unterschiede zwischen den Laboren. Einigen Untersuchungen zur Folge liegt die Variabilität zwischen 20 und 60 Prozent [8, 16, 24, 26, 35, 235]. Um derartige Unterschie-

de zu umgehen, die eine umfassende Beurteilung eines Ejakulats schwer gestalten, wurden CASA-Systeme entwickelt.

CASA ist die Abkürzung für Computer-Assisted Semen Analysis. Die CASA-Systeme basieren auf der elektronischen Auswertung von Videobildern über eine Bildanalyse-Software. Mit Hilfe solcher Systeme können die Spermienbewegung (Motilität) und die Spermienmorphologie sowie eventuell die Konzentration weitgehend unabhängig von subjektiven Einflüssen untersucht werden [190, 235, 189, 187]. Jede Samenzelle wird objektiv, wiederholbar und genau beurteilt [35, 215, 235, 187, 187]. Ihren Anfang nahm die computergestützte Spermanalyse bei David [42]. Das erste CASA System wurde vor fast 30 Jahren von Dott und Foster [48] vorgestellt. Ein Nachteil des CASA Systems ist die immer noch sehr teure Ausrüstung und die Abhängigkeit der Ergebnisse von der richtigen Einstellung der Geräte. Eine korrekte Kalibrierung, Validierung und Standardisierung erfordern außerdem viel Erfahrung vom Untersucher [235, 190].

**2.2.3.2.1 Qualitätskontrolle, Validierung, Standardisierung** Wie die Studien von Verstegen [235] und Rijsselaere [187, 189] zeigen, wird das Ergebnis der Spermauntersuchung stark durch die Einstellungen der Geräte, nämlich von der Tiefe der Zählkammer, der Anzahl der ausgezählten Felder und Proben, der Temperatur und der Bearbeitung der Spermien beeinflusst. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es deshalb notwendig, sämtliche Einstellungen zu standardisieren, abzusichern und ständigen Qualitätskontrollen zu unterziehen. Verstegen [235] gab in seinem Review die von ihm verwendeten Einstellungen wieder (s.u.). Rijsselaere [185] suchte in seiner Studie nach weiteren sinnvollen Einstellungen, um einheitliche und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Verstegen und Ouada [106] verglichen eine Spermaanlyse bei 30°C und 37°C. Die Untersuchungen ergaben, dass die Motilität stark von der Temperatur abhängt. Verstegen und Ouada führten alle weiteren Untersuchungen bei 30°C durch, während Rijsselaere [187] und Farrel mit 37°C arbeiteten.

Die Untersuchungskammer, insbesondere die Kammertiefe, beschränkt die dreidimensionale Bewegung der Spermien. Bei einer Tiefe von 50  $\mu\text{m}$  hängt die Motilität stark von der momentanen Lokalisation der Samenzellen ab. Grund dafür könnten Interaktionen mit der Kammerwand sein. Mit steigender Tiefe der Kammer wird es schwieriger, die Zellen zu fokussieren [235]. Verstegen, Ouada und Thanki [235] verwendeten deshalb eine nur 10  $\mu\text{m}$  tiefe Makler-Kammer. Die Makler-Kammer hat sich schon in der Humanmedizin wegen ihrer präzisen Ergebnisse bewährt. Farrel dagegen verwendet eine 20  $\mu\text{m}$  tiefe Microcell-Kammer [235].

Die Genauigkeit der Ergebnisse wächst mit der Anzahl an ausgewerteten Feldern. Allgemein sollten mindestens 100 Felder ausgewertet werden, um eine zuverlässige Aussage über die Zellen zu erhalten [235].

Optik und Belichtung werden manuell an die vorliegende Probe angepasst. Optimale Kontraste setzen eine gute Belichtung voraus. Dies ist laut Krämer [116] einer der kritischen Punkte der Computeranalyse. Krämer drängte deshalb nach der Entwicklung einer automatischen Ermittlung der Grenzwerte. Nach diesen sollte das Mikroskop dann eingestellt werden, um jegliche subjektive Komponente, die sich aus einer manuellen Einstellung der Optik ergeben würde, auszuschließen.

Die Bewegung der Spermien wird anhand von Videobildern rekonstruiert. Wegen der schnellen Bewegungen der Samenzellen ist eine hohe Bildrate (Anzahl von Bildern pro Sekunde) erforderlich [132, 145, 144]. Da sich das Sperma verschiedener Spezies unterschiedlich schnell bewegt, sollte die Bildrate in Abhängigkeit davon eingestellt werden. Rijsselaere [187] verglich für die Spezies Hund eine Frequenz von 15, 30 und 60 Hertz. Seinen Untersuchungen zur Folge, gab nur eine Frequenz von 60 Hertz genügend Informationen, um eine ausreichende Aussage über die Bewegung der Spermien zu erhalten. Bei niedrigeren Frequenzen ergaben sich vor allem für die Beat Cross Frequency (Ausschlag des Spermienkopfes s.u.) zu niedrige Werte. Rijsselaere [187] begründete dies damit, dass die kleinen Bewegungen des Spermienkopfes bei einer niedrigeren Frequenz nicht wahrgenommen werden. In der Humanmedizin genügten laut Krämer [116] 30 Hertz für eine korrekte Beschreibung der Bewegung der Spermien.

**2.2.3.2.2 Konzentrationsmessung** Die Konzentration der Samenzellen ist ein wichtiger Parameter, um Hinweise auf quantitative Parameter der Spermatogenese zu bekommen und um bei der Spermakonservierung eine korrekte Besamungsdosis einzustellen [18, 19]. Für die CASA-Systeme liegt das Ejakulat jedoch meist in zu hoher Konzentration vor. Die meisten CASA-Systeme können nur eine Konzentration von 20 bis 300 Millionen Spermien pro Milliliter bestimmen [235]. Im Vergleich zur manuellen Auszählung ist das Ergebnis bei hohen Konzentrationen oft zu niedrig [106]. Ursache dafür könnten Verklumpungen sein [235]. Deshalb muss das Sperma vor der Messung manuell verdünnt werden. Neben der Konzentration, kann auch der Verdünner das Ergebnis verfälschen, indem spermienähnliche Partikel vom System als Samenzellen mitgezählt werden. Iguer-Ouada [106] verglich eine Konzentrationsmessung des HTR-Ivos 10 (ein CASA-System) mit der manuellen Auszählung. Die Konzentrationsmessung des HTR-Ivos 10 ergab das 1,7-fache der manuellen Auszählung. Nachdem die Zellen mit hyperosmolarer Kochsalzlösung abgetötet wurden, stimmten die Werte überein. Er schloss daraus, dass neben spermienähnlichen Partikeln im Verdünner Kollisionen zwischen den Samenzellen ein Grund für die Verfälschung der Ergebnisse sein könnten. Um ein richtiges Ergebnis zu erhalten, ist es laut Iguer-Ouada demnach notwendig, die Zellen vor der Zählung abzutöten oder die Zählung manuell vorzunehmen [106, 235].

Um die Effizienz der CASA-Systeme bei der Konzentrationsbestimmung zu verbessern, färbten Farrel und Boyer [60, 20] die DNA der Zellen an. Farrel kam dabei zu dem Schluss, dass mit der Hoechst33342-Färbung die DNA der Samenzellen gut von den übrigen Partikeln ab-

gegrenzt werden kann. Auch Rijsselaere [185] befasste sich mit der Konzentrationsmessung. Er stellte fest, dass mit steigender Konzentration die Parameter der Spermengeschwindigkeit ansteigen. Deshalb riet er zu einer Verdünnung des Ejakulats auf 50 Millionen Spermien pro Milliliter.

**2.2.3.2.3 Beurteilung der Motilität mit CASA-Systemen** Die Bewegung der Spermien korreliert, wie die Konzentration, positiv mit der Fertilität des Ejakulats [249, 173]. Die Motilität ist demnach einer der Parameter, mit denen eine Aussage über die Qualität des Ejakulats getroffen werden kann. CASA-Systeme geben das Bewegungsverhalten der einzelnen Zellen mittels einiger Bewegungsparameter wieder. Gemessen werden die VCL (curvilinear velocity = durchschnittliche Punkt zu Punkt Geschwindigkeit), die ALH (amplitude of lateral head displacement = Amplitudengröße des Kopfausschlages), die BCF (beat cross frequency = Frequenz der Kopfbewegungen), die VAP (average path velocity = durchschnittliche Geschwindigkeit), die VSL (straight line velocity = Geschwindigkeit auf gerader Strecke), die STR (straightness =  $VSL/VAP$ ) und die LIN (linearity =  $(VSL/VCL)$ ).

Mit dem Wert der VAP werden die Spermien in vier Kategorien eingeteilt. Die vier Kategorien umfassen: 1. unbeweglich (Spermien, die sich gar nicht bewegen), 2. langsam ( $VAP < LVV$ ), 3. durchschnittlich ( $LVV < VAP < MVV$ ) und 4. schnell ( $VAP > MVV$ ). Meist wird ein niedriger und mittlerer Grenzwert für die VAP festgelegt, um die jeweilige Samenprobe beurteilen zu können. Bisher gibt es jedoch noch keine allgemein gültigen Werte für die VAP. Bei Farrel [235] lag die LVV (niedriger Grenzwert) bei 20 und die MVV (mittlerer Grenzwert) bei 80, bei Iguer-Ouada und Verstegen [106] lag dagegen die LVV bei 9,9, die MVV bei 50. Bei Rijsselaere [187] betragen die Werte 30 und 50. Aus diesen unterschiedlichen Werten wird ersichtlich, dass es Sinn machen würde, allgemein gültige Werte für die Beurteilung der Geschwindigkeit der Spermien festzulegen, um einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Laboren zu ermöglichen.

Die ALH (Amplitude der lateralen Kopfbewegung) ist einer der Parameter, deren Wert sich durch die Kapazitation des Spermiums erhöht. Nachdem die Kapazitation eine Voraussetzung für eine Kontaktaufnahme der Samenzelle mit der Eizelle ist, nimmt die ALH, von den oben angeführten Parametern, einen wichtigen Stellenwert ein. Einige Autoren sind der Meinung, dass sie eine gute Vorhersage auf das *in vitro* Befruchtungsergebnis liefert [17, 108, 235]. Eine hohe ALH wird auch mit der Fähigkeit der Samenzellen zur Penetration der Oozyte in Verbindung gebracht [66, 235, 4]. Laut Boyer [20] sollte eine gemeinsame Betrachtung aller Bewegungsparameter eine gute Aussage über die Gesamtmotilität eines Ejakulats liefern [235].

Die Kapazitation der Spermien geht mit hyperaktiven Bewegungen einher. Ist eine Samenzelle hyperaktiv, so nimmt ihre Vorwärtsbewegung ab und die Kurven- und Zirkulärbewegung zu. Die Hyperaktivität wird eng mit der Funktionsfähigkeit und Fertilität des Spermiums in Verbindung gebracht [19, 235]. Eine Aussage über den Grad der Hyperaktivität ermöglicht

somit die Beurteilung der Funktionsfähigkeit eines Spermiums und dient als wichtige Information für den Untersucher [24, 58, 132, 133, 218, 235, 249, 250]. Die Linearität der Bewegung einer Samenzelle ist bei kapazitierten Spermien sehr klein. Es dominieren kurvige Bewegungen und ein hoher Kopfausschlag. Beispiele für Parameter, die die Hyperaktivität beschreiben, sind die VCL (durchschnittliche Punkt zu Punkt Geschwindigkeit), die ALH (seitlicher Ausschlag des Spermienkopfes), oder die VSL (Linearität der Bewegung). Die VCL muss mindestens  $70 \mu\text{m}/\text{Sekunde}$  [253, 191, 146, 84, 23, 235], die Linearität maximal 30 Prozent [82] und die ALH mehr als  $7 \mu\text{m}/\text{Sekunde}$  [23, 84, 146, 191, 235, 3] betragen, damit ein Spermium als hyperaktiv gilt. Beeinflusst wird die Hyperaktivität, wie auch die Bewegung allgemein, durch die Temperatur. Während eine hohe Temperatur mit einer gesteigerten Hyperaktivität einhergeht, verhält es sich bei niedrigen Temperaturen umgekehrt. Die Spermien bewegen sich allgemein weniger und der Anteil hyperaktiver Spermien ist geringer. Deshalb sollten die Messungen immer mit konstanten Temperaturen durchgeführt werden.

**2.2.3.2.4 Beurteilung der Morphologie mit CASA-Systemen** Die Morphologie zählt neben der Konzentrationsmessung und Motilitätsbestimmung zu den entscheidenden Parametern bei der Spermienuntersuchung [139], weil sie direkte Hinweise auf das Befruchtungsvermögen einer Samenprobe geben kann [159, 141, 189]. Da aber nach Untersuchung von Ayodeji [13, 235], Jequier [107] und Zaini [251] die Variationen zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Untersucher mit konventionellen Methoden auch hier bis zu 85 Prozent beträgt, sind moderne, objektive Untersuchungsmethoden wichtig. Die automatische Morphologiebestimmung erfordert eine Vorarbeit in drei Stufen. Erst muss das Ejakulat entsprechend präpariert werden (waschen, fixieren, färben), dann wird das Bild angepasst und schließlich die richtige Vergrößerung und Optik gewählt.

Trotz computergesteuerter Methoden variiert das Ergebnis je nach Präparationstechnik, Interpretation der Bilder, Klassifikation der Ergebnisse und Erfahrung des Untersuchers [162]. Eine gewisse Subjektivität kann also trotz modernster Techniken nicht ausgeschlossen werden. Um dennoch ein verwertbares Ergebnis zu erlangen, müssen mindestens 200, besser aber 600 Zellen untersucht werden [45]. Im Gegensatz zu konventionellen Methoden, sorgen CASA Systeme so trotz manueller Interventionen für eine geringere Variation zwischen den Laboren. Während Davis [43] noch 30 bis 60 Prozent Variation für konventionelle Untersuchung feststellte, waren es bei Verstegen unter Verwendung von CASA-Systemen nur noch 11-23 Prozent [235].

Rijsselaere [189] verwendete in seiner Studie von 2004 den Hamilton Thorn Analyzer Ceros 12.1 (ein CASA-System) für die Untersuchung von Morphologie und Morphometrie der Spermien. Der Ceros 12.1 besitzt ein einfaches Lichtmikroskop. Die Bilder werden von einer Kamera aufgenommen, digitalisiert und am Computer ausgewertet. Bevor eine Probe untersucht werden konnte, wurde diese in einer NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet in PBS (Phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Salzlösung) gelöst. Ein Teil der in diesem Fall auf ca.  $50 \times 10^6$  Spermien pro Milliliter verdünnten Lösung

wurde ausgestrichen und mit Diff-Quick gefärbt [189]. Für die Bestimmung von Morphologie und Morphometrie wurden Parameter wie Länge und Breite des Spermienkopfes, der Umfang und die Fläche des Spermienkopfes, der Elongationskoeffizient und die Länge des Spermischwanzes bestimmt. In Untersuchungen von Rijsselaere wurden folgende Grenzwerte festgelegt: Länge zwischen 5,7 und 7,5  $\mu\text{m}$ , Breite zwischen 3,5 und 4,4  $\mu\text{m}$  und Umfang zwischen 15,6 und 19,0  $\mu\text{m}$ . Die Fläche des Spermienkopfes beträgt zwischen 16,2 und 24,5  $\mu\text{m}^2$ , der Elongationskoeffizient zwischen 47,6 und 67,0 Prozent und die Länge des Spermischwanzes zwischen 38,77 bis 59,9  $\mu\text{m}$ . Dahlborns Werte [40] stimmten mit diesen bis auf wenige Zehntel  $\mu\text{m}$  überein. Er ging aber davon aus, dass die Normalwerte zwischen den verschiedenen Hunden stark schwanken.

Die Ergebnisse der Morphometrie hängen neben der Präparationstechnik, der Interpretation der Bilder und der Klassifikation der Ergebnisse auch von den Einstellungen des Ceros 12.1 (ein Hamilton Thorne Analyzer) ab. Beim Vergleich einer 40- und 60-fachen Vergrößerung wurde festgestellt, dass bei der kleineren Vergrößerung beinahe alle Werte erhöht waren [189]. Bei einer 60-fachen Vergrößerung und einer Untersuchung mit unterschiedlichen Verdünnungen (50, 100 oder 200 Millionen Spermien pro Milliliter) zeigte sich, dass auch die Konzentration Einfluss auf das Ergebnis hat. Zu hohe Konzentrationen ergaben Werte, die nicht im Normalbereich liegen. Der Anteil morphologisch anormaler Spermien lag mit durchschnittlich 18,8 und 22,4 Prozent bei einer Konzentration von 100 und 200 Millionen Spermien pro Milliliter deutlich höher als bei einer Konzentration von 50 Millionen Spermien pro Milliliter (6,7 Prozent morphologisch anormale Spermien). Der Autor führte dies auf eine häufige Überlappung und Kollision der Spermien auf Grund der zu hohen Konzentration zurück. Die Anzahl der ausgezählten Spermien (100 oder 200 Zellen) schien dagegen keinen Einfluss auf das Ergebnis zu haben.

Bei der Untersuchung von kryokonservierten Spermien zeigte sich, dass annähernd alle Werte für die Morphometrie kleiner waren. Gründe hierfür könnten die von England [56] postulierte Dehydrierung der Spermien während der Kryokonservierung sein. Auch eine Schädigung des Akrosoms [194, 81, 189] durch die Kryokonservierung könnte dabei eine Rolle spielen [189].

Die Werte des HTA (Hamilton Thorne Analyzer, ein CASA System) wiesen mit einer Übereinstimmung von  $p=0,82$  eine hohe Korrelation zu den Ergebnissen aus konventionellen Systemen auf. Insgesamt war der Anteil an normalen Spermien beim HTA geringer. Rijsselaere [189] war letztendlich davon überzeugt, dass der HTA eine objektive und detaillierte Charakterisierung der Morphologie der Spermien lieferte.

Nunez-Martinez [157] ging der Fragestellung nach, ob an Hand der Morphologiebestimmung auf die Fähigkeit der Spermien, eine Kryokonservierung zu überstehen, geschlossen werden kann. In seiner Studie legte er dafür 4 Indices fest, in denen sämtliche Parameter der Morphologiebestimmung verarbeitet wurden. Dabei unterschied er 4 Populationen, die durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekennzeichnet wurden. Die erste Population umfasste alle lebenden Zellen ohne Membranveränderungen. Die zweite Population zeichnete sich durch

kleine Membranveränderungen aus, während die Dritte schon stärkere Membranveränderungen aufwies, was auf einen frühen apoptotischen Zustand der Zelle hindeutete. Die vierte Population schließlich bestand aus apoptotischen, toten Zellen. In seiner Studie konnte eine Korrelation zwischen drei der Indices, die vor dem Einfrieren ermittelt wurden, und der Membranintegrität nach dem Auftauen festgestellt werden. Er schloss daraus, dass mit diesen Indices eine Aussage über die Fähigkeit eines Ejakulats, die Kryokonservierung zu überstehen, getroffen werden kann [157].

### 2.2.3.3 Andere Untersuchungsmethoden

Vor der Entwicklung der CASA-Systeme wurde wegen der Subjektivität konventioneller Untersuchungsmethoden nach anderen Möglichkeiten der Spermauntersuchung gesucht. Mit der Turbimetrie [47], der Laser-Doppler-Spektroskopie [25] und der Photometrie [23] boten sich Alternativen an. Sie liefern einen Gesamtüberblick über Bewegung, Dichte und äußeres Erscheinungsbild des Ejakulats. Eine Beurteilung der einzelnen Spermien ist damit jedoch unmöglich [16, 24, 26, 35].

Beim Semen Quality Analyzer (SQA) werden Spermien in eine Glaskapillare verbracht, auf die eine Lichtquelle gerichtet wird. Eine Photometerzelle misst das durch Motilität und Konzentration der Spermien veränderte Licht gegenüber der Lichtquelle. Da die Messung auch von der Anzahl der Zellen abhängt, sollte die Konzentration der Probe zwischen 25 und  $200 \times 10^6$  Spermien pro Milliliter liegen. Nach Iguer-Ouada [105] sind die Ergebnisse in diesem Bereich gut auswertbar [105]. Iguer-Ouada verglich die Ergebnisse des SQA mit denen des HTA Ivos 10 (Hamilton Thorne Analyzer, ein CASA-System). Ausgewertet wurden dabei die Motilitätsparameter des HTA im Vergleich zu der Höhe des SQA-Index (Meßgröße des Systems). Es zeigte sich, dass der Index mit zunehmend besserer Qualität der Spermienprobe höher wurde. Lag der Anteil der beweglichen Spermien beispielsweise bei 20 Prozent, betrug der Index 200. Lag der Anteil dagegen bei knapp 100 Prozent, betrug der Index 450. Eine positive Korrelation zwischen den Ergebnissen des SQA und der Fertilität muss beim Hund jedoch erst in weiteren Studien bewiesen werden.

## 2.2.4 Funktionelle Tests

### 2.2.4.1 Hypoosmotischer Schwelltest (HOST)

Der HOST erlaubt die Beurteilung der Membranintegrität einer Samenzelle, die wiederum Voraussetzung für Kapazitation und Akrosomenreaktion ist (siehe Abschnitt 2.2.1.4). Er überprüft die Funktionsfähigkeit der Spermien [109, 220, 119, 196, 83], indem er die Samenzelle in Aktion beobachtet. Die Stabilität der Plasmamembran wird unter hypoosmotischen Bedingungen beurteilt. Der Schwanz eines Spermiums schwillt dabei bei intakter Plasmamembran so lange an, bis ein osmotisches Gleichgewicht erreicht ist [31, 83]. Seine flexiblen Schwanzelemente ermöglichen ein Anschwellen bei minimaler Vergrößerung der Oberfläche. Dabei rollt sich der Schwanz ein [118, 83]. Ist die Membran nicht intakt, so bleibt der Schwanz

unverändert. Der Anteil der Spermien mit aufgerolltem Schwanz kann mit dem Lichtmikroskop abgeschätzt werden.

#### 2.2.4.2 Oozyten Penetrations Assay (OPA)

Der OPA überprüft die Fähigkeit von *in vitro* kapazitierten Spermien, die Zona Pellucida zu durchdringen. Das Ergebnis dieses Tests korreliert stark mit der Fertilität eines Ejakulats [96]. Die maturierten Oozyten werden bei diesem Test zusammen mit den kapazitierten Spermien für eine gewisse Zeit (z.B. 12, 24 oder 48 Stunden) koinkubiert. Nach der Koinkubation werden die Eizellen inklusive der eingedrungenen Spermien fixiert und mit Hoechst 33258 angefärbt. Hoechst 33258 färbt den Kern der Oocyte und die eingedrungenen Samenzellen an. Danach können die eingedrungenen Spermien mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden. In Hewitts [96] Studie wurden 40 Prozent der Eizellen von Spermien penetriert.

Rijsselaere [190] stellte fest, dass eine Maturation der Eizelle nicht notwendig ist. Im Vergleich war die Penetrationsrate bei immaturen Eizellen mit intakter Cumuluszellschicht höher, weshalb Mastomonaco [137, 190] annimmt, dass die Cumuluszellen eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Eizelle und Samenzelle spielen. Gegenüber der IVF ist der OPA weniger zeitaufwendig, da sowohl die Zeit für die Maturation der Eizelle, als auch für die Weiterentwicklung der Oocyte nach der Befruchtung wegfallen [190].

#### 2.2.4.3 Hemizona Binding Assay (HZA) und Zona Binding Assay (ZBA)

Beim HZA und ZBA werden weder maturierte, noch lebende Eizellen benötigt, was den Vorteil hat, dass auch tiefgefrorene Eizellen verwendet werden können. Mayenco-Aguirre [138] versuchte den HZA als Fertilitätstest beim Hund zu etablieren. Er teilte die Zona Pellucida der Oozyten in zwei Teile. Diese koinkubierte er für eine Stunde mit kapazitierten Spermien. Nach der Koinkubation werden die Eizellen in PBS gewaschen, um lose Spermien zu beseitigen. Nach Färbung und Fixierung können die bindenden Spermien mit dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt werden. Da das Ergebnis nicht nur von der Sperma-, sondern auch von der Oozytenqualität abhängen kann, hat das HZA dem ZBA gegenüber den Vorteil, dass ein Ejakulat mit dem Kontrollejakulat an ein und derselben Oocyte verglichen werden kann. Neben der Qualität von Spermien und Oozyten ist die Anzahl an bindenden Spermien auch von der Anzahl der vorhandenen Spermien abhängig. Mayenco-Aguirre [138] überprüfte deshalb den Einfluss der Konzentration. Bei 1 Millionen Spermien pro Milliliter binden für die Auswertung genügend, aber nicht zu viele Spermien an der Oocyte, während es bei einer Konzentration von 500 000 Spermien pro Milliliter zu wenige sind, um aussagefähige Ergebnisse zu erzielen.

## 2.3 Spermakonservierung

Die Spermakonservierung ist eine unbedingte Voraussetzung für die künstliche Besamung, wenn sich der Rüde nicht in unmittelbarer Nähe der Hündin befindet. Die Haltbarkeit von unbehandeltem Sperma ist nur sehr kurz. Sie kann durch Abkühlung, passende Verdüner und Kryokonservierung verlängert werden.

### 2.3.1 Zentrifugation

Für eine künstliche Besamung wird je nach Lokalisation der Samendeponierung eine bestimmte Anzahl motiler Spermien benötigt (siehe Abschnitt 2.4) [199, 179, 150]. Im Ejakulat eines Hundes befinden sich ca. 300 - 1500 Millionen Spermien. Der Anteil motiler Spermien liegt im Normalfall zwischen 80 und 90 Prozent. Es befinden sich demnach 240 - 1350 Millionen motile Spermien in 0,5 - 3 ml Ejakulat (2. Fraktion). Für eine Erhöhung der Anzahl an Spermien pro Volumeneinheit, aber auch um Fremdbestandteile und Prostatasekret (schädigt das Sperma bei der Kühlung) zu entfernen [185], wird das Sperma zuerst zentrifugiert.

Rijsselaere testete [185] verschiedene Zentrifugationsgeschwindigkeiten, um herauszufinden, welchen Einfluss das Zentrifugieren auf das Ejakulat hat. Als Anhaltspunkte verwendete er den Spermaverlust im Überstand und die Schädigung der Zellen im Pellet. Die Zentrifuge lief dabei jeweils 5 Minuten. Während bei 180xg noch 8,9 Prozent der Zellen mit dem Überstand verloren gingen, waren es bei 720xg nur noch 2,3 Prozent. Bei 1620xg und 2880xg betrug der Verlust weniger als 0,5 Prozent der Spermien. Die Verluste wurden also mit steigenden Geschwindigkeiten geringer. Hohe Geschwindigkeiten wirkten sich jedoch durch die erhöhte Zentrifugalkraft negativ auf die Qualität der Zellen im Pellet aus. Das ergab die Untersuchung mittels SYBR-14/PI-Färbung. Es stellte sich heraus, dass die Membranen der Zellen mehr geschädigt werden, je höher die Geschwindigkeit ist. In seinen weiteren Versuchen verwendete Rijsselaere die Einstellung von 700xg für 5 Minuten als guten Kompromiss, bei dem sowohl die Verluste von Spermazellen im Überstand, als auch die Schädigungen der Zellen im Pellet im Rahmen blieben.

Eilts [54] untersuchte in seiner Studie neben den Auswirkungen der Zentrifugalgeschwindigkeit auf die Spermien auch die der Zentrifugationsdauer. Zum Vergleich verwendete er Zentrifugalkräfte zwischen 300 und 800xg bei einer Dauer von drei bis acht Minuten. Eilts stellte fest, dass in diesem relativ engem Bereich weder Geschwindigkeit noch Zeit die Spermaqualität unterschiedlich beeinflussten, und eine ausreichende Konzentration erreicht wurde.

Die von den verschiedenen Autoren verwendeten Einstellungen der Zentrifuge bewegen sich zwischen 900xg 10min [53], 720xg 5min [204], 700xg 10min [160], 700xg 8min [179], 700xg 6min [94, 201, 200, 196], 700xg 5min [171, 6] und 300xg 10min [154, 226].

## 2.3.2 Verdünner

Der Verdünner übernimmt im Rahmen der Spermakonservierung drei Funktionen. Einerseits soll er das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet soweit verdünnen, bis die erwünschte Konzentration erreicht wird, andererseits soll er die Samenzellen nähren und vor äußeren Einflüssen schützen. Es gibt verschiedene Verdünner, die diese Voraussetzungen erfüllen. Beispiele dafür sind der Trispuffer-Eigelb-Glukose Verdünner [129, 204, 188, 179], der Magermilchverdünner und der Kokosnussmilchverdünner [28]. Ersterer wird dabei am meisten verwendet. Er ist sowohl für die Kühl- [236], als auch für die Kryokonservierung [204, 160] geeignet.

**2.3.2.0.1 Zusammensetzung** Der Trispuffer Verdünner besteht hauptsächlich aus Trispuffer, Eigelb, Glukose und Wasser. Zusätzlich werden Antibiotika, sowie eine geringe Menge Zitratpuffer untergemischt. Eines der am meisten verwendeten Rezepte ist das nach Rota [201, 197]. Es besteht aus 3.025g Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan, 1,7g Natrium Citrat Monohydrat, 1,25g Glucose, 100mg Benzylpenicillin, 100  $\mu$ g Dihydrostreptomycin Sulfat und 20g Eigelb. Das Ganze wird mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und auf einen pH-Wert von 6,83 gebracht. In der Vergangenheit wurde dieser Verdünner bereits mehrfach modifiziert [168, 195, 129].

Das Eigelb dient vor allem dem Schutz der Plasmamembran beim Abkühlen und Einfrieren, aber auch der Ernährung der Spermien. Philipps und Lardy [176, 181] berichteten als erste von dem schützenden Effekt gegenüber einer Schädigung durch die Kältebehandlung. Nach Holt [98, 181] bewahrt Eigelb die Motilität, indem es die Spiralisierung der Spermienflagellen verhindert. Sogenannte "Low Density Lipoproteine" (LDL) wie beispielsweise Lecithin, die im Eigelb enthalten sind [240, 70, 181], interagieren mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran und sorgen für deren Stabilisierung [239, 98, 181]. HOLT et al's [99, 181] Studien ergaben, dass die schädigenden Effekte der hyperosmotischen Bedingungen, denen die Membran während des Gefrierprozesses ausgesetzt ist, durch diesen Prozess mit der Anwesenheit des Eidotters im Verdünnermedium minimiert werden.

Glukose ernährt die Samenzellen und unterstützt deren Bewegung. Um herauszufinden, welchen Einfluss Glukose auf die Zellen hat, verglich Ponglowhapan [179] Verdünner ohne Zuckerzusatz, mit 10mM und 70mM Glukose, mit 10mM und 70mM Fruktose und mit einem Gemisch aus beiden. In seinem Versuch wirkte sich eine Zuckerzugabe vor allem positiv auf die Motilität der Spermazellen aus. Der Unterschied zwischen den Ansätzen war von Anfang an gut darstellbar. In der ersten Periode (Tag 1,2 und 3 nach Ansatz) ergab sich ein Anteil von 78 Prozent motiler Spermien ohne weitere Zugabe von Glukose (auch im Eigelb ist Glukose enthalten), von 81 Prozent mit der Zugabe von 10mM Glukose und von 84 Prozent bei eine Zugabe von 70mM Glukose. In der vierten und letzten Periode (Tag 17, 20 und 23 nach Ansatz) befinden sich noch 7,4 Prozent motile Spermien im Verdünner ohne Zuckerzusatz, 9 Prozent mit 10mM Glukose und 14,4 Prozent mit 70mM Glukose.

Fruktose verbesserte die Motilität im Vergleich zu Glukose in den ersten 8 Tagen um einen Prozentpunkt. Danach war kein Unterschied mehr ersichtlich. Membranintegrität, Akrosomenmembran und Akrosomenreaktion wurden nicht beeinflusst. Wenn Glukose und Fruktose zur Verfügung standen, wurde Glukose von den Zellen bevorzugt, obwohl Fruktose die Zellen anfangs zu mehr Motilität animierte. Ponglowhapan [179] führte dies auf den größeren Anteil an Glucosetransportsystemen in den Zellen zurück [179, 184].

Neben der Ernährung der Samenzellen fördern die verschiedenen Zucker den Dehydrationsgrad der Zellen, wodurch die intrazelluläre Eisbildung und damit die Zellschädigung vermindert wird [181].

Zusätzliche Inhaltsstoffe:

Das Prostatasekret hat *in vivo* die Funktion, eine Schutzhülle um die Spermienmembran zu legen. Es maskiert damit die Progesteronrezeptoren und verhindert eine zu frühe Kapazitation [211, 201]. Rota [201] untersuchte den Effekt von Prostatasekret auf Akrosom und Motilität der Zellen, wenn es nach dem Auftauen zur Spermaprobe gegeben wird. Die Ergebnisse der CASA-Messungen ergaben, dass die Zugabe von Prostatasekret direkt nach dem Auftauen kurzfristig für eine verbesserte Motilität sorgte. Während die Gesamtmotilität bei Verdünnung mit Prostatasekret 34,7 Prozent betrug, lag diese im Kontrollverdünner nur bei 28,6 Prozent. Ähnlich verhielt es sich bei der progressiven Motilität. Die Bewegungsparameter der geradlinigen Bewegungen (VSL, LIN und STR) waren im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, während im Gegensatz dazu die von der Geraden abweichenden Bewegungen erniedrigt waren. Die gesteigerte Linearität wies auf weniger hyperaktive Spermien hin, was für eine geringere Kapazitationsrate spricht. Auf das Akrosom hatte die Zugabe von Prostatasekret keinen Einfluss. Bereits eine Stunde nach Zugabe schnitten sich die Motilitätskurven von Prostatasekret- und Kontrollgruppe. Vier Stunden später ist die Motilität der Kontrollgruppe größer.

Durch kleinere Traumata vor oder während der Ejakulation befinden sich häufig Blutbestandteile im Ejakulat. Deshalb untersuchte Rijsselaere [188] den Effekt von zehn Prozent Vollblut in einem Ejakulat. Bis zum Tag vier nach dem Ansatz konnte er keinen Unterschied zur Kontrollgruppe feststellen. Im zweiten Versuch wurde ein Anteil von bis zu zehn Prozent Blut in kryokonserviertem Sperma untersucht. Schon ab zwei Prozent Blut im Ejakulat verschlechterte sich die Membranintegrität. Die Motilität sank ab vier Prozent Blut, die Akrosomen reagierten erst ab zehn Prozent. In weiteren Versuchen konnte er nachweisen, dass vor allem der Blutfarbstoff Hämoglobin für den schädigenden Effekt verantwortlich ist. Bei gekühltem Sperma konnte der Effekt nicht beobachtet werden, weil die Erythrozyten erst durch die Temperaturschwankungen der Kryokonservierung zu 58 Prozent hämolysieren, und damit das Hämoglobin freisetzen.

**2.3.2.0.2 Konzentration** Die Anzahl benötigter motiler Spermien pro Besamungsportion hängt von der Lokalisation der künstlichen Besamung ab. Das Volumen der Portionen

wird durch die Konservierungsbehältnisse begrenzt. Da vor allem bei der Kryokonservierung die Volumina sehr klein sind, muss das Ejakulat stark konzentriert vorliegen.

Cordoso [28] verglich in seiner Studie eine 1 zu 1 Verdünnung mit einer Verdünnung auf 200 Millionen Spermien pro Milliliter. Motilität und Morphologie waren dabei bei beiden Verdünnungen vergleichbar. Die Konzentration wirkte sich in diesem Versuch nicht auf die Spermaqualität aus. Pena und Linde-Forsberg [169] sind der Meinung, dass für Hundesperma eine Konzentration von 200 Millionen Spermien pro Milliliter optimal ist.

Okanos [160] verglich Konzentrationen zwischen 25 und 250 Millionen Spermien pro Milliliter Spermprobe. Dabei kam er zu dem Ergebnis, dass in diesem Bereich der Anteil morphologisch anormaler Spermien nur zwischen 35,7 und 39,7 Prozent Anormalität schwankt. Auch der Anteil motiler Spermien war mit 51,3 bis 55,0 Prozent für alle untersuchten Konzentrationen annähernd gleich. Er schloss daraus, dass ein Effekt auf die Samenqualität in diesem Bereich unwahrscheinlich ist.

### 2.3.3 Arten der Konservierung

Ist die zu besamende Hündin nach der Spermagewinnung nicht direkt an Ort und Stelle, so muss das Sperma für den Transport konserviert werden. Der erste wichtige Schritt einer Konservierung ist es, das Ejakulat zu kühlen. Durch die Zugabe eines Verdünners vor der Kühlung hält sich das Sperma bereits bis zu 10 Tagen [180, 236]. Damit kann das Sperma ein paar Tage transportiert werden, bevor es an seinen Bestimmungsort kommt. Für eine längerfristige Konservierung steht die Kryokonservierung zur Verfügung.

#### 2.3.3.1 Kühlung des Spermas

Die Kühlung des Ejakulats kann sofort nach der Zugabe eines Verdünners beginnen, oder es wird vorher noch einer Zentrifugation unterzogen. Die Zentrifugation sorgt für eine Konzentration des Spermas und eine Entfernung von Fremdbestandteilen. Für eine Kühlung des Ejakulats müssen dem Verdünner keine von den üblichen Zusätzen abweichende Zutaten zugegeben werden.

Nach Bouchard (72) ist eine Temperatur von 4-5 °C am Besten für die Lagerung von Sperma geeignet. Bei Temperaturen von 4°C hielten sich die Motilitätsparameter deutlich länger auf einem hohen Niveau als bei 22°C oder 35°C. In einem weiteren Versuch stellte sich heraus, dass der Wert der progressiven Motilität bei einer Abkühlung von 1°C oder 0,3°C im Vergleich zu einer langsameren Abkühlung von 0,1°C pro Minute, höher bleibt. Das bedeutet, dass das Sperma innerhalb von etwa 30 Minuten auf einen Sollwert von 4°C herabgekühlt werden kann und soll.

Gekühltes Sperma hat kryokonservierten Proben gegenüber einen deutlichen Qualitätsvorteil. Im Gegensatz zu kryokonservierten Spermproben, bei denen der Anteil motiler Sper-

mien kaum über 50 Prozent steigt, beträgt dieser bei frischem, gekühltem Sperma im Schnitt über 80 Prozent. Nachteil ist die kurze Haltbarkeit, die keinen flexiblen Umgang mit dem Ejakulat gewährleistet.

Verstegen [236] versuchte deshalb die Haltbarkeit mit einem oder mehreren Verdünerwechsel zu verlängern. Die Ergebnisse seiner Studie [236] zeigen, dass sich verdünntes Sperma bei 4-5°C bis zu 13 Tagen mit ausreichender Qualität hielt. Danach sanken die Motilitätswerte deutlich ab. Am 16. Tag gingen die Motilitätswerte gegen Null. An diesem Tag führte Verstegen einen Verdünerwechsel durch, indem er den "alten" Verdüner durch Zentrifugation entfernte, und frischen Verdüner zu den Spermien gab. Dies bewirkte eine Aktivierung vieler zuvor imotiler Spermien. Der Anteil motiler Spermien stieg von null auf 95 Prozent. Auch die Progression und Geschwindigkeit stiegen nach dem Wechsel von zehn Prozent auf 47 Prozent beziehungsweise von 50 Prozent auf 69 Prozent. Verstegen schloss daraus, dass verdünntes Sperma bei 4°C 10-13 Tage gelagert werden kann. Durch einen Verdünerwechsel können einige imotile Spermien reaktiviert werden. Grund dafür könnten seiner Meinung nach die erneute Zufuhr von Glukose und Puffer sein.

Laut Ponglowhapan ist ejakuliertes Sperma ohne Verdünerwechsel bis zu acht Tage verwendbar [180, 179]. Die Haltbarkeit von epididymal gewonnenem Sperma liegt dagegen nur bei zwei Tagen [180].

### 2.3.3.2 Kryokonservierung des Spermas

Kryokonserviertes Sperma ist theoretisch unendlich lange haltbar, wodurch man Zeitpunkt und Ort der Besamung variabel gestalten kann. Der Vorgang des Tiefgefrierens ist zeit- und erfahrungssintentiv und erfordert große Genauigkeit. Für die Kryokonservierung kann in der Regel nur Sperma mit hervorragenden Motilitäts- und Morphologieparametern verwendet werden. Wie sich diese Parameter nach dem Auftauen verhalten, ist stark von der individuellen Eignung zur Kryokonservierung abhängig [53]. Bisher gibt es keinen Parameter, der eine Aussage über die Eignung erlaubt. Nunez-Martinez [157] jedoch versuchte mit seinen vier Indices, in denen er verschiedene Morphologieparameter verarbeitet hat, einen Schritt in diese Richtung (siehe Abschnitt 2.2.3.2.4).

Hermansson [94] und Ponglowhapan [180] beschäftigten sich mit der Frage, ob ein Ejakulat noch am selben Tag eingefroren werden muss, oder ob dies zu einem späteren Zeitpunkt noch möglich ist. Ponglowhapan verwendete für seinen Versuch epididymal gewonnenes Sperma, das er am Tag Null, zwei oder vier kryokonservierte. Hermansson verwendete dagegen ejakuliertes Sperma, das er am Tag Null, eins oder zwei kryokonservierte. Die Ergebnisse waren bei beiden Versuchen ähnlich. Mit zunehmender Lagerungsdauer nach der Samengewinnung verschlechterte sich die Samenqualität. Doch die Qualität nach dem Auftauen wurde dadurch nicht beeinflusst. Sie schließen daraus, dass Sperma auch zwei Tage nach der Gewinnung noch kryokonserviert werden kann.

Während des Abkühlens ändern sich die osmotischen Verhältnisse in den Zellen. Zwischen  $-5$  und  $-15^{\circ}\text{C}$  bilden sich extrazelluläre Eiskristalle [181, 236]. Die Flüssigkeit ist in den Kristallen gebunden, was eine Erhöhung der Salzkonzentration im Extrazellulärraum bewirkt. Dies führt zu einem Ausströmen der Flüssigkeit aus dem Zellinneren [222]. Die Zelle dehydriert. Erfolgt die Abkühlung zu schnell, wird die Zelle ungenügend dehydriert und es kommt zur Bildung von intrazellulären Eiskristallen, die die Zellen schädigen oder zerstören [53]. Eine zu langsame Abkühlung bewirkt eine zu starke Dehydrierung. Die Samenzelle wird zu lange einer zu hohen Salzkonzentration ausgesetzt. Die Membranintegrität sinkt, was sich ebenfalls letal auf die Zelle auswirkt [53]. Die Abkühlung soll demzufolge nicht zu schnell und nicht zu langsam erfolgen. Die optimale Abkühlrate liegt zwischen  $10$  und  $30^{\circ}\text{C}$  pro Minute [53, 222]. Um die Bildung von intrazellulärem Eis zu verhindern, kommen Kryoprotektiva zum Einsatz. Ein ideales Kryoprotektivum dringt schnell in die Zelle ein, stabilisiert die Membranen, reguliert die Permeabilität [222] und ändert die osmotischen Verhältnisse der Zelle [53].

Für die Kryokonservierung wird das Sperma in der Regel in zwei Schritten verdünnt. Der erste Verdünner wird dabei bei Raumtemperatur zugegeben, der zweite bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Die Kryoprotektiva befinden sich meist nur im zweiten Verdünner, der sich ansonsten durch nichts von dem ersten unterscheidet [53, 160]. Es ist wichtig, das Sperma noch vor dem Einfrieren mindestens eine Stunde zu kühlen [160]. Nach der Zugabe des Kryoprotektivums kann das Ejakulat dann sofort eingefroren werden. Eine Kühlung von mindestens einer Stunde führt zu einer höheren Motilität und einer geringeren morphologischen Veränderung der Spermien nach dem Auftauen. Ob das Kryoprotektivum in dieser Zeit auf die Zelle einwirkt, oder erst später zugegeben wird, hat laut Okano [160] keine Bedeutung.

Gil [74] verglich eine Zugabe von Glycerin (Kryoprotektivum) bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $15^{\circ}\text{C}$  [74, 160]. Er stellte fest, dass das Kryoprotektivum erst zugegeben werden sollte, wenn das Sperma auf  $4^{\circ}\text{C}$  abgekühlt ist. Seine Untersuchungen ergaben bessere Motilitäts- und Morphologieparameter nach dem Auftauen, wenn das Kryoprotektivum erst zum abgekühlten Samen zugegeben wird.

Glycerin bietet sich als Kryoprotektivum an und wird am meisten verwendet [53, 160, 222]. Bei der Verwendung von Ethylenglykol sind die Motilitätsparameter wie auch die Membranintegrität kurz nach dem Auftauen besser. Danach nimmt die Motilität jedoch rasch ab [200].

Als weiterer Zusatz werden oft SDS (Sodium Duodecyl Sulfat)-haltige Pasten verwendet. SDS wirkt auf die Löslichkeit von Proteinen und somit auf das Eigelb ein. Die Proteine im Eigelb werden aktiviert und gelöst. Sie wirken sich schützend auf die Spermien aus [87, 196]. Eine solche SDS-haltige Paste ist die Equex STM Paste. Nach Traas [226] werden die Motilitätsparameter bei deren Verwendung gesteigert. Außerdem wird ein positiver Effekt auf die Akrosomen erreicht [226].

Rota [196] verglich die Qualität von mit und ohne Equex STM Paste verdünntem Sperma. Direkt nach dem Auftauen ließ sich kein Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. Nach

einer Stunde sank die Motilität der mit Equex STM Paste verdünnten Probe um nur 19,4 Prozent, während die der Kontrollgruppe um 65,3 Prozent sank. Die Plasmamembran wurde in der Kontrollgruppe in 67,8 Prozent der Fälle geschädigt, bei der Equex STM - Gruppe nur in 22,4 Prozent der Fälle. Der Anteil an Spermien mit intaktem Akrosom war in der Equex STM - Gruppe ebenfalls höher. Rota schloss daraus, dass durch die Equex STM Paste Vitalität und Langlebigkeit der Zellen verbessert werden. Eine andere SDS-haltige Paste ist die Orvus ES Paste. Sie besitzt laut Graham [79] eine sehr ähnliche Zusammensetzung und ist damit in ihrer Wirkung äquivalent zur Equex STM Paste. In seinem Versuch stellte Tsutsui [232] fest, dass die Zugabe von Orvus ES Paste Aktivität und Motilität der Zellen steigerte. In seiner Studie von 1999 wurden von zehn künstlich besamten Tieren neun trächtig. Er führte dies auf den schützenden Effekt des SDS auf die Spermien zurück, was deren hohe Motilität verlängerte. Zur Kryokonservierung der Spermien verwendete er einen Tris Eigelb Fructose Citrat-Verdünner mit Orvus ES Paste.

Vor dem Einfrieren muss das auf 4°C abgekühlte Sperma in ebenfalls auf 4°C gekühlte, gefriertaugliche Behältnisse gefüllt werden. Während die meisten Autoren 0,5 Milliliter große Röhrchen verwenden [53, 160, 180, 94, 196], benutzen andere 0,25 Milliliter große Röhrchen [28] oder 1 Milliliter große Röhrchen [232].

Nöthling [155] verglich das Einfrieren mit 0,25 und 0,5 Milliliter Röhrchen. Als Qualitätsparameter verwendete er die Motilität und die Morphologie der Spermien. Fünf Minuten nach dem Auftauen ließ sich noch kein Unterschied feststellen. Nach 60 Minuten Aufbewahrungszeit sind Morphologie und Motilität des Spermas im 0,5 Milliliter Röhrchen besser. Er begründete das Ergebnis damit, dass 0,5 Milliliter Röhrchen den Spermien einen besseren Abkühlvorgang ermöglichen.

Die Röhrchen werden nicht sofort in flüssigen Stickstoff getaucht, sondern erst für einige Zeit im Stickstoffdampf gehalten. Sie werden für ca. 10 bis 15 Minuten zwischen drei und zehn Zentimeter über dem Stickstoffspiegel aufgereiht. In welcher Höhe die Röhrchen tatsächlich platziert werden, sollte wiederum von der Röhrchengröße abhängig gemacht werden [155]. Bei 0,5 Milliliter Röhrchen ist nach Nöthling [155] ein Abstand von acht Zentimeter optimal. Da die optimale Abkühlrate zwischen 10 und 30 °C pro Minute liegt, muss der Abstand so gewählt werden, dass der Abkühlvorgang in etwa in dem Tempo erfolgt.

Neben der Möglichkeit, Spermien mit flüssigem Stickstoff einzufrieren, kann auch ein sogenannter Ultrafreezer eingesetzt werden. Der Ultrafreezer ist am besten vergleichbar mit einer haushaltsüblichen Gefriertruhe, die auf -152°C abkühlt. Alamo [6] meinte, dass Geräte wie der Ultrafreezer vor allem in Regionen, in denen Stickstoff sehr teuer oder nur schwer zu beschaffen ist, eine gute Alternative darstellen. Das Sperma kühle dabei recht langsam ab. Die Abkühlrate beträgt zwischen 5°C und -10°C 5°C/Minute, zwischen -10°C und -100°C 30°C/Minute und zwischen -100°C und -130°C 10°C/Minute. Als Vorteil sah er, dass die Spermien dadurch geschont werden, dass beim Be- und Entladen des Ultrafreezers keine Temperaturschwankungen auftreten. Auch Schäfer-Somi [204] äußerte sich positiv gegenüber

dem Freezer. In Ihrer Studie schnitt dieser nicht schlechter ab, als die Konservierung mit flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen werden die Röhrchen meist für 30 [180] bis 60 Sekunden [28, 160, 200] in 37°C warmes Wasser verbracht werden, während sie von anderen für nur acht Sekunden in 70°C [155, 204, 169, 223, 171, 94, 6, 171] warmes Wasser gegeben werden. Im Versuch wiesen bei 70°C aufgetaute Spermien einen deutlich geringeren Anteil an annormalen Spermien auf [155]. Werden die Proben bei 70°C aufgetaut, verbessert sich die Vorwärtsbeweglichkeit nach dem Auftauen kurzfristig (5min) um ein Prozent, langfristig (60 Minuten) um zwei Prozent, der Anteil annormaler Spermien steigt um sechs Prozent. Schon nach acht Sekunden jedoch liegt bei einem 0,5 Milliliter Röhrchen die Temperatur bei 40°C. Deshalb sollten die Röhrchen nach exakt 8 Sekunden aus dem Wasser genommen werden.

In seiner Studie von 1999 verglich Pena [168] zwei in Skandinavien etablierte Konservierungsprotokolle, nämlich die Anderson- und die Clone-Methode. Sie unterscheiden sich in Verdünner, Einfrier- und Auftauvorgang. Anderson verwendete einen Trispuffer-Fruktose-Zitronensäure Verdünner. Mit diesem verdünnte er das Sperma auf  $100 \times 10^6$  Spermien pro Milliliter. Nach einer Ruhezeit von zwei Stunden bei einer Temperatur von 4°C wird die Samenprobe in 0,5 Milliliter Röhrchen gefüllt. Nach einer Lagerungsdauer von zehn Minuten etwa vier Zentimeter über dem flüssigen Stickstoff, werden die Röhrchen in den Stickstoff verbracht. Der Auftauvorgang erfolgt bei 70°C für etwa acht Sekunden. Bei der Clone-Methode dagegen werden zwei verschiedene Verdüner verwendet. Der erste Verdünner wird bei Raumtemperatur zugegeben. Der zweite Verdünner wird nach einer Ruhezeit von einer Stunde bei 4°C zugegeben. Das Sperma liegt dann ebenfalls in einer Konzentration von  $100 \times 10^6$  Spermien pro Milliliter vor, und wird in 0,5 Milliliter Röhrchen gefüllt. Die Röhrchen werden dann für jeweils zwei Minuten 7 und 13 Zentimeter und schließlich für eine Minute 20 Zentimeter tief in den Stickstoffbehälter gehalten. Danach werden auch diese im flüssigen Stickstoff versenkt. Der Auftauvorgang erfolgt bei 37°C für 15 Sekunden. Der Versuch ergab, dass die mit der Anderson-Methode eingefrorenen Spermproben nach dem Auftauen eine höhere Motilität und Thermoresistenz aufwiesen. Dennoch führte eine künstliche Besamung mit Samenproben, die mit den beiden Protokollen kryokonserviert wurden, zu ähnlich hohen Trächtigkeitsraten [78, 128, 168]. Zwei Jahre zuvor verglich Ström [217] ebenfalls diese beiden Protokolle. Er erhielt dabei ein ähnliches Ergebnis. Lediglich direkt nach dem Auftauen erhielt Ström für die Clone-Methode höhere Motilitätswerte.

## 2.4 Künstliche Besamung

Bei der künstlichen Besamung tragen folgende Faktoren zum Trächtigkeitsergebnis bei: Fruchtbarkeit des Rüden, Qualität der Samenkonservierung, weibliche Fruchtbarkeit, Besamungszeitpunkt, Besamungsmethode, Besamungsdosis und Anzahl der Besamungen [53].

### 2.4.1 Festlegung des Besamungszeitpunktes

Der Östrus dauert bei der Hündin in etwa eine Woche. Etwa 48 Stunden nach Beginn des Östrus kommt es zur Ovulation der Eizellen. Nach ihrer Reifung im Ovidukt (meiotische Teilung), die etwa zwei Tage dauert, sind sie für ein bis drei Tage befruchtungsfähig [227, 225]. Frisches Sperma ist im Uterus der Hündin maximal vier Tage, gefrorenes Sperma maximal 24 Stunden haltbar und befruchtungsfähig [227, 37]. Für die Kapazitation der Spermien, die für ein Eindringen der Samenzelle in die Eizelle notwendig ist, wird ein Zeitraum von ca. sieben Stunden angegeben [227, 134]. Die Besamung muss also in der Fertilisationsperiode erfolgen, die im Bereich von zwei bis fünf Tagen nach den Ovulationen liegt [230, 182]. Dieser enge Zeitrahmen erfordert eine exakte Bestimmung des Zyklusstandes der Hündin [227, 225].

#### 2.4.1.1 Zyklusbestimmung

Die Zyklusbestimmung kann mittels Beobachtung des Verhaltens, Adspektion und Palpation der äußeren Genitale, Vaginoskopie, Vaginalzytologie und Progesteronbestimmung erfolgen [150, 155].

Bei einer Hündin im Östrus ist der Duldungsreflex auslösbar. Die Vulva ist noch geringgradig ödematisiert. Eventuell ist ein fleischwasserfarbener Ausfluss sichtbar. In der Vaginoskopie stellt sich die Vaginalschleimhaut ebenfalls geringgradig ödematisiert und gefältelt dar. Diese Symptome können durch Adspektion, Palpation und Vaginoskopie erkannt werden [150, 197].

Wertvolle zusätzliche Informationen für die Bestimmung des Ovulations- und damit Besamungszeitpunktes können die Vaginalzytologie und die Progesteronbestimmung geben [230]. Diese Untersuchungsmethoden werden am besten in Kombination durchgeführt.

Da der Aufbau der Vaginalschleimhaut zyklischen Veränderungen unterliegt, kann der Zyklusstand unter anderem mittels Vaginalzytologie bestimmt werden. Unter Östrogeneinfluss nimmt die Dicke der Schleimhaut zu. Die lumenseitigen Zellschichten werden dabei weniger durchblutet und degenerieren. Zu Beginn des Östrus liegt der Anteil kornifizierter Zellen in der Vaginalschleimhaut deshalb bei über 80 Prozent [182, 225, 38], später im Östrus bei ca. 90 Prozent. Ab Beginn des Östrus sollten alle ein bis zwei Tage Schleimhautabstriche durchgeführt werden. Die Ovulationen erfolgen ca. 48 Stunden nach Beginn des Östrus. Durch Spezialfärbungen lassen sich die kornifizierten Zellen leicht von den gut durchbluteten Zellen differenzieren. Der Anteil sog. azidophiler Zellen in der Papanicolau-Färbung sollte zum Zeitpunkt der Ovulationen größer als 90 Prozent sein. Ein zusätzliches Kriterium sind die

vorgefundenen Zelltypen. Im Östrus findet man z.B. kaum Erythrozyten, dafür aber viele Schollen (Superfizialzellen ohne Kern).

Der Progesteronwert wird wegen seines charakteristischen Verlaufs zur Zyklusbestimmung verwendet. Am Tag Null, also zu Beginn des Östrus, steigt sein Wert erstmals über 2ng/ml [225, 234, 150]. Zum Zeitpunkt der Ovulationen der Eizellen erreicht er Werte von über 4ng/ml [182]. Nach den Ovulationen übersteigt er Werte von 7ng/ml [182]. Einige Autoren führen die Progesteronmessung als sehr exakte diagnostische Maßnahme täglich durch, um den Besamungszeitpunkt genau festzulegen [150, 94].

Die LH-Wert Bestimmung ist eine weitere Möglichkeit den Ovulationszeitpunkt festzulegen. Der LH-Peak befindet sich genau am Tag Null und damit 48 Stunden vor den Ovulationen [150, 225, 230]. Damit ist seine Bestimmung diagnostisch sehr wertvoll [214]. Allerdings ist die quantitative Bestimmung des LH-Hormons schwierig und die LH-Ausschüttung ist nur von sehr kurzer Dauer, weswegen die LH-Bestimmung für die Routinediagnostik wenig geeignet ist.

Eine Kombination von Zytologie und Progesteronmessung führte bei Cremonesi [38] zu guten Ergebnissen. Bei ihm erfolgte die Besamung exakt 48 Stunden nachdem der Progesteronwert über 6,5 ng/ml gestiegen ist, und der Anteil verhornter Zellen über 90 Prozent lag. Cremonesi [38] erreichte damit eine Trächtigkeitsrate von 87,5 Prozent. Thomassen [225] ist der Ansicht, dass die Bestimmung des Besamungszeitpunktes mit Hilfe der klinischen Untersuchung nur dann sinnvoll ist, wenn eine Hormonbestimmung nicht möglich ist. Er begründete dies damit, dass die klinischen Anzeichen zwischen den Hündinnen zu stark variieren. Laut Thomassen wird der Besamungszeitpunkt am Besten mit LH- oder Progesteronmessung oder der Beobachtung der Follikel mittels Ultraschall festgelegt [225].

#### 2.4.1.2 Ovulation und Besamungszeitpunkt

Die Eizellen benötigen nach den Ovulationen zwei bis drei Tage, dann erreichen sie die Metaphase II [225, 199]. Erst in dieser Phase sind sie befruchtungsfähig. Die Besamung mit gefrorenem Sperma sollte also frühestens 24 und spätestens 78 Stunden nach den Ovulationen erfolgen [197, 225, 199]. Frisches Sperma ist länger im weiblichen Genitale haltbar. Deshalb sind bei der Verwendung von frischem Sperma für eine Besamung meist vom Tag der Ovulationen bis einen Tag vor Beginn des Diöstrus gute Konzeptionschancen gegeben [225].

Nach Tsumagaris [227] Untersuchungen waren die Eizellen 60 bis 108 Stunden nach den Ovulationen befruchtungsfähig. Da kryokonserviertes Sperma weniger als 24 Stunden haltbar ist [190], legte er den optimalen Besamungszeitpunkt auf Tag vier bis sieben (nach Beginn des Östrus) fest [227]. In seiner Studie von 2003 untersuchte er den Einfluss des Zeitfaktors auf das Befruchtungsergebnis. Die Hündinnen wurden zum Vergleich an Tag fünf und/oder sieben besamt. Während er für die Besamungen an Tag fünf 45 Prozent und für Tag sieben

55 Prozent Trächtigkeiten erreichte, sind es für eine Doppelbesamung an den Tagen fünf und sieben 80 Prozent. Er schloss daraus, dass es keinen Unterschied macht, an welchem der Tage die Hündinnen besamt werden, dass jedoch eine Doppelbesamung gegenüber der Einzelbesamung zu den höheren Trächtigkeitsraten führt.

Nishiyama [151] verglich in seiner Studie Doppelbesamungen an den Tagen fünf und sieben mit Doppelbesamungen an den Tagen vier und sechs. Er erhielt mit den Besamungen an den Tagen fünf und sieben doppelt so hohe Konzeptionsraten als an den Tagen vier und sechs. Thomassen [94] besamte an Tag vier und fünf, Tsutsui [234] und Nizanski [150] an den Tagen vier und sechs. Sie alle führten Doppelbesamungen durch, da sie sich dadurch ein höheres Befruchtungsergebnis erhofften. Pretzer [182] und Cremonesi [38] bevorzugten die Einzelbesamung. Sie orientierten sich exakt am Progesteronwert. Pretzer besamte nach täglicher Progesteronkontrolle 72 Stunden nachdem der Wert über 4 ng/ml [182] gestiegen ist. Cremonesi [38] besamte 48 Stunden, nachdem der Progesteronwert über 6,5 ng/ml gestiegen ist.

#### 2.4.2 Besamungsdosis und Spermadeponierung

Für ein positives Besamungsergebnis muss eine ausreichend hohe Anzahl motiler und befruchtungsfähiger Spermien zu den Eizellen gelangen. Die tatsächliche Anzahl an Spermien, die notwendig ist, um ein gutes Trächtigkeitsergebnis (Konzeption, Wurfgröße) zu erhalten, hängt von der Art der Samenkonservierung (frisch, gekühlt, kryokonserviert) und von der Lokalisation der Spermadeponierung bei der Künstlichen Besamung ab [150, 197]. Je nach Konservierungsart wird das Sperma mehr oder weniger geschädigt. So findet man in kryokonservierten Spermaproben nach dem Auftauen deutlich weniger motile Spermien. Viele kryokonservierte Spermien haben eine geschädigte Membran oder einen veränderten Stoffwechsel [147, 128, 199]. Dementsprechend wird beim Einsatz von kryokonserviertem Sperma eine deutlich höhere Besamungsdosis benötigt, als bei einer frischen Spermaprobe [150, 197, 153, 199]. Als Mindest-Besamungsdosis für tiefgefrorenes Sperma werden zwischen  $150$  und  $200 \times 10^6$  Spermien angegeben [199].

Das Sperma kann intrauterin oder intravaginal deponiert werden [150, 197, 128]. Bei der intravaginalen Besamung müssen die Spermien noch die Cervix durchqueren, bevor sie in den Uterus gelangen. Die Cervix stellt eine Barriere dar, die den Durchfluss der Spermien behindert. Ob bei der Cervixpassage beim Hund auch eine Selektion der Spermien nach Morphologie oder anderen funktionellen Kriterien erfolgt, ist nicht bekannt. Frisches Sperma ist deshalb für eine intravaginale Besamung deutlich besser geeignet als kryokonserviertes Sperma [126, 210, 128]. Für eine intrauterine Besamung kann dagegen auch gut kryokonserviertes Sperma benutzt werden [128, 11, 199, 182].

Nizanski [150] führte bei insgesamt 152 Hündinnen eine intravaginale Besamung durch. Er wollte in seiner Studie das Besamungsergebnis für frisches und kryokonserviertes Sperma vergleichen. Dafür verwendete er mindestens 250 Millionen Spermien pro Besamungsporti-

on, wobei er darauf achtete, dass die Besamungsdosis bei kryokonservierten Spermien 1,5 - 3 mal so hoch war als bei der Verwendung von frischen Spermien. Bei der Verwendung von frischem Sperma ergab sich eine Konzeptionsrate von 86 Prozent (Wurfgröße 5,8 Welpen). Bei der Verwendung von gefrorenem Sperma lag die Konzeptionsrate bei 59,4 Prozent, die Wurfgröße war mit 3,9 Welpen deutlich kleiner. Nizanski schloss daraus, dass die Verwendung von gefrorenem Sperma bei einer intravaginalen Besamung unbefriedigende Ergebnisse liefert. Grund dafür ist seiner Meinung nach vor allem die verkürzte Lebenszeit von kryokonserviertem Sperma in Vagina und Uterus.

Silva [210] verglich in seiner Studie verschiedene Besamungstechniken, die sowohl mit frischem als auch mit gefrorenem Sperma durchgeführt wurden. Es wurden Hündinnen mit kryokonservierten oder mit frischen Samenproben jeweils intrauterin und intravaginal doppelt besamt. Er verwendete dabei je  $310 \times 10^6$  frische Spermien aber nur je  $200 \times 10^6$  kryokonservierte Spermien. Das Ergebnis zeigte, dass er bei der Verwendung von frischem Sperma 100 Prozent Trächtigkeiten, bei der Verwendung von gefrorenem Sperma dagegen nur 60 Prozent Trächtigkeiten, unabhängig von der Besamungstechnik, erzielte. Es ist allerdings zu beachten, dass die Besamungsdosis des qualitativ schlechteren kryokonservierten Spermias geringer gewählt wurde, als für das qualitativ bessere frische Sperma.

In einer Studie von Linde-Forsberg [128] wurden insgesamt 274 Hündinnen verschieden oft mit kryokonserviertem Sperma besamt. Dabei sollten die intrauterine und intravaginale Besamung, sowie die Anzahl der Besamungen miteinander verglichen werden. Die Besamungen erfolgten zwei bis fünf Tage nach den Ovulationen. Der Erfolg der intravaginalen Besamung war stark von der Anzahl der Besamungen abhängig. Während mit einer einmaligen Besamung eine Trächtigkeitsrate von 34 Prozent und eine Wurfgröße von durchschnittlich 2,5 Welpen erzielt wurde, waren es bei einer Doppelbesamung 60 Prozent Trächtigkeiten und 3,4 Welpen. Dies steigerte sich bis zu fünf Besamungen in einem Östrus auf 80 Prozent Trächtigkeiten und bis zu 5,0 Welpen (Dreifach- und Vierfachbesamung). Für die intrauterine Einzelbesamung erhielt Linde-Forsberg eine Trächtigkeitsrate von 84 Prozent und eine Wurfgröße von 5,0 Welpen. Auch hier war die Tendenz zu erkennen, dass sich bei einer Erhöhung der Besamungen die Ergebnisse verbessern. Nach einer Dreifachbesamung betrug die Trächtigkeitsrate 91 Prozent, die Wurfgröße 6,2 Welpen. Linde-Forsberg schloss daraus, dass mit einer intrauterinen Besamung ähnliche Trächtigkeitsergebnisse und Wurfgrößen erzielt werden können wie beim natürlichen Deckakt und die Ergebnisse der intravaginalen Besamung deutlich übertreffen. Sie stellte aber auch fest, dass das Ergebnis besonders für die intravaginale Besamung durch eine höhere Anzahl an Besamungen verbessert werden kann.

Rota [199] besamte in seiner Studie die Hündinnen intravaginal und intrauterin mit jeweils  $200 \times 10^6$  tiefgefrorenen Spermien. Mit intravaginaler Besamung wurden fünf von fünf Hündinnen trächtig, mit intrauteriner Besamung vier von fünf. Die Welpenzahl unterschied sich kaum und lag im Mittel zwischen drei und vier Welpen pro Hündin. Dagegen erzielte Olar [161] nur ein Besamungsergebnis von 25 Prozent nach mehreren intravaginalen Besamungen

mit einer Besamungsdosis von je  $100 - 150 \times 10^6$  tiefgefrorenen Spermien. Lees und Castleberry [123] besamten mehrmals intravaginal mit je mindestens  $100 \times 10^6$  kryokonservierten Spermien und kamen dabei auf ein Trächtigkeitsergebnis von 57 Prozent. In Untersuchungen von Nöthling [153] wurde mit einer Besamungsdosis zwischen  $9 \times 10^6$  und  $300 \times 10^6$  tiefgefrorenen Spermien und mehrmaliger intravaginaler Besamung eine Konzeptionsrate von 60 Prozent erreicht.

Bei einer intrauterinen Besamung werden, teilweise mit sehr geringen Besamungsdosen, sehr hohe Konzeptionsraten erzielt. Wilson [243] besamte intrauterin (Doppelbesamung) und verwendete dafür jeweils  $30 - 35 \times 10^6$  motile Spermien. Damit wurden 85 Prozent der Hündinnen trächtig. Thomassen [224] verwendete  $200 \times 10^6$  tiefgefrorene Spermien, und erzielte bei mehrmaligen intrauterinen Besamungen ein Trächtigkeitsergebnis von 75 Prozent, während es nach intravaginaler Besamung nur zehn Prozent waren. Die einmalige intrauterine Besamung mit  $100 - 150 \times 10^6$  motilen, tiefgefrorenen Spermien führte zu einer Trächtigkeitsrate von 88 Prozent und einer Welpenzahl von im Schnitt sieben Welpen [182].

Tsutsui [234] untersuchte die Minimalzahl frischer Samenzellen für eine intrauterine Besamung. Bei einer halben Millionen Spermien pro Besamung wurde keines seiner Tiere trächtig. Beim Einsatz von zwei Millionen Spermien wurden sechs von acht Tieren trächtig, von denen allerdings zwei abortierten und die übrigen vier nur zwei bis vier Welpen warfen. Bei vier Millionen Spermien wurden drei von acht Tieren trächtig, von denen jedoch nur eine Hündin eine normale Welpenzahl von sieben Welpen austrug. Diese Untersuchungen zeigen zwar, dass mit einer sehr geringen Anzahl an Spermien teilweise gute Trächtigkeitsraten erzielt werden können. Das Trächtigkeitsergebnis schwankt aber sehr stark und die Anzahl gebo-rener Welpen ist in der Regel gering. Derart niedrige Besamungsdosen wurden von keinem anderen Autor untersucht.

Insgesamt kann gesagt werden, dass mit der intravaginalen Besamung für kryokonserviertes Sperma deutlich geringere Konzeptionsraten erzielt werden als bei der intrauterinen Besamung [128].

### 2.4.3 Einfluss von Verdünnernzusätzen auf die Besamung mit kryokonserviertem Sperma

Unabhängig von der Besamungsdosis und dem Ort der Spermadeponierung, kann der Besamungserfolg für kryokonserviertes Sperma mit Hilfe spezieller Verdüner positiv beeinflusst werden. In diesen Verdünnern befinden sich in erster Linie Nährstoffe für die Zellen und verschiedene Zusätze, die Aktivität und Motilität der Spermien steigern sollen (siehe Abschnitt 2.3).

Nachdem Tsutsui [232], der in einer in vitro Studie einen positiven Effekt von Orvus ES Paste auf Akrosomen und Motilität der Samenzellen festgestellt hat, verwendete er diesen Verdünnernzusatz auch für Spermaproben zur Kryokonservierung. In seiner Studie wur-

den vier Hündinnen intrauterin mit Samenproben ohne Zusatz von Orvus ES Paste besamt ( $300 \times 10^6$  Spermien). Keine der Hündinnen wurde trächtig. Wurde dagegen Orvus ES Paste im Rahmen der Spermakonservierung verwendet, wurden neun von zehn Hündinnen, die mit  $100 \times 10^6$  Spermien besamt wurden, trächtig. Bei der intravaginalen Besamung wurden von neun mit  $10 - 40 \times 10^8$  Spermien (mit Orvus ES Paste) besamten Hündinnen nur zwei trächtig, bei Samenproben ohne Orvus ES Paste keine. Aus dem Ergebnis schloss er, dass beim Einsatz von Orvus ES Paste zur Kryokonservierung, hohe Konzeptionsraten erzielt werden können (intrauterine Besamung). Seiner Ansicht nach ist für diesen Effekt ein spezifischer Bestandteil dieser Paste, nämlich Natriumduodecylsulfat (SDS) verantwortlich (siehe Abschnitt 2.3.3.2). SDS ändert die Proteinstrukturen des im Verdünner befindlichen Eigelbs, welches dadurch einen Schutzmantel um die Samenzellen bildet [232]. Rota [197] benutzte die Equex STM Paste. Sie besitzt eine ähnliche Zusammensetzung und beinhaltet ebenfalls SDS. Bei der Spermauntersuchung ergab sich bei einem Zusatz von Equex STM eine erhöhte Aktivität und Motilität der Samenzellen. Der Einsatz von Equex STM zur Kryokonservierung von Samenproben hatte aber keinen Einfluss auf das Trächtigkeitsergebnis. Bei der intrauterinen Besamung wurden mit und ohne Equex STM fünf von fünf Hündinnen trächtig, intravaginal waren es vier von fünf.

Prostatasekret ist physiologischerweise im Ejakulat enthalten. Rota [199] untersuchte die Wirkung einer Zugabe von Prostatasekret nach dem Auftauen von kryokonserviertem Sperma (siehe Abschnitt 2.3.2). Nachdem sich dabei ein positiver Effekt auf die Motilität und Langlebigkeit der Spermien erzielen ließ, überlegten andere Autoren, ob damit auch ein positiver Effekt auf das Befruchtungsergebnis erreicht werden kann [102, 152].

Nöthling [152] untersuchte in der Studie von 1993, ob sich die Zugabe von Prostatasekret zu kryokonserviertem Sperma direkt vor der Insemination auf Trächtigkeitsrate und Wurfgröße auswirkt. Durch die Zugabe von Prostatasekret erhöhte sich die Trächtigkeitsrate von 60 Prozent auf 100 Prozent und die Wurfgröße von durchschnittlich 2,4 auf 5,2 Welpen. In der Studie von 2005 untersuchte Nöthling [155] erneut den Effekt von Prostatasekret. Dieses Mal besamte er die Hündinnen mehrmals mit immer demselben Volumen (7ml, die durch die Zugabe von Prostatasekret oder TALP erreicht wurden) intravaginal mit einer unterschiedlich hohen Anzahl an Spermien. Dabei stellte er fest, dass die Konzeptionsrate der Hündinnen, bei denen eine Besamungsdosis von 50 Millionen Spermien mit Prostatasekret verdünnt wurde, deutlich höher war, als bei mit TALP verdünntem Sperma. Seine Untersuchungen ergaben jedoch auch, dass sich dieser Effekt verringert, je höher die Anzahl an vorwärtsbeweglichen Spermien pro Besamung ist.

Hori [102] untersuchte den Effekt von Prostatasekret auf epididymale Spermien. Während die Spermien nach dem Auftauen vor der Zugabe von Prostatasekret eine Motilität von 12,5 Prozent aufwiesen, wurde nach der Zugabe von Prostatasekret eine Motilität von 32 Prozent beobachtet. Die Konzeptionsraten nach intrauteriner Besamung betrugen 20 Prozent ohne und 80 Prozent nach Zugabe von Prostatasekret. Hori beobachtete auch, dass epididymale Samenproben mit Prostatasekret auch nach sechs Stunden Haltezeit bei  $20^\circ\text{C}$  noch eine

Motilität von 25,6 Prozent aufwiesen.

Andere Autoren vermuten, dass nicht das Prostatasekret selbst, sondern das erhöhte Volumen die Ursache für die erhöhte Fertilität ist. Mit dem erhöhten Volumen würde der Spermientransport beschleunigt und somit eine zeitnahe Befruchtung der Eizelle ermöglicht [150, 199]. Nöthling und Volkmann [150] waren der Ansicht, dass sich auch die Zentrifugation, die einer Verdünnung mit Prostatasekret vorausgeht, wegen der Verdrängung des Glycerins positiv auf die Fertilität auswirkt.

## 2.4.4 Besamungstechniken

Für eine erfolgreiche Künstliche Besamung ist auch die richtige Lokalisation der Sperma-deponierung notwendig [225]. Eine künstliche Besamung kann intrauterin oder intravaginal durchgeführt werden [225]. Während der Operateur für eine intravaginale Besamung nicht viel Erfahrung benötigt, da die Techniken leicht durchzuführen sind [227, 197], erfordert die intrauterine Besamung viel Geschick und Erfahrung [197, 227], oder ist im Falle einer Operation invasiv [197, 94, 38].

Nach einer intravaginalen Besamung muss das Sperma die Zervix, die ein Hindernis für die Spermien darstellt überwinden, was besonders bei der Verwendung von kurzlebigen, kryokonserviertem Sperma [197, 150] zu schlechteren Konzeptionsraten führt [94, 197, 150, 128, 227]. Eine intrauterine Besamung führt deshalb meist zu deutlich höheren Trächtigkeitsraten [197, 94, 150, 182, 121, 28, 224, 225, 128].

### 2.4.4.1 Intravaginale Besamung

Für die intravaginale Besamung wurden verschiedene Techniken entwickelt. In der Regel werden einfache Plastikkatheter verwendet. Es werden aber auch Rinderkatheter umgebaut, oder eigens dafür hergestellte, kommerzielle Katheter wie der Norwegische Katheter benutzt [225].

Der Norwegische Katheter wurde z.B. bei Rota [197] eingesetzt. Dieser führte den Katheter in die craniale Vagina ein und positioniert dort das Sperma. In seiner Studie wurden mit dieser Technik acht von zehn Tieren trächtig. Linde-Forsberg [126] und Nizanski [150] benutzten einen Rinderkatheter, mit dem sie das Sperma in den vorderen Teil der Vagina verbrachten. Nöthling [155] besamte seine Hündinnen in den Fornix der Vagina. In diesen wurde das Sperma mit Hilfe einer Injektionsspritze mit Plastikpipette über ein kurzes Stück Silikonschlauch hinterlegt.

Neben den einfachen Plastikkathetern gibt es noch kommerzielle Katheter mit aufblasbarem Latexballon. Der Latexballon kann aufgeblasen werden, sobald sich der Katheter in der Vagina befindet. Damit soll ein Zurückfließen des Spermas verhindert werden und der Bulbus des errigierten Hundepenis nachgeahmt werden. Zu den sogenannten Ballonkathetern gehören z.B. der Osiriskatheter und der Francekatheter [225].

Nizanski [150] verwendete den Osiriskatheter sowohl mit frischem als auch mit kryokonserviertem Sperma. Nachdem Nizanski das Sperma durch den Katheter in die Vagina gespritzt hatte, gab er noch 20 bis 40 ml Luft hinterher, um den Katheter vollständig zu entleeren. Für frisches Sperma erhielt er ein Besamungsergebnis von 81,8 Prozent. Im Vergleich dazu lag sein Trächtigkeitsergebnis bei der Verwendung des Rinderkatheter bei 86,3 Prozent. Es ließ sich keine Verbesserung der Konzeptionsrate durch den Ballonkatheter feststellen. Rota [197] besamte mit dem Osiriskatheter fünf Tiere. Drei davon wurden trächtig. Mit den Norwegischen Katheter erhielt er ähnliche Konzeptionsraten. Es wurden acht von zehn Tieren trächtig. Auch hier führte die Verwendung des Ballonkatheters zu keiner Verbesserung. Tsumagari [227] verwendete ebenfalls einen Ballonkatheter. Diesen schob er nur bis in den caudalen Bereich der Vagina. Dort wurde er durch Aufblasen des Ballons fixiert. Mit dieser Methode erhielt er für eine Doppelbesamung an Tag fünf und sieben eine Konzeptionsrate von 80 Prozent [37, 158, 182]. Er schloss daraus, dass mit dem Ballonkatheter eine hohe Trächtigkeitsrate erzielt werden kann.

Wie Vergleiche von Rota [197] und Nizanski [150] zeigen, werden durch die Verwendung von Ballonkatheter keine höheren Trächtigkeitsraten als bei der Verwendung von Kathetern ohne Ballon erzielt, obwohl sie das Sperma am Rückfluss hindern sollen [197].

#### 2.4.4.2 Intrauterine Besamung

Bei der Intrauterinen Besamung wird zwischen invasiven und nicht invasiven Methoden unterschieden.

Invasive Besamungsmethoden setzen eine Laparaskopie oder Laparatomie voraus. Beides erfolgt unter Vollnarkose. Die Narkose bedeutet viel Stress für die Hündin und erhöhte Kosten für den Besitzer [197]. Letztendlich birgt eine Anästhesie trotz großer Erfahrungen auf dem Gebiet immer ein geringes Risiko für die Hündin, das nicht vernachlässigt werden sollte [225].

Hori [102] besamte die Hündinnen in seiner Studie invasiv direkt in eines der Uterinhörner [124, 101]. In der vorhergehenden Studie [101] versuchte Hori, das Sperma mit Hilfe einer Glaskapillare in den beiden Eileitern zu positionieren [234, 101]. Auch Tsutsui [234] besamte intratubal mit einer Glaskapillare in die Ampulle des Eileiters ca. 2cm von den Eileiterfimbrien entfernt.

Andere Autoren bevorzugen nicht invasive Besamungsmethoden. Sie erfordern einiges an Geschick und Erfahrung vom Besamer [234, 227], bedeuten jedoch deutlich weniger Stress für die Hündin. Nicht invasive, intrauterine Besamungstechniken können dabei mit oder ohne Sichtkontrolle durchgeführt werden.

Transcervicale Besamungstechniken mit Sichtkontrolle werden mit Hilfe eines Endoskops durchgeführt. Der erste, der diese Methode beschrieb, war Wilson [243, 225]. Rota [197]

verwendete die transcervicale Besamungstechnik nach Wilson [197]. Dabei wird ein starres Urethero-Resoskop verwendet, das mit einer elektronischen Lichtquelle und einer Videokamera verbunden ist. Als Katheter dient ein Urinkatheter. Cremonsi [38] verwendete ebenfalls eine transcervicale endoskopische Technik. Nach der Vorbereitung von 200 bis 300 Millionen kryokonservierten Spermien, führte er ein Endoskop mit Lichtquelle, Videokamera und Besamungskatheter durch die Cervix in den Uterus ein, wo er das Sperma positionierte. Pretzer [182] benutzte einen ähnlichen Aufbau. Er führte ein langes starres Zystoskop mit Lichtquelle und Videokamera in die Vagina ein. Er verwendete dafür einen Urinkatheter, dessen Spitze abgeschnitten und abgerundet wurde, um die Schleimhaut der Hündin nicht zu verletzen.

Für die Besamung ohne Sichtkontrolle werden meist rostfreie Edelstahlkatheter wie z.B: der Norwegische Katheter verwendet [225]. Der Operateur benötigt für diese Methode etwas Erfahrung und Fingerspitzengefühl, da er die Cervix durch das Abdomen der Hündin hindurch ertasten und fixieren muss, um den Katheter hindurchschieben zu können. Thomassen [224] schob bei dieser Methode den rostfreien Edelstahlkatheter mit der einen Hand durch die Vagina, während die andere Hand die Cervix der Hündin durch das Abdomen hindurch fixierte [11, 224]. In den meisten Fällen wurde dieses Verfahren von den Hündinnen gut toleriert. Weniger als zehn Prozent mussten seinen Angaben zur Folge leicht sediert werden.

### 2.4.5 Nach der Besamung

Direkt nach der Besamung der Hündin stellen die meisten Wissenschaftler die Hündin für fünf bis zwanzig Minuten [197, 150, 101] mit den Hinterbeinen erhöht auf. Manche sperren sie auch in einen extra engen Käfig mit schrägem Boden ein, damit sie sich eine Weile nicht bewegen können, und das Sperma nach cranial fließt [207, 178]. Dieses Vorgehen soll die Wanderung der Spermien in den Uterus unterstützen [65, 207, 178] und ein Sammeln derselbigen vor der Cervix beziehungsweise vor den Uterinhörnern bewirken [141, 178]. Da diese Überlegungen nur auf Annahmen beruhen, und Stress für Mensch und Tier bedeutet, verglich Pinto [178] das Besamungsergebnis von Hündinnen, die die üblichen zehn Minuten mit den Hinterbeinen erhöht aufgestellt wurden mit Hündinnen, die nur für eine Minute schräg stehen mussten. Die Besamung erfolgte mit einer Rinderinfusionspipette und einer Besamungsportion von 200 Millionen motilen Spermien. Während die Gruppe mit zehn Minuten Hinterbeinerhöhung eine Trächtigkeitsrate von 86 Prozent und eine durchschnittliche Wurfgröße von 7,89 Welpen hatte, hatte die Gruppe mit einer Minute Hinterbeinerhöhung eine Trächtigkeitsrate von 94 Prozent mit derselben Wurfgröße. Pinto schließt daraus, dass die Dauer der Erhöhung keinen Einfluss auf die Fertilität nimmt. Begründen kann er dies damit, dass frisches Ejakulat mit agilen Samenzellen bei einer intravaginalen Besamung nur etwa 25 bis 120 Sekunden benötigt, um in den Uterus zu gelangen [231, 178].

# 3 Lernfälle

## 3.1 Allgemeines

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sind zwei Lernfälle entstanden. Diese wurden exemplarisch erstellt, um die Möglichkeit der Wissensvermittlung mit dem Medium "Lernfall" zu evaluieren.

### 3.1.1 Erwartungen an die Lernfälle

Die im Rahmen meiner Doktorarbeit entstandenen Lernfälle sollen, ein gewisses Grundwissen vorausgesetzt, den Studenten gynäkologisches Wissen vermitteln bzw. ihr bereits erlerntes Wissen festigen und überprüfen. Die Fälle wurden mit Hilfe des CASUS-Programms erstellt. Damit soll ein fallorientiertes, multimediales Lernen ermöglicht werden. Fälle aus der täglichen Praxis werden den Studenten durch zahlreiche Photos und Videos besonders anschaulich präsentiert. Während der Erarbeitung des jeweiligen Falles steht der Student vor all den Entscheidungen, die er später in der Praxis zu treffen hat. Mit dieser Methode soll den Studenten Wissen so praxisnah wie möglich vermittelt werden.

### 3.1.2 Lernfälle im Allgemeinen

Die Lernfälle des CASUS-Programms benutzen eine Form des E-Learnings. E-Learning kann als Kommunikationshilfe oder als eigenständiges System zur Wissensvermittlung dienen. Bei der Verwendung des E-Learnings als Kommunikationsmittel, können sich örtlich getrennte Personen zu Lerngruppen zusammenschließen, und über das Medium Internet in Kontakt stehen. Wird E-Learning zur reinen Wissensvermittlung genutzt, haben die Lernenden nicht notwendigerweise Kontakt zu anderen Lernenden oder zum Autor. CASUS-Lernfälle beschränken sich im Großen und Ganzen auf die reine Wissensvermittlung [205]. Lediglich die "Protestmailfunktion" ermöglicht es den Lernenden, den Autor auf Fehler im Fall aufmerksam zu machen.

Lernfälle stehen als interaktives Lehrmedium neben Vorlesungen und Büchern. Bücher sollen die Vorlesung ergänzen, indem sie den Studenten ein breites Wissen vermitteln.

Im Gegensatz zu den Büchern haben Lernfälle viele Vorteile. Während Studenten in Büchern nahezu unendlich viel Informationen bekommen können, filtern Lernfälle das Wissen. Nicht jeder Student hat von sich aus die Begabung Wichtiges von weniger Wichtigem oder sogar Unwichtigem zu unterscheiden. Lernfälle stellen, trotz einer sehr umfassenden Wissensvermittlung, die wichtigen Lernziele in den Vordergrund. Das geschieht unter anderem, indem jedes wesentliche Lernziel noch einmal als Frage formuliert wird. Eine solche Strukturierung der Themen soll den Studierenden ein System vermitteln, Wichtiges von Unwichtigem zu unterscheiden. Das ist für den beruflichen Alltag unbedingt notwendig [131]. Wie oben erwähnt, werden in Lernfällen den Lernenden zu jedem Lernziel Fragen gestellt, die es zu beantworten gilt. Dadurch wird der Lernende dazu angehalten, das soeben Gelernte noch einmal zu rekapitulieren, was den Lernerfolg nachweislich steigert.

Der Lernende rückt von der passiven in die aktive Rolle, die von diesem auch gerne angenommen wird. Es steigert einerseits die Motivation, sich mit Lernfällen zu beschäftigen, andererseits besteht das Lernen dadurch nicht nur aus sturem Auswendiglernen [136]. Die Lernenden müssen sich mit einem Problem beschäftigen und dieses selbstständig lösen. Sie reaktivieren bereits Gelerntes, indem sie sich damit auseinandersetzen. An sich vorhandenes, aber nicht bewusstes Wissen wird dadurch zu aktiv anwendbarem Wissen [244]. Neben der Wiederholung und Aktivierung von bereits Erlerntem, wird das Wissen durch ausführliche Antworten, Infotexte und viele Quervernetzungen stark erweitert. Komplizierte Sachverhalte können durch bildliche Darstellungen wie Photos und Videos zusätzlich vereinfacht werden.

Auch gegenüber reinen Vorlesungen besitzen Lernfälle viele Vorteile. Während eine Vorlesung nur in einem Tempo erfolgt, das sich am zu vermittelnden Stoffumfang und dem Leistungsvermögen des Durchschnittsstudenten orientiert, können sich die Studenten bei der Bearbeitung des Lernfalles beliebig viel Zeit lassen [32]. Außerdem sind sie völlig flexibel, wann, wo und wie lange sie sich mit einem Lernfall beschäftigen. Das wiederum kann zu einer Verbesserung des Zeitmanagements des Lernenden beitragen, indem dieser "Freistunden" aktiv nutzt [32, 21]. Eine solche Flexibilität im Zeitmanagement erlaubt den Lernenden einen individuellen Zeitrhythmus. Es gibt verschiedene "Lerntypen", die ihre "Lernhochs" zu unterschiedlichen Zeiten haben. Während die meisten Menschen ihr Lernhoch zwischen 9.00 Uhr Vormittags und 13.00 Uhr Mittags haben [125], lernen andere am Abend besonders gut. Im Gegensatz zu den Vorlesungen, die zu bestimmten Zeiten abgehalten werden, kann der Student hier seine Zeit völlig frei gestalten [242, 21, 142, 237].

Die Flexibilität bei der Bearbeitung eines Lernfalles betrifft aber nicht nur das Zeitmanagement, sondern auch das Vorwissen des Lernenden. Während für einen Besuch der Vorlesung immer ein gewisses Vorwissen vorausgesetzt wird, hat der Student bei Lernfällen die Gelegenheit, sich dieses Wissen während der Bearbeitung der Fälle anzueignen. Dies kann durch zahlreiche Querverweise, oder ein beiliegendes Buch geschehen.

Zudem können Lernfälle die Vorlesung optimal ergänzen. Der Lernerfolg ist nachweislich größer, wenn der Vorlesung eine Übung folgt. Oft können diese allerdings aus zeitlichen und

finanziellen Gründen an einer Hochschule nicht durchgeführt werden. An ihrer Stelle können Lernfälle stehen, und somit das in den Vorlesungen erworbene Wissen nachhaltig festigen [165].

Trotz der vielen Vorteile hat die Arbeit mit Lernfällen auch einige Nachteile. Die Lerndisziplin ist nicht bei jedem gleich groß. Lernprogramme jedoch fordern viel Selbstdisziplin vom Einzelnen. Vorlesungen mit Anwesenheitskontrolle und anschließender Erfolgskontrolle durch Prüfungen üben einen gewissen Zwang auf die Studenten aus, der dazu führt, dass sie die Vorlesungen besuchen, und sich mit dem besprochenen Thema beschäftigen.

Der Mensch lernt am schnellsten, wenn möglichst viele Bereiche seines Gehirns angesprochen werden. Es ist also sinnvoll, das visuelle und das auditive Zentrum gemeinsam anzusprechen. Deshalb kann ein Lernfall, der hauptsächlich das visuelle Zentrum beansprucht, die Vorlesung, die vor allem das auditive Zentrum anspricht, sehr gut ergänzen, aber nicht ersetzen [34, 166].

Lernfälle sollen dazu dienen, allen Tiermedizinstudenten Wissen zu vermitteln. Jede Hochschule und jeder Lehrstuhl setzt jedoch andere Maßstäbe. Also ist für ein erfolgreiches Bestehen der Prüfungen ein Besuch der Vorlesung unerlässlich.

Ein weiterer Nachteil von Lernfällen ist das Fehlen vom persönlichen Kontakt zum Vortragenden oder Tutor. Bei Vorlesungen hat der Student vor, während oder nach der Vorlesung die Möglichkeit, den Vortragenden direkt mit aufgetretenen Fragen zu konfrontieren. Auf der anderen Seite kann der Vortragende eventuell entstandenes Fehlwissen in die richtigen Bahnen lenken. Beides ist im Lernfall nicht möglich. Trotz oftmals verwendeter Tutorfunktionen hat der Student keinen persönlichen Ansprechpartner, der ihm ungeklärte Fragen beantworten kann.

Zuletzt fehlt bei der Bearbeitung von Lernfällen jeglicher Sozialkontakt. Hochschulen sind auch dazu da, soziale Kontakte zu knüpfen. Diese sind aus zweierlei Hinsicht von Vorteil. Auf der einen Seite lernen die Studenten auf Menschen zuzugehen und richtig mit ihnen umzugehen. Auf der anderen Seite haben sie oft die Möglichkeit, für die Zukunft wichtige Kontakte zu knüpfen, die Ihnen für die Jobfindung und -durchführung von Nutzen sein können.

Lernfälle sind letztlich sicherlich eine sinnvolle Ergänzung zu den Vorlesungen. Sie werden diese jedoch nicht ersetzen können. Da ein Lernfall auch nie jegliches Wissen zu einem Thema beinhalten kann, wird man auch in der Zukunft nicht auf Bücher verzichten können.

### 3.1.3 Der klinische Lernfall

Der klinische Lernfall soll die Studenten optimal auf die Arbeit in einer Klinik oder Praxis vorbereiten, ihnen klinisches Denken vermitteln und sie optimal auf die Prüfungen vorbereiten.

ten. Im Studium bekommen die Studenten viel theoretisches Wissen vermittelt und lernen viel auswendig. Oft geschieht dies ohne wirkliches Verständnis für den Zusammenhang. Im Lernfall sollen die Studenten theoretisch Erlerntes in die Praxis umsetzen. Sie sollen die für den entsprechenden Fall wichtigen Dinge aus dem Erlernten herausfiltern und richtig anwenden. In jedem einzelnen Fall werden sie vor verschiedene Probleme gestellt. Für diese Probleme müssen Lösungen gefunden werden. Dabei können sie nicht auf auswendiggelernte Absätze aus dem Lehrbuch zurückgreifen. Ein grundlegendes Verständnis für die Sache ist notwendig. Sie müssen das Erlernte sinngemäß anwenden und ständig weiterdenken.

Zu Beginn der meisten klinischen Lernfälle betritt ein Patientenbesitzer mit dem Patienten den Raum. Nun muss ein Vorbericht erfragt werden. Aus den vielen Informationen, ist es die Aufgabe des Studenten, das Wichtige vom Unwichtigen zu trennen. Der Student muss sich mit den richtigen Fragen und Untersuchungen bezogen auf das gynäkologische Problem durch den Fall hangeln, bis er zu einer Diagnose gekommen ist. Dabei soll er lernen, die zur Verfügung stehenden Diagnostika richtig auszuwählen und zu benutzen. Nicht jedes diagnostische Hilfsmittel ist für jede Indikation geeignet. Deshalb ist es wichtig zu wissen, wann mit welchem Diagnostikum ein ausreichender Informationsgewinn erwartet werden kann.

Die Bilder und Videos in den Fällen erhöhen die Anschaulichkeit und den Lerneffekt. Sie sind an der richtige Stelle und nicht, wie in manchen vergleichbaren Büchern, drei Seiten weiter platziert. Auf diesen Bildern und Videos können sowohl sichtbare Symptome, als auch Diagnose- und Therapietechniken anschaulich dargestellt werden.

Wenn der Student die richtige Diagnose gestellt hat, ist es seine Aufgabe, sich zu überlegen, welche Therapiemöglichkeiten oder Lösungen es für das Problem gibt. Diese sollte er dem Patientenbesitzer aufführen und so erklären, dass er sich anschließend zusammen mit dem Besitzer für eine optimale Therapie oder Lösung entscheiden kann. Es ist wichtig für die Studenten, die verschiedenen Möglichkeiten für Diagnose und Therapie mit ihren Vor- und Nachteilen zu kennen und verstanden zu haben. Die meisten Besitzer fühlen sich nur kompetent beraten, wenn sie das Gefühl bekommen, ausreichend Information zu erhalten, um die Sachverhalte zu verstehen, und in die Entscheidung mit eingebunden wurden.

Letztendlich soll natürlich nicht nur der Besitzer zufriedengestellt werden, sondern auch der Patient optimal behandelt werden. Dazu ist ein grundlegendes Verständnis für das entsprechende Problem und dessen Lösung unerlässlich.

Im klinischen Lernfall werden die Studierenden also mit einem praxisrelevantem Problem konfrontiert. Sie erlernen ein strukturiertes Vorgehen, um unter Ausschluss sämtlicher anderer Möglichkeiten zur richtigen Diagnose und Therapie oder Lösung zu gelangen.

## 3.2 CASUS

Zu den vielen Funktionen und Möglichkeiten, die das CASUS-Programm bietet, wurde in den vergangenen Jahren bereits viel veröffentlicht (z.B. [205]). Deshalb beschränkt sich dieser Teil der Doktorarbeit auf die Teile des CASUS-Programms, die für die veröffentlichten Fälle relevant sind.

CASUS besteht aus drei Systemen. Die Kursverwaltung hat Zugriff auf alle drei Systeme, nämlich auf das Kursverwaltungs- und Evaluationssystem, auf das Autorensystem und das Abspielsystem. Die Autoren haben Zugriff auf das Autoren- und das Abspielsystem. Zusätzlich bekommt der Autor die Ergebnisse des Evaluationssystem, um die Fälle auswerten zu können. Der Lernende beschäftigt sich nur mit dem Abspielsystem.

### 3.2.1 Autorensystem

Der Autor muss sich zuerst bei der Kursverwaltung anmelden. Sobald er Kenn- und Passwort hat, kann er auch schon mit der Erstellung seines Lernfalles beginnen. Der Vorteil von CASUS ist, dass man für die Erstellung eines Lernfalles keine besonderen Computerkenntnisse benötigt, da das Programm selbsterklärend und einfach zu bedienen ist. Ein Blick auf die kurze "Bedienungsanleitung" ist dennoch sehr nützlich.

Nach der Anmeldung, wird der Autor dazu aufgefordert, einige Daten zum Fall (siehe Abbildung 3.1) anzugeben. Dazu gehören z.B. das Thema des Falles, das Institut, an welchem er arbeitet, wie lange die Bearbeitung des Falles in etwa dauert,... Außerdem kann er den Status des Falles angeben. So lange an dem Fall gearbeitet wird, ist er "in Bearbeitung" und außer für den Autor für niemanden zugänglich. Nach Fertigstellung des Lernfalles kann er zum Review freigegeben werden. Dort wird der Fall technisch und fachspezifisch korrigiert, um ein hohes Niveau der Lernfälle von CASUS zu gewährleisten. Danach wird er für alle freigeschaltet, die den Fall bearbeiten möchten. Selbstverständlich können aber auch zu diesem Zeitpunkt noch Änderungen/Verbesserungen am Fall vorgenommen werden, was wiederum dafür sorgen soll, dass die Lernfälle immer nach den neuesten Erkenntnissen überarbeitet werden können.

The screenshot shows the CASUS Web Editor interface in Mozilla Firefox. The browser address bar displays `http://vhb.casus.net/author/app/wa_workspace_fs2.html`. The page title is "CASUS Web Editor - Mozilla Firefox". The interface includes a menu bar with "Datei", "Bearbeiten", "Ansicht", "Chronik", "Lesezeichen", "Extras", and "Hilfe". Below the menu bar, there are navigation buttons for "Meistbesuchte Seiten", "Kostenlose Hotmail", "Links anpassen", "Windows Media", and "Windows". The main content area is titled "Metadaten" and "Weitere Metadaten". It contains a form with the following fields:

- Fall-ID: (text input)
- Fallname: (text input)
- Name des/der Autor(en): (text input)
- Institut: (text input)
- Fachgebiet: (dropdown menu)
- Schwierigkeitsgrad: (dropdown menu)
- geschätzte Bearbeitungsdauer: (text input) Minuten
- Zielgruppe: (dropdown menu) Lernfall (checkbox)
- Fallstatus: (dropdown menu)
- Sprache: (dropdown menu) de ISSN (text input)
- Inhaltliches Review:  Formales/Technisches Review:  Pädagogisches Review:
- Reviewernamen eingeben**
- Copyright geklärt:

There are two text areas for "Kommentar:" and "Interner Kommentar:". A "Speichern" button is located at the bottom left of the form. The footer of the page shows "Fertig".

Abbildung 3.1: Daten zum Fall

Am Anfang der Erstellung des Lernfalles hat der Autor zwei Möglichkeiten. Er kann zuerst eine Gliederung seines Lernfalles erstellen und das Inhaltsverzeichnis nach Kapitel und Unterkapitel einteilen und diese danach mit den zugehörigen Karten füllen. Er kann aber auch erst mit den Karten beginnen und sich später eine Unterteilung überlegen. Als Karte wird eine Lerneinheit bezeichnet, die aus einem Infotext, einer Aufgabe, der Antwort, dem Antwortkommentar und dem Multimedialeil besteht (siehe Abbildung 3.2). Sobald der Autor eine Karte erstellt, hat er eine leere Karte mit den angeführten Bestandteilen vor sich, die er lediglich füllen muss.

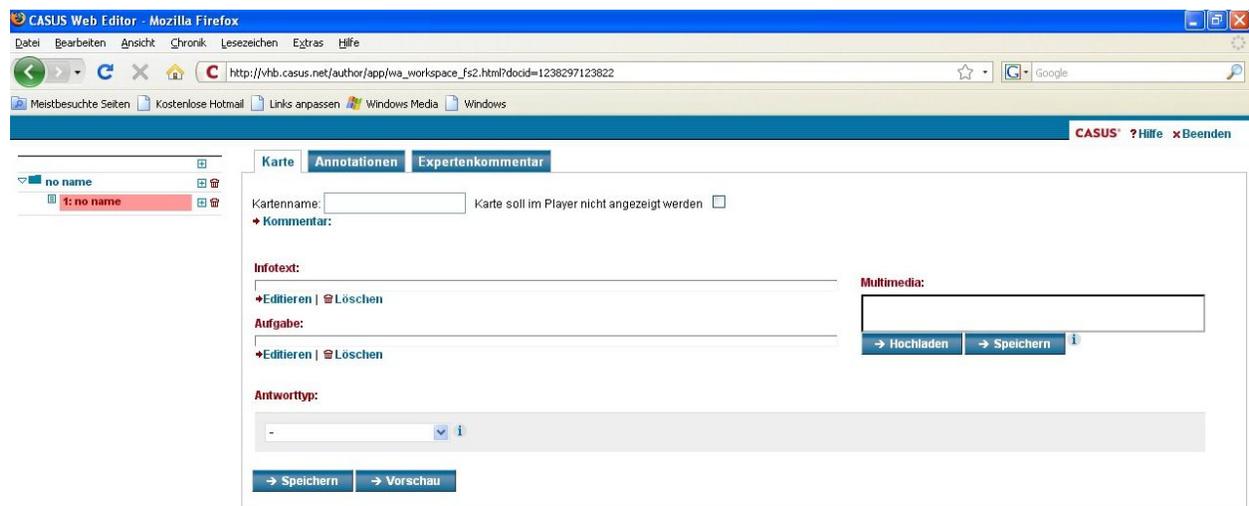


Abbildung 3.2: leere Karte

Abbildung 3.3: vollständig beschriftete Karte

Im Infotext, in der Aufgabe und im Antwortkommentar kann der Autor einen Text verfassen (siehe Abbildung 3.3). So kann er in den Infotext beispielsweise den Vorbericht, in der Aufgabe die Frage und in den Antwortkommentar die ausführliche Beantwortung der Frage schreiben. Der Text kann danach im sogenannten Stylemodus gestaltet werden. Der Stylemodus bietet unter Anderem die Möglichkeit bestimmte Textabschnitte fett, kursiv oder farbig darzustellen, um die Studenten auf besonders wichtige Teile hinzuweisen. Daneben gibt es die Möglichkeit des Hyperlinks, bei dem bestimmte Begriffe mit Internetseiten oder Textdateien verknüpft werden können. Diese Funktion wurde in den vorliegenden Fällen jedoch genauso wenig genutzt wie die Expertenfunktion. Damit die Studenten sich auf das Wesentliche konzentrieren, wurden die Antworten ausführlich erklärt. Nur in einzelnen Fällen wurde der Gedanke in einer Kurzinfo weitergeführt.

Im Antwortfeld dagegen muss sich der Autor zuerst überlegen, welchen Antworttyp er gerne hätte. Zur Verfügung stehen, wie in Abbildung 3.4 ersichtlich ist, Multiple Choice-, Freitext-, Reihenfolge-, Lückentextantworten und viele mehr. In den vorgestellten Lernfällen werden hauptsächlich Multiple Choice Antworten angeboten, um die Lösungen eindeutig zu gestalten. Fehler durch Rechtschreibfehler oder Synonyme sollen so verhindert werden.

Wiedergekommen und hoffen, dass es nicht schon zu spät für eine Besamung ist," erzählt er Herrn Dr. Mann. "Wollen sie ihre Hündin kurz auf den Tisch heben? Dann werde ich sie gleich untersuchen."

**Aufgabe:**  
Was sind die Anzeichen des Östrus bei der Hündin?

**Antworttyp:**  
Multiple Choice-Antwort

Blutiger Vaginalausfluß

Eine Vaginialschleimhaut

Eine hochgradig ödematöse

Progesteronwert über 1n

Mindestens 90 Prozent

Die Hündin duldet den F

**Antwortkommentar:**  
Zu Beginn des **Proöstrus** zeigen die Hündinnen oft blutigen Vaginalausfluß. Die Blutung wird in ihrem Verlauf schwächer. Die Vulva ist ödematisiert, die Vaginialschleimhaut hochgradig ödematisiert, rosarot, feucht und glänzend. In den Falten dieser ödematisierten Vaginialschleimhaut sammelt sich das Blut. In der Vaginalzytologie finden sich zu Beginn viele Zellen aus den tieferen Schichten und nur wenige Superficialzellen. Dies ändert sich schnell und der Anteil an Superficialzellen steigt stetig an. Der Progesteronwert liegt noch unter 1ng/ml. Der Proöstrus dauert 8-10 Tage.  
Der **Östrus** der Hündin zeichnet sich durch eine **zurückgehende Vulvödematisierung**, geringgradig fleischwasserfarbenen Vaginalausfluß und eine porzellanfarbene, in

Abbildung 3.4: Antworttyp

Im Multimediafeld können Bilder, Filme, Grafiken und Ähnliches heruntergeladen werden. Das Herunterladen geht einfach und schnell. Allerdings können nur bestimmte Formate und Größen heruntergeladen werden. So sollte ein Bild beispielsweise als .jpg-Datei mit max. 1MB und ein Video als .mpeg- oder .mov-Datei mit max. 10MB gespeichert sein. Neben jedes Bild kann ein kurzer Text als Erklärung eingefügt werden (siehe Abbildung 3.3). Außerdem kann jedes Bild direkt in CASUS bearbeitet werden. Die Funktionen dort sind jedoch sehr begrenzt, weswegen das Bild lieber, falls nötig oder gewünscht, vorher in einem speziellen Bildbearbeitungsprogramm bearbeitet werden sollte.

### 3.2.2 Abspielsystem

Auf das Abspielsystem hat jeder Zugriff, der den Fall bearbeiten will und sich vorher anmeldet hat, sobald der Fall für alle freigegeben ist. Ausnahme ist, wenn der Fall vom Autor

nur für eine bestimmte Gruppe, oder einen Kurs freigegeben ist. Der, der den Fall bearbeiten will, findet sich, wie in Abbildung 3.5, gleich nach der Auswahl des Falles auf der ersten Karte wieder. Die Karten, die der Bearbeitende sieht, werden gerne mit Karteikarten [205] verglichen. Zuerst sieht der Bearbeitende immer den Infotext, den Multimedialeil und die Frage zusammen mit den Antwortmöglichkeiten. Der Infotext führt ihn auf die Aufgabe hin. Hier steht alles, was für die Beantwortung der Frage notwendig ist. Der Multimedialeil dient entweder der anschaulichen Erklärung der vorherigen Karte, unterstreicht den Infotext oder wird aktiv in die Fragestellung mit einbezogen.

Spermagewinnung und Spermakonservierung - Mozilla Firefox

http://vhb.casus.net/author/app/cardtop2.html?docid=12382971239628pmwid=81BF29025615832E29F684EF91354C13

Meistbesuchte Seiten Kostenlose Hotmail Links anpassen Windows Media Windows

CASUS ? Hilfe x Beenden

Experte Clipboard Zurück Weiter Karte 1 von 20 | Vorbericht

10 Jahre später, Sie arbeiten in einer Kleintierklinik. Als nächsten Patientenbesitzer begrüßen Sie Herrn Meier mit seinem 9 Jahre alten Beaglerüden „Hans“. Er kommt heute zum ersten Mal zu Ihnen. Herrn Meiers Anliegen ist es, Spermia von seinem Hund zu gewinnen und aufbewahren zu lassen: „Wenn Hansi einmal nicht mehr ist, möchte ich gerne einen Nachkommen von ihm. Er ist ein so toller Hund.“ Sie sind etwas skeptisch, „Hätte er sich das nicht etwas früher überlegen können“, ist Ihr erster Gedanke.

**Aufgabe**

Welche Problematik sehen Sie bei einem alten Hund im Bezug auf eine Spermagewinnung und Samenkonservierung?

**Multiple Choice-Antwort:**

Bitte wählen Sie die entsprechenden Antworten aus.

A  Bei alten Hunden ist die Spermagewinnung immer vermindert

B  Die Libido könnte vermindert sein

C  Ein älterer Hund ist zu schwach um einen Deckakt durchzuführen

D  Bei alten Rüden nimmt die Häufigkeit von Hodentumoren und Prostataveränderungen zu

Abuschicken

Instruct AG (dbg: id=248081)

Abbildung 3.5: Karte mit Vorbericht, die der Bearbeitende sieht

Erst wenn der Bearbeitende die Frage beantwortet hat, kann er auf "Weiter" klicken. Auf der nächsten Seite taucht dann in diesem Fall ein meist recht ausführlicher Antwortkommentar inklusive einiger notwendiger zusätzlicher Erläuterungen auf. Klickt der Bearbeitende dann erneut auf "Weiter", gelangt er zur nächsten Karte. Im Verlauf des Falles wird der Bearbeitende dazu gezwungen eine Karte nach der anderen zu bearbeiten. Er kann keine Karte überspringen. Hat er allerdings zur Beantwortung der nächsten Frage erforderliche Informationen vergessen, kann er, wie in Abbildung 3.6 aufgezeigt, jederzeit auf jede beliebige bereits bearbeitete Karte zurückgreifen und noch einmal nachlesen. Jeder Karte ist deshalb eine möglichst aussagekräftige Überschrift zugeordnet, damit der Bearbeitende leicht die richtige Karte auswählen kann.

Zusätzlich hat der Student die Möglichkeit, eine sogenannte "Protestmail" zu verschicken. Das entspricht einer Korrekturfunktion. In dieser Nachricht kann er die Karte im Allgemei-

nen, aber auch durch das Hinzufügen eines Kommentars im Speziellen kommentieren bzw. kritisieren. Es ist die einzige Möglichkeit für den Studenten, mit dem Autor in Verbindung zu treten.

Künstliche Besamung - Mozilla Firefox

http://vhb.casus.net/autor/app/cardtop2.html?docid=12382971238648&pnwid=81BF29025615832E29F684EF91354C13

Meistbesuchte Seiten | Kostenlose Hotmail | Links anpassen | Windows Media | Windows

CASUS ? Hilfe x Beenden

Experte | Clipboard | Zurück | Weiter

Weitere fünf Wochen später steht Herr Baum wieder vor der Tür. Er möchte sich noch einmal bei Dr. Mann noch einmal den Ultraschallkopf auf und kann sofort mehrere lebende Welpen sehen. „Vielen lieben Dank Herr Dr. Mann“, freut er sich. „Ich hoffe, wir dürfen auch zur Geburt kommen.“ Ich freue mich schon auf ihre quirligen Prachtwelpen.

**Aufgabe**

Wieviele Welpen sehen Sie auf dem Bild?

**Multiple Choice-Antwort:**

Bitte wählen Sie die entsprechenden Antworten aus.

A  4  
B  6  
C  8

**Abschicken**

Instruct AG (dbg: id=251444)

Karte 18 von 18 | Weitere Untersuchung

- Karte 1 von 18 | Vorbericht
- Karte 2 von 18 | Entscheidung zur KB
- Karte 3 von 18 | Kryokonservierung
- Karte 4 von 18 | Gekühltes Sperma
- Karte 5 von 18 | Terminprobleme
- Karte 6 von 18 | Läufigkeitsinduktion
- Karte 7 von 18 | Planung der Bestellung
- Karte 8 von 18 | Gynäkologische Untersuchung
- Karte 9 von 18 | Erste Anzeichen des Proöstrus
- Karte 10 von 18 | Anzeichen des Östrus
- Karte 11 von 18 | Progesteronkurve
- Karte 12 von 18 | Besamungszeitpunkt
- Karte 13 von 18 | Ort der Samendeponierung
- Karte 14 von 18 | Besamungstechnik
- Karte 15 von 18 | Untersuchung der angelieferten Samenprobe
- Karte 16 von 18 | Trächtigkeitsuntersuchung
- Karte 17 von 18 | Anzahl der Welpen
- Karte 18 von 18 | Weitere Untersuchung

Röntgenbild einer Hündin mit vielen Welpen

Bild 1 von 1

Abbildung 3.6: Hier kann jede bereits bearbeitete Karte ausgewählt werden

Nach der letzten Karte gelangt der Bearbeitende mit dem nächsten Klick auf "Weiter" zu der Zusammenfassung der Fallsitzung. Auf dieser Seite wird die Prozentzahl der richtigen Antworten für jede Frage aufgelistet (siehe Abbildung 3.7).

Zusammenfassung Ihrer Fallsitzung

Wollen Sie einen neuen Fall beginnen oder das Programm beenden?

**Beenden** **Abbrechen** **Fallauswahl**

**Fallenname:** Künstliche Besamung  
**Score:** 92%

Kartenname	Kartenkommentar	Antworttyp	Erfolg
1	Vorbericht	Multiple Choice-Antwort	100%
2	Entscheidung zur KB	Multiple Choice-Antwort	100%
4	Gekühltes Sperma	Multiple Choice-Antwort	100%
5	Terminprobleme	Multiple Choice-Antwort	100%
6	Läufigkeitsinduktion	Multiple Choice-Antwort	100%
7	Planung der Bestellung	Multiple Choice-Antwort	100%
8	Gynäkologische Untersuchung	Multiple Choice-Antwort	100%
9	Erste Anzeichen des Proöstrus	Multiple Choice-Antwort	100%
10	Anzeichen des Östrus	Multiple Choice-Antwort	75%
11	Progesteronkurve	Multiple Choice-Antwort	100%
12	Besamungszeitpunkt	Multiple Choice-Antwort	100%
13	Ort der Samendeponierung	Multiple Choice-Antwort	100%
14	Besamungstechnik	Multiple Choice-Antwort	100%
15	Untersuchung der angelieferten Samenprobe	Multiple Choice-Antwort	100%
17	Anzahl der Welpen	Multiple Choice-Antwort	66%
18	Weitere Untersuchung	Multiple Choice-Antwort	100%

Fertig

Abbildung 3.7: Ergebnis der Bearbeitung des Falles

Über den einzelnen Karten steht der insgesamt erreichte Prozentsatz richtig beantworteter Fragen (siehe Abbildung 3.7). Darüber wiederum findet der Bearbeitende eine Auswahl, wie er fortfahren möchte. Er kann, wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist, das Programm komplett beenden, den Vorgang abbrechen, dann gelangt er wieder zurück zum Fall, oder er wählt die Fallauswahl. Dort kann er entweder den nächsten Fall zur Bearbeitung auswählen, oder den bereits bearbeiteten Fall evaluieren (siehe Abbildung 3.8).

Status	Fallname:	Evaluation	
1	 <b>Pyometra I Pathogenese, Diagnostik, Therapie</b>  <b>Autor(en):</b> Nina Hahn <b>Kommentar:</b> Pyometra IA <b>Letzte Aktualisierung:</b> 14. August 2008	Evaluere Fall	
2	 <b>Pyometra II Therapie</b>  <b>Autor(en):</b> Nina Hahn <b>Kommentar:</b> Geschlossene Form der Pyometra- Schwerpunkt Therapie <b>Letzte Aktualisierung:</b> 28. Juli 2008	Evaluere Fall	
3	 <b>Spermagewinnung und Spermakonservierung</b>  <b>Autor(en):</b> Ulrike Mittermeier <b>Kommentar:</b> <b>Letzte Aktualisierung:</b> 10. Januar 2008	Evaluere Fall	
4	 <b>Künstliche Besamung</b>  <b>Autor(en):</b> <b>Kommentar:</b> <b>Letzte Aktualisierung:</b> 10. Januar 2008	Evaluere Fall	

Abbildung 3.8: Fallauswahl

Idealerweise wird nach jeder Bearbeitung eines Lernfalles der Fall evaluiert. Anhand eines Fragebogens soll der tatsächliche technische und fachliche Anspruch der Lernfälle beurteilt werden. Außerdem wird erfragt, ob der Lernfall bei den Studenten ankommt. Mit Fragen wie: "Hat Ihnen der Fall Spass gemacht?" oder "War der Fall in seiner Gesamtdarstellung anschaulich?" soll diskutiert werden, ob die Erstellung von Lernfällen auf diese Art und Weise Sinn macht.

### 3.2.3 Kursverwaltungs- und Evaluationssystem

Das Kursverwaltungs- und Evaluationssystem ist dem Autor nur zu einem Teil zugänglich. Der Autor kann die gesamte Kursverwaltung und Evaluation beeinflussen. Er muss sich dabei jedoch immer mit der Kursverwaltung absprechen, denn allein die Kursverwaltung hat die Möglichkeit, Kurse zu erstellen, Laufzeiten zu vergeben und zu verlängern, Zugänge zu verteilen, usw. Wenn es irgendwie möglich ist, versucht die Kursverwaltung dabei auf die Wünsche des Autors einzugehen. Zu Beginn des Kurses, kann der Autor seine Wünsche, was die Anzahl der Kursmitglieder und die Dauer des Kurses angeht, äußern. Wenn es möglich ist, werden diese Wünsche berücksichtigt. Außerdem kann der Autor bei der Erstellung des Fragebogens mitwirken. Das ist auch in diesem Fall geschehen. Sollte der Autor bezüglich des Fragebogens keine bestimmten Wünsche haben, so erscheint ein von der Kursverwaltung erstellter Fragebogen am Ende jedes Lernfalles. Von mir wurde der angebotenen Fragebogen noch etwas ergänzt. Es hat mich zum Beispiel interessiert, in welchem Semester sich die Studenten befinden. Damit konnte ich herausfinden, in welchem Semester ein für die Bearbeitung der Lernfälle notwendiges Vorwissen vorhanden ist, und ob es vom Vorwissen abhängt, in wie weit die Lernfälle von den Studenten gerne angenommen werden. Der Fragebogen wird im Evaluierungsteil noch einmal ausführlich besprochen. Deshalb sollen diese Informationen vorerst genügen. Die bearbeiteten Fragebögen können vom Autor eingesehen werden. Damit

kann er feststellen, wie die Studenten die Lernfälle einschätzen, ob sie ihn schwer oder leicht fanden, und ob ihnen die Bearbeitung Freude bereitet hat. Zusätzlich bekommt der Autor auf Wunsch die Ergebnisse der Bearbeitungen mitgeteilt. Mit Hilfe derer kann er herausfinden, ob das Anforderungsniveau in etwa mit dem Wissensstand der Studenten übereinstimmt.

### 3.3 Zwei Lernfälle über die Künstliche Besamung beim Hund

Das Thema: "Künstliche Besamung beim Hund" wird für die Lernfälle in zwei Teile unterteilt. Eine Trennung in zwei Teile war unumgänglich, nachdem das Thema im Detail besprochen werden sollte, ohne den Rahmen eines Falles zu sprengen. Der erste Teil beschäftigt sich mit dem Rüden und beschreibt die Spermagewinnung, -untersuchung und -kryokonservierung. Der zweite Fall betrachtet den Part der Hündin. In diesem werden der Zyklus der Hündin, die Verwendungsmöglichkeiten der verschiedenen Methoden der Spermakonservierung mit ihren Vor- und Nachteilen, sowie die unterschiedlichen Techniken der künstlichen Besamung erläutert. In beiden Fällen soll der Alltag in einer gynäkologischen Tierklinik möglichst realistisch dargestellt werden. Die Studenten sollen Schritt für Schritt die Entscheidungen treffen, mit denen ein Tierarzt tagtäglich in seiner Praxis konfrontiert wird.

#### 3.3.1 Spermagewinnung und Konservierung

Der erste Lernfall beschäftigt sich mit der Spermagewinnung und -konservierung. Im Folgenden werden die wichtigsten Lernziele, die bei der Bearbeitung des Lernfalles erreicht werden sollen, dargestellt.

Der Lernfall kann in vier Teile unterteilt werden. Dabei beschäftigt sich der erste Teil (Karten 1 und 2) mit der Anamnese und der grundlegenden Diagnostik. Der zweite Teil (Karten 2-11) umfasst sämtliche weiterführende Techniken der Diagnostik, während im dritten Teil (Karten 12-18) die Lösungsansätze der Probleme im Vordergrund stehen. Der vierte Teil (Karte 19 und 20) setzt sich aus einem kurzen Exkurs mit zusätzlicher Information und der letztendlichen Erfolgskontrolle zusammen.

Das Lernziel im ersten Teil des Falles besteht aus Anamneseerhebung (Karte 1-Vorbericht) und grundlegender Diagnostik (Karte 2-Infotext). Der Student soll lernen, im anfänglichen Gespräch mit dem Besitzer die wichtigsten Informationen zu erfragen und sich daraus ergebende Probleme zu erkennen. In diesem Fall ist vor allem zu beachten, dass es sich um einen alternden Hund handelt, von dem Sperma gewonnen werden soll. Damit wird die Wahrscheinlichkeit der Beeinträchtigung der Sexualfunktion durch Hoden- oder Prostataveränderungen oder auch durch ein beeinträchtigtes Allgemeinbefinden größer. Die Allgemeinuntersuchung und die andrologische Untersuchung dienen dazu, sich ein Bild über den Patienten zu machen, wodurch solche Probleme erkannt oder ausgeschlossen werden können. Dem Studenten soll gezeigt werden, dass diese Untersuchungen für eine Problemlösung unumgänglich sind.

Im zweiten Teil besteht das Lernziel darin, die weiterführenden Techniken der Diagnostik anzuwenden und die Interpretation der Ergebnisse richtig vorzunehmen. Neben diesem grundlegenden Lernziel werden drei weitere Ziele verfolgt. Der Student soll wissen, dass eine funktionierende Libido die wichtigste Voraussetzung für eine Spermagewinnung ist. Deshalb sollte

der Student auch die Voraussetzungen (Karte 2) für eine funktionierende Libido (Gesundheit, Testosteron), deren Untersuchung (Karte 3 und 5 - Paarungsreflexkette) und eventuelle Störfaktoren (Karte 4 - äußere und innere Faktoren) kennen. In der Karte 6 und 7 lernen die Studenten, die wichtigsten anatomischen und funktionellen Besonderheiten des Rüden (besondere anatomische Einheit - Bulbus penis, fraktionierte Spermagewinnung) und ihre Bedeutung für den Ablauf der Spermagewinnung kennen (Karte 8). Der dritte Teil beschäftigt sich mit der Spermauntersuchung. Lernziel ist es, sämtliche Untersuchungsmethoden (z.B. LM, FM, CASA- Systeme) mit ihren Möglichkeiten zu kennen und zu wissen, wann welches diagnostische Instrument eingesetzt werden soll (Karte 9 und 10). Voraussetzung für die Beurteilung der Ergebnisse ist die Kenntnis der Normwerte, die in Karte 11 Thema sind.

Mit dem zweiten Teil ist die Diagnostik abgeschlossen. Der dritte Teil dient dazu, Lösungsansätze für die formulierten Probleme zu finden. Lernziel ist, die mit der vorherigen Diagnostik dargestellten Fakten zu ordnen und damit eine Problemlösung zu erstellen. Um das Sperma nach langer Zeit noch nutzen zu können, kann es kryokonserviert werden. Die Studenten sollen deshalb lernen, wie Sperma kryokonserviert werden kann. Wichtig ist dabei die Kenntnis über eine schonende Einfrieremethode (Karte 13-15 und 18) und den entsprechenden Verdüner (Karte 12) sowie die Bedeutung des Kryoprotektivums Glycerin (Karte 17), das die Spermien vor den schädigenden Effekten des Einfrierens (Karte 16) schützen soll.

Im vierten Teil soll den Studenten die Notwendigkeit einer Erfolgskontrolle (Karte 20) nahe gebracht werden. Zusätzlich soll dieser Teil dazu dienen, die Studenten auf hygienische und rechtliche Probleme hinzuweisen, die sich aus einer langfristigen Spermakonservierung und dem Transport über Ländergrenzen ergeben können (Karte 19).

### 3.3.2 Intrauterinbesamung mit kryokonserviertem Sperma

Im zweiten Lernfall geht es um die Durchführung einer Künstlichen Besamung.

Auch dieser Fall lässt sich in vier Teile unterteilen. Während sich der erste Teil (Karte 1) mit dem Vorbericht und der Erkennung des Hauptproblems beschäftigt, widmet sich der zweite Teil (Karte 2-10) ganz den verschiedenen diagnostischen Techniken, die, Schritt für Schritt angewandt, der Problemlösung dienen. Mit Hilfe der verschiedenen Ergebnisse, die sich aus dem zweiten Teil ergeben, kann im dritten Teil (Karte 11-15) die Künstlichen Besamung sinnvoll durchgeführt werden. Hier soll der Student die verschiedenen Techniken der Insemination erlernen. Der vierte Teil (Karte 16-18) dient wie im ersten Fall der Erfolgskontrolle der Lösungsansätze.

Das Lernziel des ersten Teils (Karte 1) ist, nach der Vorstellung des Patienten (eine Zuchthündin) und dem Vorbericht des Besitzers, die eigentliche Fragestellung heraus zu finden, die in den weiteren Teilen aufgearbeitet werden soll (Anamnese - Hündin in Deutschland soll mit Rüden aus Spanien gedeckt werden).

Im zweiten Teil (Diagnostikteil) geht es zuerst um die Fragestellung, wie eine solche Paarung ermöglicht werden kann (Karte 2). Der Student soll über die Möglichkeiten der Spermakonservierung (Karte 3 und 4) mit ihren Vor- und Nachteilen Bescheid wissen. Nachdem gekühltes und kryokonserviertes Sperma zur Auswahl stehen, sollen die Studenten eine Lösung für die Terminproblematik (Karte 5) finden, die sich bei der Verwendung von gekühltem Sperma ergeben würde. Bei der Bearbeitung dieser zwei Karten lernen die Studenten, wie eine Läufigkeitsinduktion (Karte 6) funktioniert, und welche Risiken sich dabei ergeben. Um eine Künstliche Besamung mit tiefgefrorenem Sperma im spontanem Zyklus durchführen zu können, ist eine gute Kenntnis des Zyklus der Hündin (Karte 7-10) erforderlich. Deshalb wird hier die gynäkologische Untersuchung (Karte 8) behandelt, um die wichtigen Symptome der verschiedenen Zyklusstadien zu erkennen. Da das Erkennen des Östrus allein für eine erfolgreiche Künstliche Besamung nicht ausreicht, werden zusätzlich die Methoden der Ovulationskontrolle (Karte 12) behandelt. Lernziel ist die Kenntnis der speziellen Untersuchungsmethoden zur Besamungszeitpunktbestimmung (vaginale Untersuchung, Schleimhautabstrich, Progesteronkurve) (Karte 11), und deren exakte Auswertung.

Im dritten Teil geht es um die Durchführung der Künstlichen Besamung. Die Studenten sollen die verschiedenen Techniken (Karte 13/14 - Techniken der intrauterinen und intravaginalen Besamung) kennen und wissen, welche Voraussetzungen für eine erfolgreiche Besamung gegeben sein müssen (Karte 15 - z.B. intravaginale Besamung am besten nur mit frischem Sperma,...).

Zum Schluss steht wieder die Erfolgskontrolle. Als Lernziel soll erreicht werden, dass die verschiedenen Untersuchungen zur Trächtigkeitsdiagnose benannt (Karte 16-18:Ultraschall, Röntgen, Relaxinkontrolle, Palpation,...) und angewendet werden können.

# 4 Evaluierung

## 4.1 Ziel der Evaluierung

Ziel der Evaluierung war es, den Sinn von Lernfällen allgemein und insbesondere der beiden erarbeiteten Lernfälle, zu untersuchen. Auf der einen Seite sollten die Studenten Interesse an den Lernfällen haben. Dazu war es notwendig, dass Sie einen Sinn in der Bearbeitung sehen (Lernerfolg, optimale Prüfungsvorbereitung, Vorbereitung auf die Praxis mit realistischen Fallbeispielen) und dass ihnen die Bearbeitung Freude bereitet. Auf der anderen Seite sollte der erwünschte Lerneffekt erzielt werden.

Die Evaluierung erfolgte mit Hilfe eines Fragebogens (siehe Abschnitt 4.2). Dieser Fragebogen erschien nach jedem bearbeiteten Fall und sollte von den Studenten, die den jeweiligen Lernfall bearbeitet haben, ausgefüllt werden.

Die Angabe des Fachsemesters sollte Rückschlüsse darauf zulassen, welches Vorwissen für eine Bearbeitung der Fälle notwendig ist. Vor allem Studenten im klinischen Semester, die kurz vor der Prüfung stehen, sollen weder unter- noch überfordert werden. Idealerweise sollten jedoch auch frühere Semester die Lernfälle, als Eigenprüfung und/oder Lehrmedium nutzen können, ohne wegen Überforderung abbrechen zu müssen. Zusätzlich sollen Lernfälle auch Absolventen und jungen Praktikern als gute Wiederholung von bereits Gelerntem mit Hilfe von konkreten Fallbeispielen dienen.

Die Frage nach der Anzahl der bearbeitenden Personen war für die Auswertung wichtig, um festzustellen, ob Studenten in der Gruppe solche Lernfälle bearbeiten, und welchen Erfolg sie damit erzielen.

Der zweite Teil bezog sich auf die Bearbeitung eines Lernfalls im Allgemeinen. Die Arbeit mit den Lernfällen soll den Studenten Freude machen, damit ihr Interesse für weitere Lernfälle gesteigert wird. Sie sollen aber auch einen ausreichenden Lernerfolg sehen, um die Lernfälle optimal in die Prüfungsvorbereitungen als Lehrmedium oder Leistungskontrolle mit einbeziehen zu können.

Der dritte Teil ging genauer auf den jeweiligen Lernfall ein. Jeder Lernfall für sich soll für die Studenten verständlich sein und in seiner Gesamtdarstellung einladend sein. Eine anspre-

chende Darstellung und gut strukturierte Gliederung wecken das Interesse der Studenten und erleichtern das Lernen. Mit Hilfe von Bildern können komplizierte Sachverhalte vereinfacht werden.

Im vierten Teil wurde die Technik des Programms behandelt. Die Computerkenntnisse eines durchschnittlichen Tiermedizinstudenten müssen für die Bearbeitung des Studenten ausreichen. Zusätzlich muss das Programm auch einwandfrei ablaufen. Funktioniert ein Programm nicht, sinkt die Freude an der Bearbeitung eines Lernfalls beträchtlich und die Konzentration lässt nach.

Der letzte Teil sollte darüber Aufschluss geben, für welche Semester der jeweilige Lernfall geeignet ist, ohne die Studenten zu unter- oder überfordern. Die Studenten sollten hier selbst den Schwierigkeitsgrad des jeweiligen Falles einstufen.

Im Feld für Kommentare konnten Dinge angesprochen werden, die eventuell vom Fragebogen nicht erfasst werden.

## 4.2 Fragebogen

Der Fragebogen sollte dazu dienen, die Ziele der Evaluierung zu erreichen. Im Folgenden wird der Fragebogen abgebildet.

Liebe Benutzerin, lieber Benutzer,

vielen Dank, dass Sie sich bereit erklärt haben, an der Evaluation des vorliegenden Lernfalles mitzuwirken. Sie helfen uns damit, die Akzeptanz durch die Benutzer einzuschätzen. Die Daten werden nicht personenbezogen gespeichert oder in irgendeiner Form mit Ihnen in Verbindung gebracht! Bitte nehmen Sie sich etwas Zeit und füllen den Bogen sorgfältig aus.  
**Vielen Dank!**

In welchem Semester befinden sie sich zur Zeit? <input type="text"/>				
1. Wie haben Sie den Lernfall bearbeitet?		Alleine	Zu zweit	In einer Gruppe
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Das Bearbeiten des Lernfalls</b>		trifft zu		Trifft gar nicht zu
3. ... hat mir Spass gemacht	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
4. ...hat mir Zusammenhänge vermittelt, die mir vorher unklar waren.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
5. ...hat mir meine Lücken aufgezeigt.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6. ...hat die Vorlesung sinnvoll ergänzt.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Der Fall...</b>				
8. ...ist gut strukturiert.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8. ...ist vom Stoffumfang her zu gross.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8. ...ist mit seiner Gesamtdarstellung (Photos, Videos) anschaulich.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8. ...liefert verständliche und ausreichende Erläuterungen.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Das Programm...</b>				
8. ...ist einfach zu bedienen.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8. ...lief einwandfrei.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
<b>Das Anforderungsniveau des Falles...</b>				
9. ...war zu hoch.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
9. ...war zu niedrig.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
11. Würden Sie gerne einen weiteren Lernfall bearbeiten?	<input type="radio"/>	ja	nein	<input type="radio"/>
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>		

Platz für Kommentar:

© Evaluation NMB-BMBF 2008

Abbildung 4.1: FragebogenI

## 4.3 Durchführung der Evaluierung

Ziel war es, für jeden Fall mindestens 50 ausgefüllte Fragebögen zu bekommen, die dann ausgewertet werden können. Die Studierenden mussten dazu eine Zugangsberechtigung erhalten, die von der Kursverwaltung eingerichtet worden war. Über den jeweiligen Zugang konnten die Studenten auf beide Lernfälle "Spermagewinnung und Spermakonservierung" und "Künstliche Besamung" zugreifen.

Um möglichst viele Studenten zu erreichen, wurden die Studenten auf mehreren Wegen angesprochen. Über die Fachschaft wurden Email-Adressen der in Frage kommenden Semester erfragt. Diese Email-Adressen konnten dann angeschrieben werden. Die Mails erhielten alle Informationen zu Lernfällen im Allgemeinen, die beiden Fälle im Speziellen, und wie die Studenten einen Zugang erhalten können. Dieselbe Information konnten die Studenten an mehreren Aushängen erhalten. Zusätzlich wurden Kurse im Rahmen der klinischen Rotation dazu genutzt, die Studenten auf die Lernfälle aufmerksam zu machen.

## 4.4 Auswertung

Die Lernfälle waren für die Studenten etwa ein halbes Jahr zur Bearbeitung und Evaluierung zugänglich. In dieser Zeit wurden für den 1. Fall "Spermagewinnung und Spermakonservierung" 69 Fragebögen, für den 2. Fall "Künstliche Besamung" 72 Fragebögen ausgefüllt. Die ausgefüllten Fragebögen kamen sowohl von Studenten, die auf die Nachricht über den Emailverteiler reagiert haben, als auch von Studenten der klinischen Rotation.

Die meisten der Studenten, die die Fälle bearbeiten haben, haben auch die Fragebögen bearbeitet. Einige Studenten haben einzelne Fragen nicht beantwortet. Die genaue Anzahl derer, die den Fall bearbeitet haben, den Fragebogen jedoch nicht ausgefüllt haben, lässt sich nicht genau ermitteln, weil die Ergebnisse der Fragebögen keinem Zugang zugeordnet werden können, um die Anonymität der Studenten zu gewährleisten. Bis auf eine Gruppe wurden die Fälle ausschließlich von Einzelpersonen bearbeitet.

Zugänge zu den Lernfällen wurden unter allen Studenten der klinischen Semesters verteilt, letztendlich wurden die Fälle aber hauptsächlich von den Semestern acht bis zehn bearbeitet. In acht Fällen wurden die Lernfälle durch Studenten der frühen klinischen Semester fünf bis sieben bearbeitet.

### 4.4.1 Allgemeine Beurteilung des Lernfalles als Lehrmedium

Dieser Teil der Fragebogens bezieht sich allgemein auf die Bearbeitung und den Nutzen von Lernfällen. Hier soll sich zeigen, ob die Studenten gerne Lernfälle bearbeiten und ob sie diese

Art des E-Learnings als gute Ergänzung zu den bisher verwendeten Lehrmedien (Vorlesung, Skripten, Bücher) sehen.

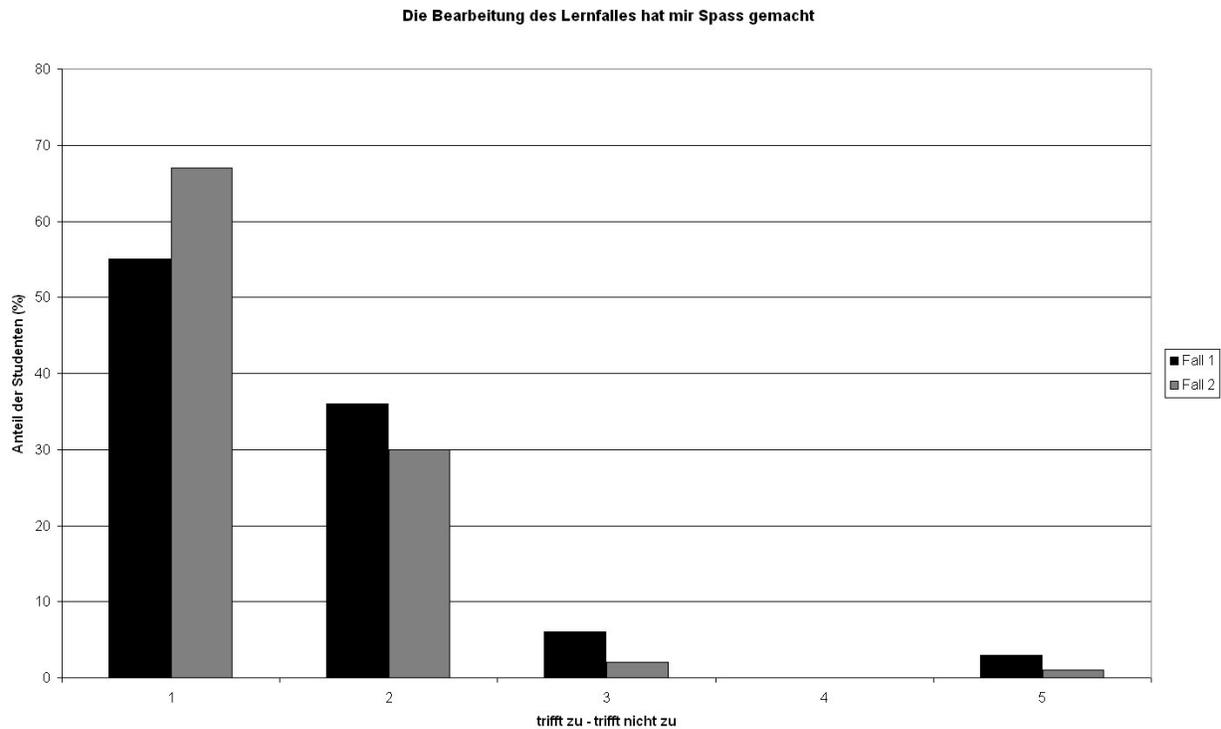


Abbildung 4.2: Freude

Die Frage, ob die Bearbeitung des Lernfalles Spass gemacht hat (Abbildung 4.2) wurde von über 50 Prozent der Studenten eindeutig positiv beantwortet. Dabei ist die Verteilung der Bewertungen bei den beiden Fällen sehr ähnlich. Lediglich ein einzelner Student hatte keine Freude an der Arbeit mit Lernfällen.

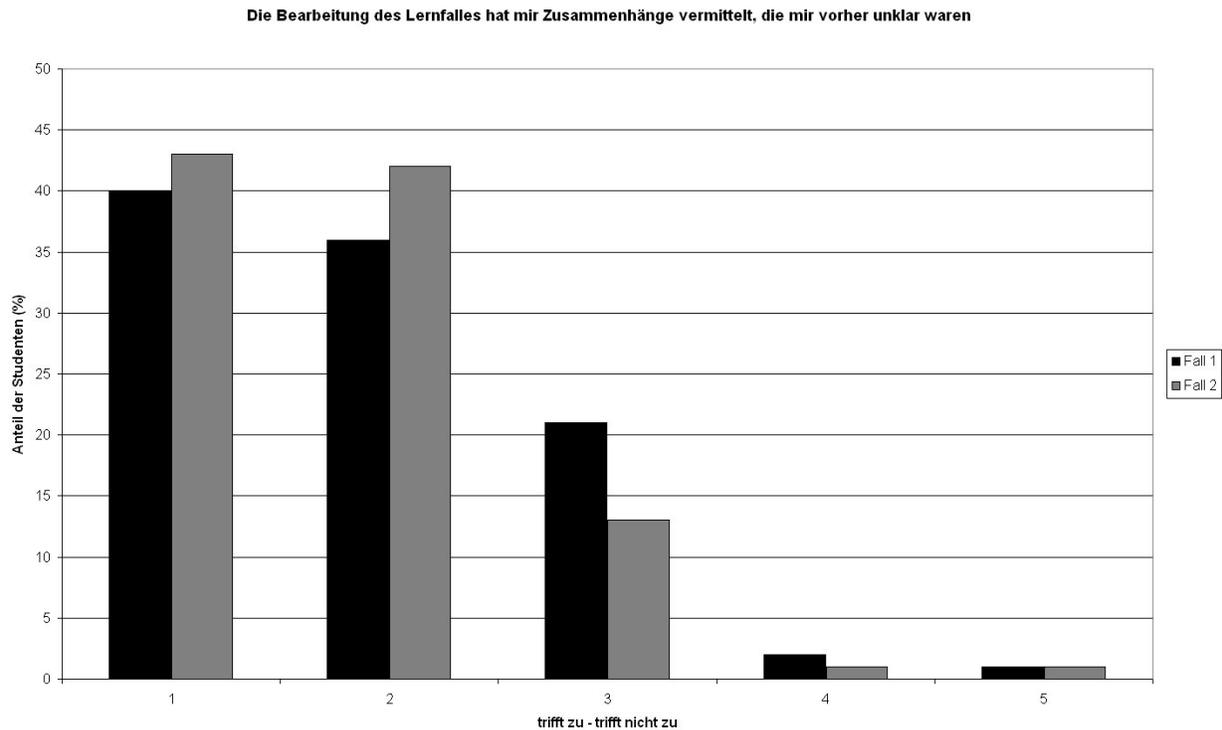
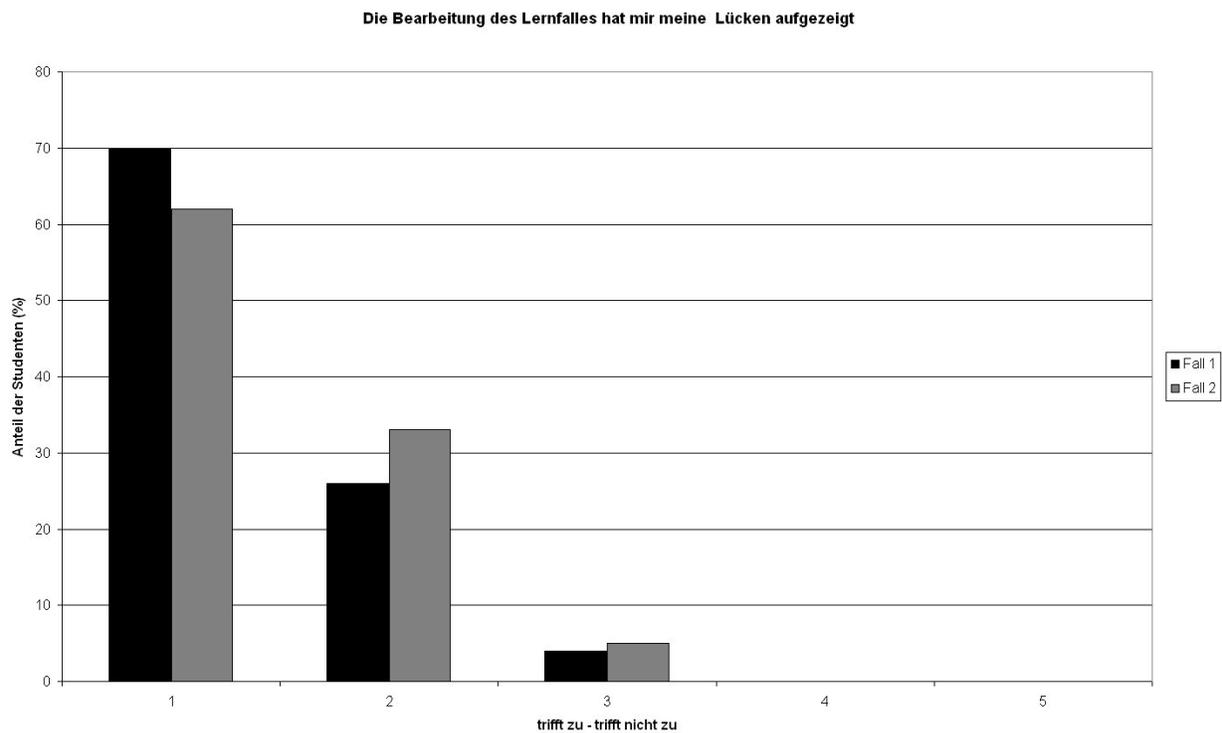


Abbildung 4.3: Zusammenhang

Bei der Frage, ob die Studenten nach der Bearbeitung der Lernfälle die Zusammenhänge der Thematik besser verstehen, ergab sich ein eindeutig positives Bild (Abbildung 4.3). Auch hier war die Beurteilung bei beiden Fällen ähnlich. Mehr als 70 Prozent der Studenten meinten, nach der Bearbeitung der Fälle die Zusammenhänge besser zu verstehen als vorher. Etwa ein Viertel der Studenten entschied sich hier für eine neutrale Bewertung. Eventuell waren dies Studenten mit einem sehr guten Vorwissen, die durch die Bearbeitung des Lernfalles keine zusätzlichen Informationen erhielten. Eine negative Bewertung wurde nur in einem Fall abgegeben.



*Abbildung 4.4:* Aufzeigung von Lücken

In den beiden Lernfällen sollte ein klinisches Thema möglichst umfassend und vollständig behandelt werden, um dieses Lernmedium auch bei der Prüfungsvorbereitung einsetzen zu können. Aus Abbildung 4.4 wird ersichtlich, dass 70 bzw. 63 Prozent der Studenten meinten, dass ihnen die Lernfälle sehr viele Wissenslücken aufgezeigt haben.

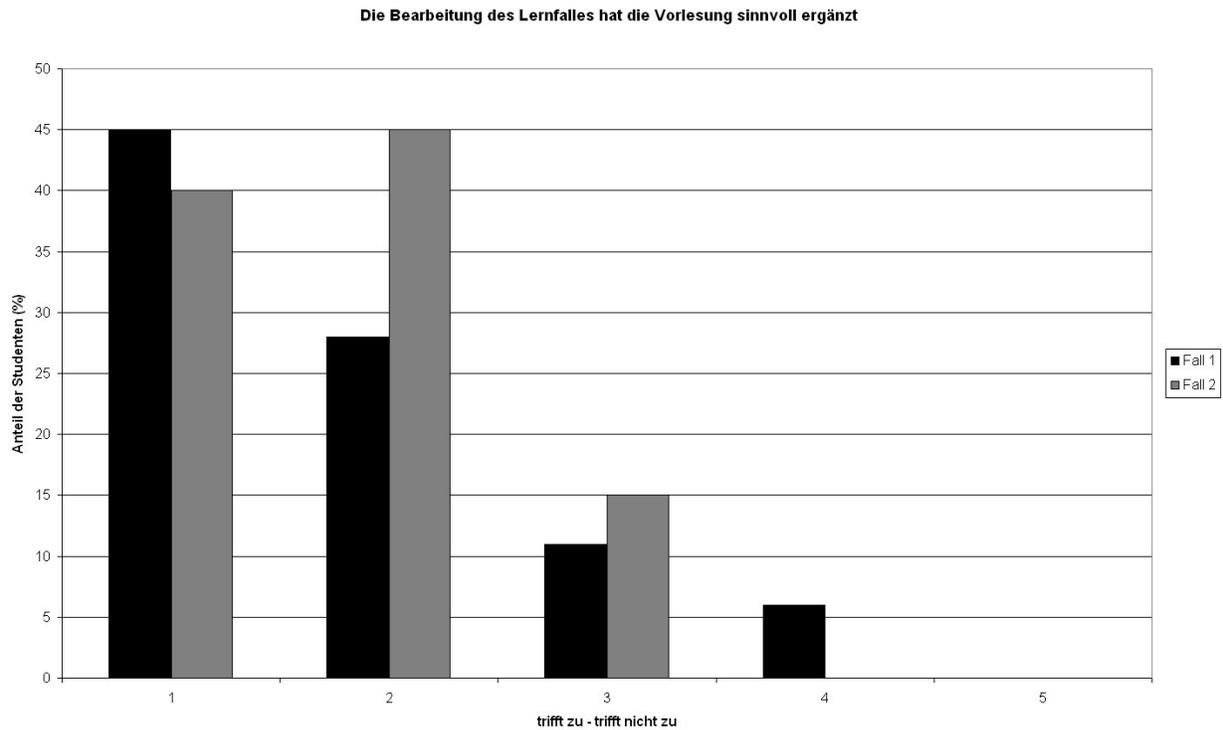


Abbildung 4.5: Ergänzung

Bei der Frage, ob bei der Bearbeitung der Lernfälle eine Synergie mit den Informationen der Vorlesung bestand, wurden ebenfalls vorwiegend positive Urteile abgegeben (Abbildung 4.5). Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass nicht bekannt ist, ob die Teilnehmer dieser Evaluierung die Vorlesung auch besucht hatten.

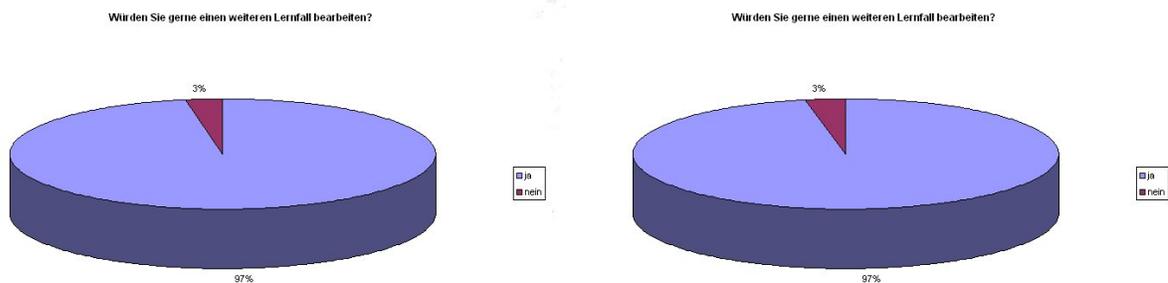


Abbildung 4.6: weitere Lernfälle?

Die positive Rezeption der Lernfälle durch die Studierenden zeigt sich nochmals bei der Frage nach der Bereitschaft (Abbildung 4.6), weitere Lernfälle zu bearbeiten. Nur ein bzw. 2 Studierende gaben an, an weiteren Lernfällen nicht interessiert zu sein.

#### 4.4.2 Beurteilung der fachlichen und didaktischen Aspekte der Lernfälle

Obwohl die allgemeine Rezeption des Lernmediums CASUS-Lernfall sich wahrscheinlich mit der Beurteilung des einzelnen Lernfalls überschneidet, wurde doch versucht, die Meinung der Benutzer über die allgemeine fachliche und didaktische Qualität der präsentierten Lernfälle zu erfragen.

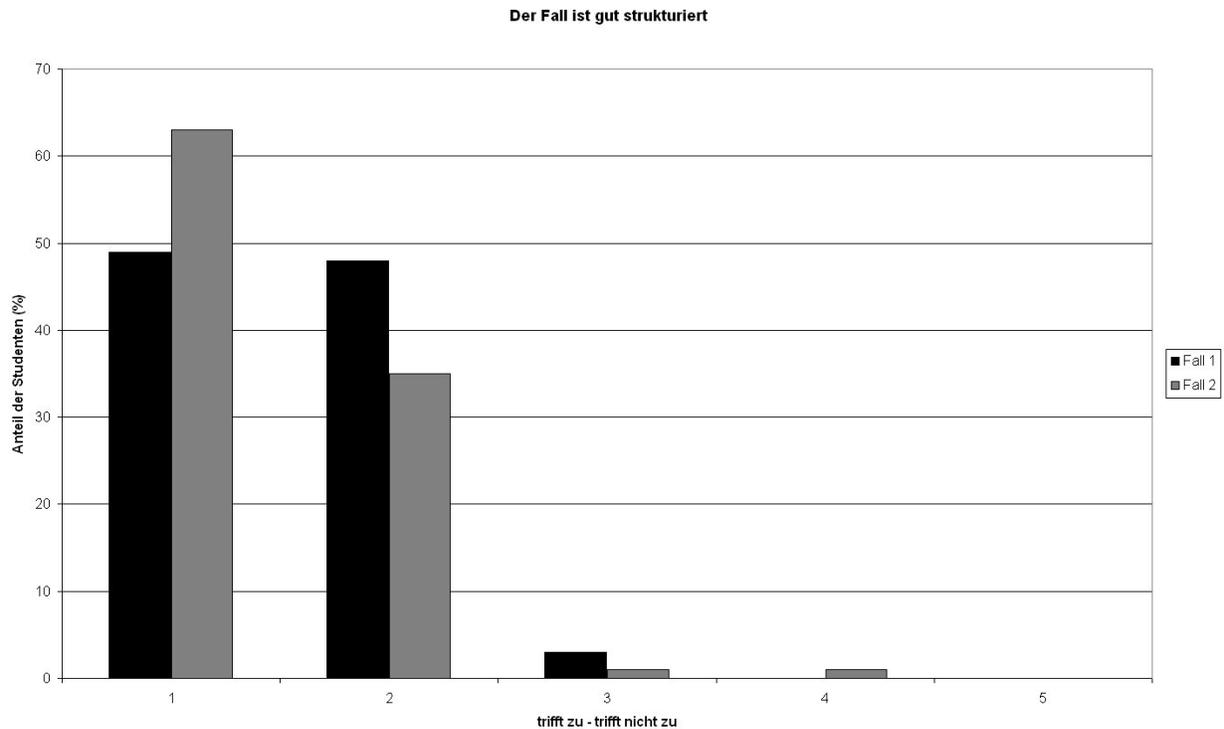


Abbildung 4.7: Strukturierung

Über 90 Prozent der Studenten waren der Ansicht, dass die Lernfälle sehr gut oder gut strukturiert waren (Abbildung 4.7).

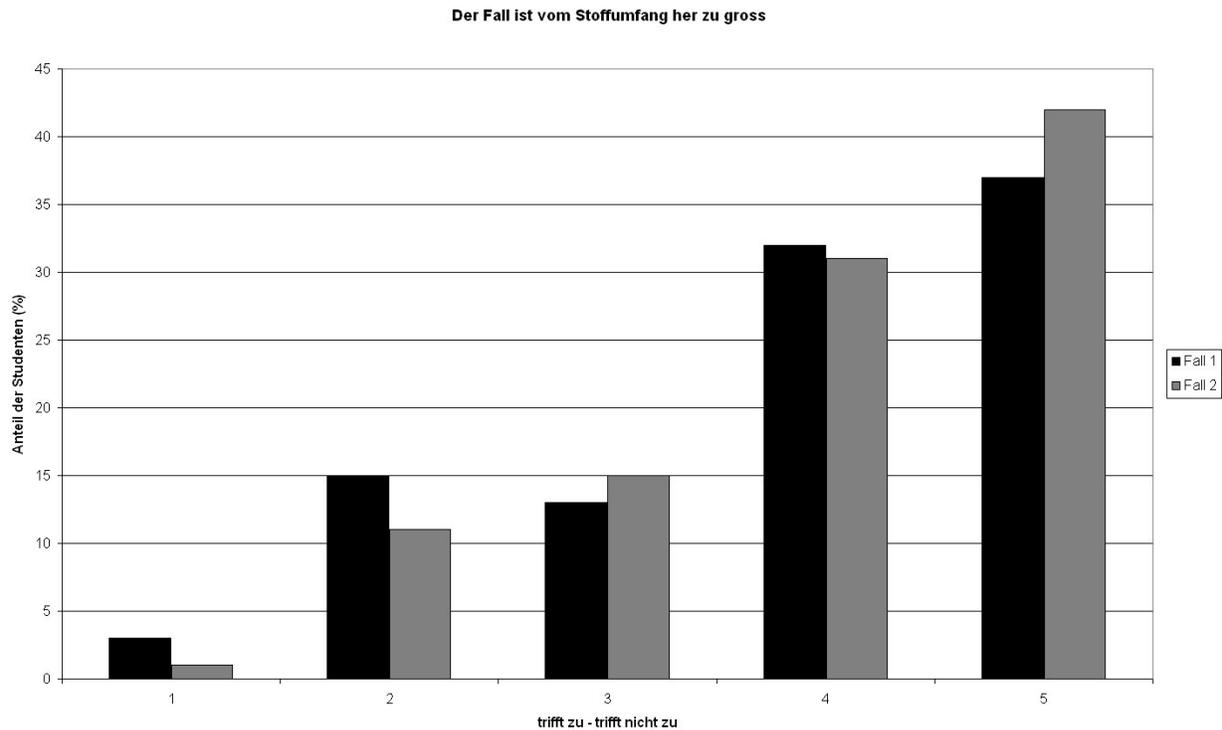
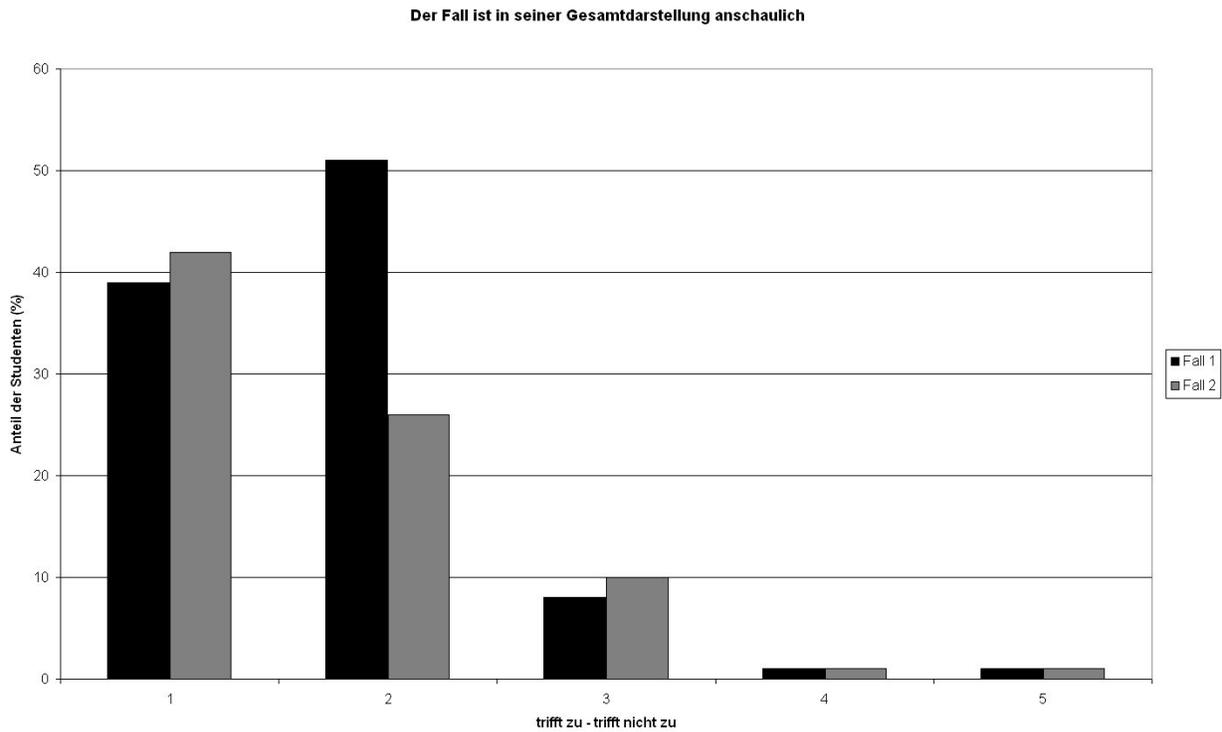


Abbildung 4.8: Stoffumfang

Bei der Frage nach dem Stoffumfang jeden Falles ergab sich ein breiteres Meinungsbild. Etwa zwei Drittel der Studenten (Abbildung 4.8) beurteilen den Stoffumfang als angemessen. 15 Prozent bewerteten neutral, aber etwa 15 Prozent der Studenten fanden den Stoffumfang zu hoch. Theoretisch könnte jedes der beiden Themen noch einmal in zwei oder sogar drei Lernfälle unterteilt werden. Zum einen würde jedoch mit einer derartigen Zersplitterung des gesamten Themengebietes eventuell der Zusammenhang der einzelnen Teilgebiete verloren gehen. Zum anderen würden einige Studenten sicher nicht alle vier bis sechs Lernfälle bearbeiten, wodurch ihnen dann ein Teil der Thematik fehlt. Die andere Möglichkeit ist, dass den Studenten der Informationsgehalt der Fälle zu hoch ist. Diese Tatsache könnte mit der Konzentration auf das absolut Wesentliche und zahlreichen Querverweisen auf Webseiten oder Textstellen in Büchern umgangen werden.



*Abbildung 4.9: Anschaulichkeit*

Bei den Lernfällen wurde versucht, möglichst jede Information mit Skizzen, Bildern und Videos zu untermalen. Die Fälle sollten so anschaulich wie möglich sein, um den Studenten das Verständnis und den langfristigen Lernerfolg zu erleichtern. Wie das Ergebnis zeigt (Abbildung 4.9), wurde damit die Gesamtdarstellung für die Studenten besonders ansprechend.

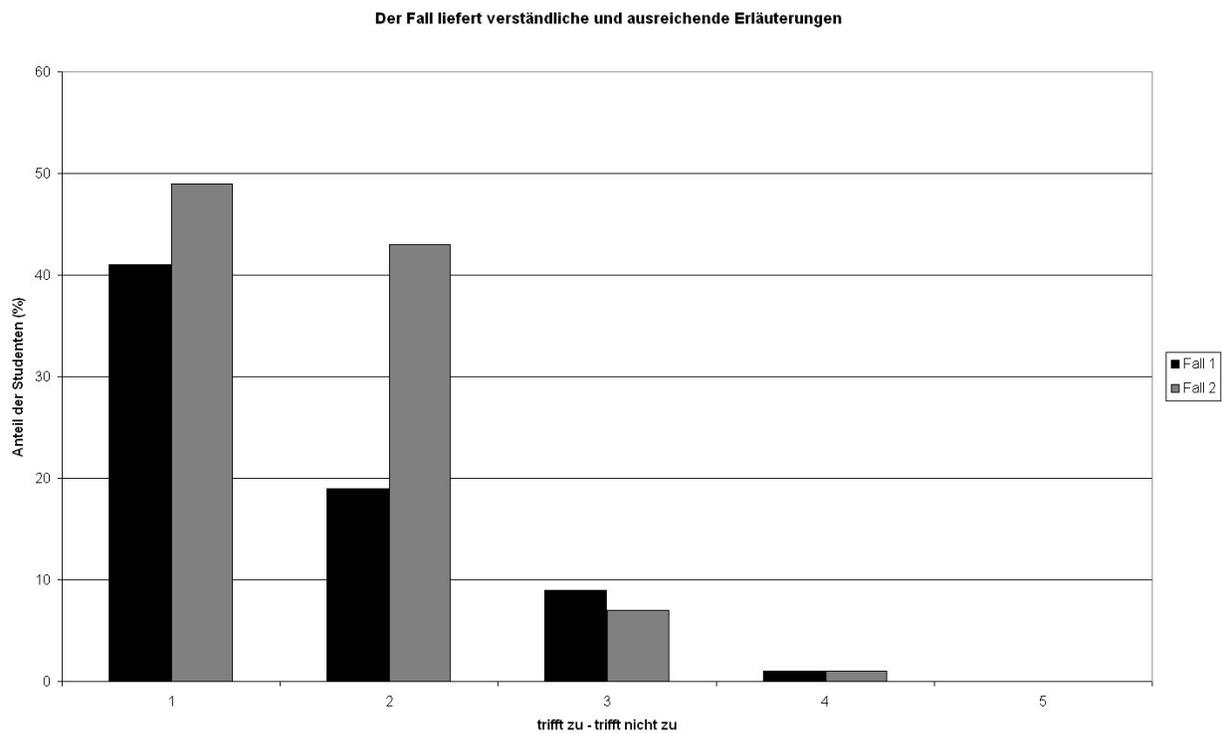


Abbildung 4.10: Erläuterungen

Mit den Erläuterungen waren die Studenten sehr zufrieden. Abbildung 4.10 zeigt, dass 90 Prozent der Studenten die Erläuterungen verständlich und ausreichend fanden. Das Ziel, dass die Lernfälle nicht nur zur Wissenüberprüfung, sondern als Lehrmedium dienen soll, wurde somit erfüllt. Vergleicht man dieses Ergebnis zusätzlich mit dem Ergebnis, welches die Frage zum Stoffumfang der Lernfälle betrifft, so wird trotz einiger kritischer Beurteilungen ersichtlich, dass die gewählte Ausführlichkeit der Lernfälle ein gutes Verständnis erzielt.

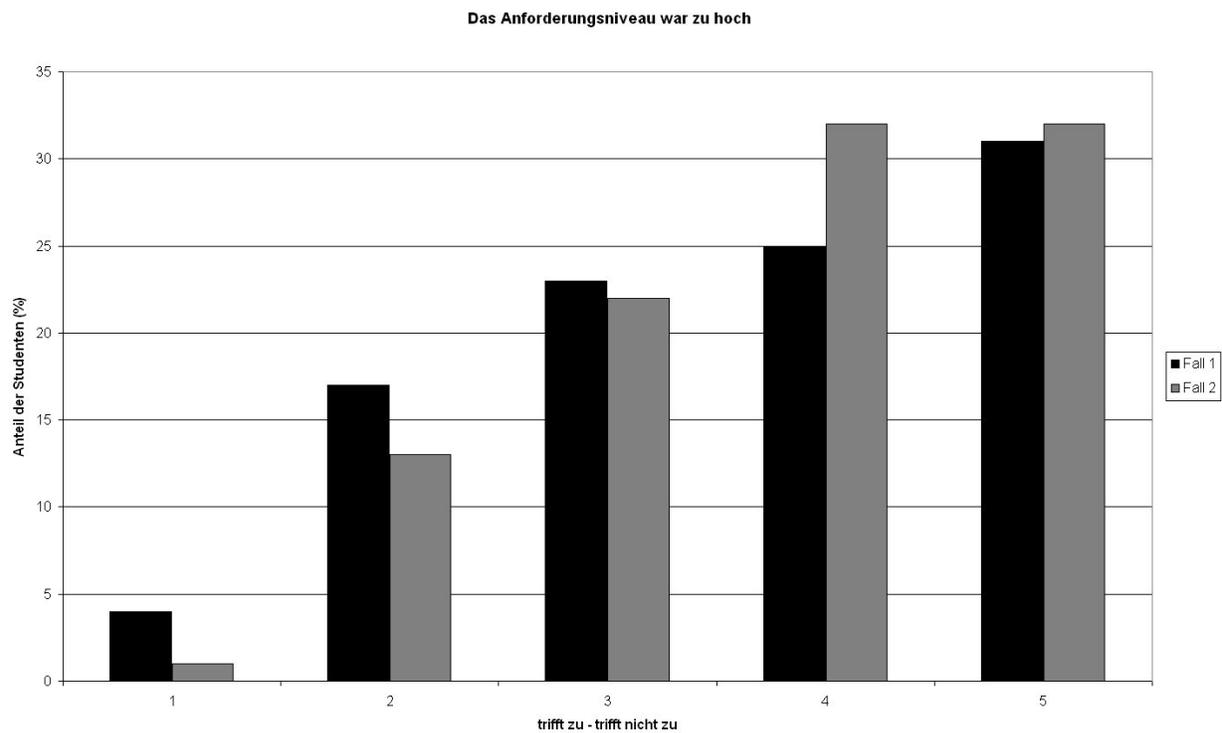


Abbildung 4.11: Anforderungsniveau

Bei der Frage nach dem Anforderungsniveau ergab sich wiederum ein breites Meinungsbild. Nur etwas mehr als die Hälfte der Studenten fand das Anforderungsniveau angemessen (siehe Abbildung 4.11). Eventuell wurden diese Lernfälle eher zur Wissensvermittlung als zur Wissenüberprüfung, z.B. kurz vor der Prüfung, bearbeitet.

### 4.4.3 Bedienbarkeit des Programms

In diesem Teil der Evaluierung sollte die Technik und die Bedienbarkeit des CASUS-Programms beurteilt werden. Das Programm soll funktionieren und auch ohne Vorwissen leicht zu bedienen sein.

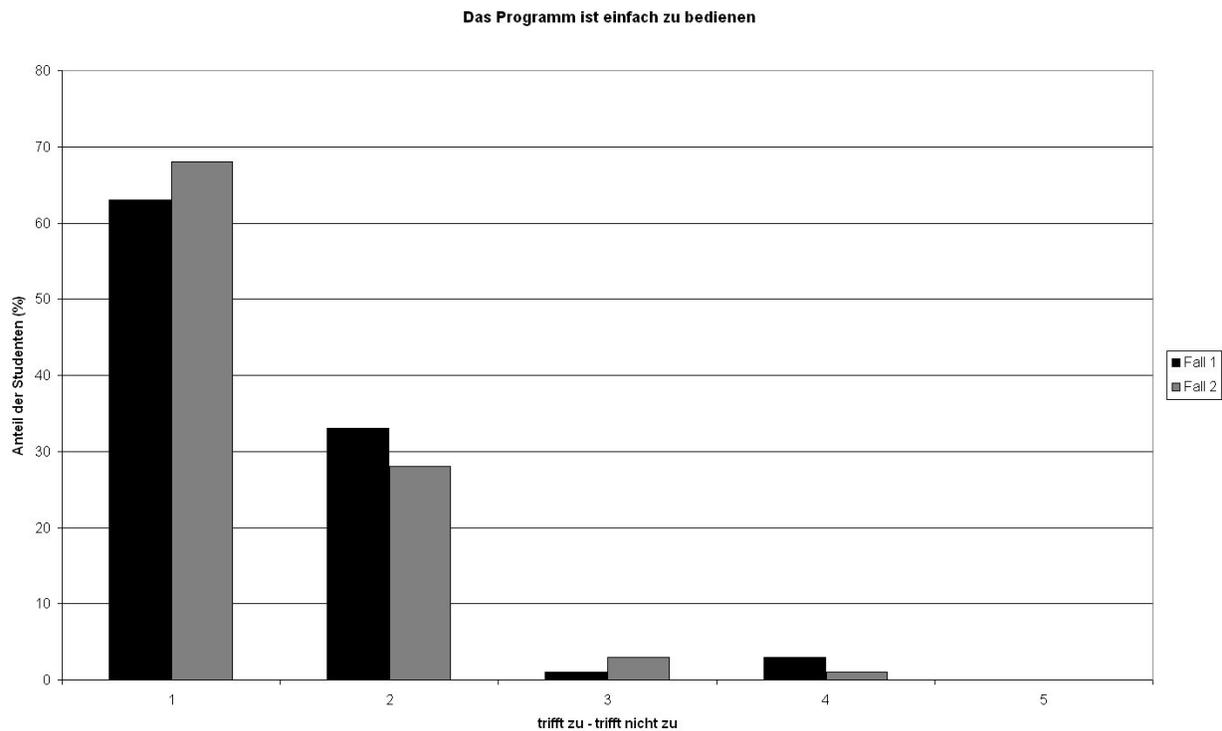


Abbildung 4.12: Bedienbarkeit

In Abbildung 4.12 wird ersichtlich, dass zwei Drittel der Studenten sehr zufrieden mit der Bedienbarkeit von CASUS waren. Nur ein bzw. zwei Studenten hatten Probleme mit der Ausführung des Programms. CASUS scheint somit für alle Studenten geeignet zu sein.

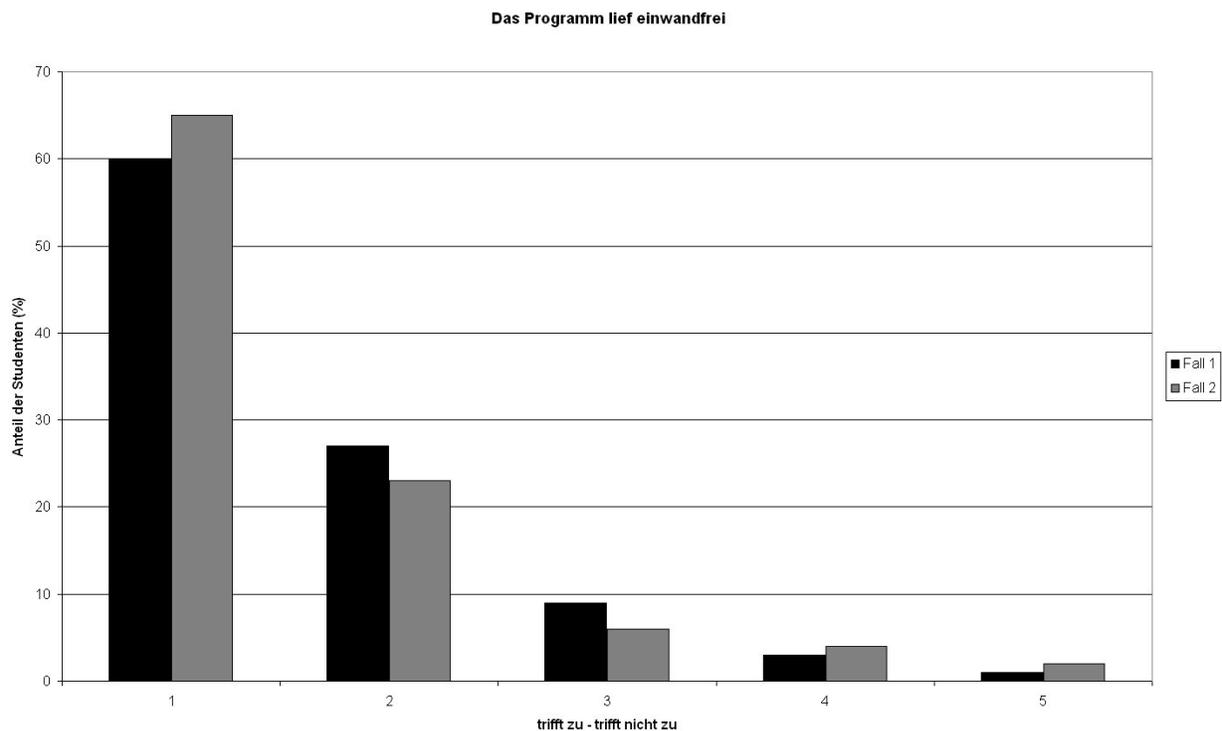


Abbildung 4.13: Durchläufigkeit

In den allermeisten Fällen ist das Programm auf den jeweiligen PCs problemlos gelaufen. Nur ein paar wenige Studenten (siehe Abbildung 4.13) gaben hier Probleme im technischen Ablauf an. Da das Programm online durchgeführt wird, kann dies auch an einer schlechten oder langsamen Internetverbindung liegen. Eine schlechte oder langsame Internetverbindung kann dazu führen, dass die Erstellung einer Seite sehr lange dauert, oder das Programm komplett abbricht.

## 4.5 Fazit

Insgesamt waren die Studenten, die die Fälle bearbeitet haben, sehr von dieser Art des E-Learnings angetan. Laut ihren Beurteilungen erfüllen die Fälle ihren Sinn als Lehrmedium neben den Vorlesungen und Büchern. Sie können zur Selbstkontrolle und zur Vorbereitung auf die Prüfungen genutzt werden. Sie motivieren die Studenten zum Lernen, weil sie Freude bei der Bearbeitung haben, die Gesamtdarstellung anschaulich gestaltet ist, und das Programm einfach zu bedienen ist. Die positive Rezeption durch die Studenten lässt sich auch daran erkennen, dass die Möglichkeit zur Rückkopplung ("Protestfunktion", Kommentarfeld) häufig genutzt wurde.

## 5 Diskussion

Der Vorgang der Künstliche Besamung setzt sich aus mehreren Einzelschritten zusammen, wobei letztendlich für den Erfolg dieser Technik eine ausreichende Effizienz in allen Bereichen gegeben sein muss. Zudem müssen organisatorische Voraussetzungen auf der Züchterseite gegeben sein, die letztendlich die Einsatzmöglichkeiten der KB wesentlich beeinflussen. Beim Hund ist die Ausführbarkeit der KB in technischer Hinsicht in den meisten Bereichen zumindest soweit gegeben, dass sie zum praktischen Einsatz in der Zucht angeboten werden kann.

Erstes Glied in der langen Kette von Einzelschritten ist die Spermagewinnung beim Rüden. Zwar wurden in den vergangenen 50 Jahren mehrere Verfahren dafür entwickelt, beim Hund hat sich aber nur die manuelle Spermagewinnung durchgesetzt. Wichtigste Voraussetzungen dabei sind die Libido des Rüden und die Möglichkeit zu einer adäquaten Stimulierung mittels läufiger Hündin [121, 86]. Die Vorraussetzungen können in der Praxis nicht immer optimal gelöst werden, weshalb dies nach wie vor einen der Problembereiche der KB beim Hund darstellt. Für den Einsatz der KB bei der Erhaltung bedrohter Rassen oder von Wildtieren stellt die epididymale Spermagewinnung eine Alternative dar [180].

Problematisch ist hier die Kurzlebigkeit des Spermias, die oft zu schlechten Trächtigkeitsraten führt [180]. Für die Spermauntersuchung stehen relativ einfach durchzuführende, konventionelle Verfahren sehr aufwendigen, neueren Techniken gegenüber.

Die Spermabeurteilung mittels Lichtmikroskopie ist eine ausgereifte Untersuchungstechnik, mit dem sich der Untersucher schnell ein Bild über die Qualität des Spermias machen kann. Sie ist für den Praxisalltag sehr gut geeignet. Für eine wissenschaftliche Bearbeitung stellt die Subjektivität der Ergebnisse, die sich in der individuellen Beurteilung der einzelnen Untersucher begründen lässt, ein Problem dar. Auch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren ist nur bedingt gegeben; dies ist insbesondere beim Spermaversand von Bedeutung [202, 173].

Das Problem der Subjektivität kann mit anderen, objektiveren Techniken wie der Fluoreszenzmikroskopie und der Computer assistierten Spermaanlyse, gelöst werden, die allerdings wegen ihres technischen Aufwandes in der Praxis nicht eingesetzt werden können. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden bereits einige Färbungen wie z.B. CFDA (Carboxyfluore-

scein Diacetat) und SYBR-14 zur Beurteilung der Membranintegrität oder PI (Propidium Jodid) für die Abgrenzung toter Zellen, entwickelt, die eine objektive Beurteilung einzelner Parameter ermöglichen [190]. Einige Autoren benutzen auch Doppel- [190, 167], und Triplefärbungen [168], die eine gleichzeitige Bestimmung mehrerer Parameter erlauben. Die Durchflußzytometrie bietet im Gegensatz zur Lichtmikroskopie darüber hinaus die Möglichkeit, in sehr kurzer Zeit eine sehr hohe Anzahl mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbter Zellen zu untersuchen [167, 170]. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie können die Samenzellen somit objektiv, wiederhol- und vergleichbar auf Vitalitätsparameter wie der Membranintegrität oder der Akrosomenreaktion untersucht werden [190, 167].

Die Computer-assistierte Spermaanlyse (CASA) beurteilt eine hohe Anzahl an Samenzellen objektiv über die Bestimmung einer Vielzahl an Motilitäts- und Morphologieparametern [190, 188, 235]. Einige CASA-Systeme sind heute auch schon in der Lage, Vitalitätsfärbungen mit Fluoreszenzfarbstoffen auszuwerten [204]. Allerdings befindet sich die CASA noch in der Entwicklung, weswegen bei vielen Parametern Referenzwerte keine allgemeine Gültigkeit haben oder gänzlich fehlen. Auch gibt es bisher keine allgemeingültige Norm für die teilweise noch manuell vorgenommenen Einstellungen der Geräte [235, 187, 188]. Dabei hat die Konzentration der Spermprobe, sowie die Einstellung der Kammertiefe und Bildrate einen starken Einfluss auf das Ergebnis. Dies führt wiederum zu einer Variabilität zwischen den Laboren. Wird ein und dasselbe Gerät mit den gleichen Einstellungen und einer ähnlichen Spermakonzentration bei gleichen Verdünnern verwendet, kann mit Hilfe der Messungen jedoch eine sehr objektive und exakte Aussage über die Qualität sehr vieler Spermien getroffen werden. Der Einsatz von CASA-Systemen ist vorerst nur ein für die Wissenschaft zukunftsträchtiges Verfahren. Ein Einsatz in der Praxis der KB erscheint auf Jahre hinaus nicht vorstellbar.

Funktionelle Tests wie die In-vitro Fertilisation, der Hemizonaassay oder der Oozytenpenetrationsassay können über komplexe Eigenschaften der Spermien Auskunft geben, wie sie auch bei einer Befruchtung in vivo eine Rolle spielen. Aus vielerlei Gründen eignen sich solche Beurteilungsverfahren aber nicht für den Einsatz in der KB.

Die Möglichkeiten zur Samenkonservierung sind eine wesentliche Determinante für die Anwendung der KB in der Praxis. Beim Hund stehen hier verschiedene Verfahren zur Auswahl. Durch Verdünnung mit einem geeigneten Verdünner und nachfolgende Kühlung auf 4-5°C kann die Qualität des Spermas mindestens vier und bis zu zehn Tagen in einem ausreichendem Maße gewährleistet werden [236, 180, 179]. Bei der Kühlung auf Temperaturen über den Gefrierpunkt hat der Verdünner vorrangig die Aufgabe, für die Ernährung der Samenzellen und eine Aufrechterhaltung des pH-Wertes zu sorgen. Dies geschieht mit Hilfe von verschiedenen Zuckern [179], Proteinen [98] und Puffer. In den meisten Fällen wird dazu ein Trispuffer-Eigelb-Glukose Verdünner verwendet. Mit dieser Art der Konservierung kann theoretisch der Samen eines Rüden termingerecht weltweit versandt werden. Von Nachteil ist aber die Tatsache, dass in diesem Fall der Zeitpunkt von Samengewinnung und -verarbeitung sowie der optimale Besamungszeitpunkt bei der Hündin synchronisiert werden muss [204, 188, 129].

Will man unabhängig vom Besamungszeitpunkt Samen zur Verfügung haben, z.B. weil der Rüde nicht jederzeit verfügbar ist, so steht beim Hund die Kryokonservierung des Spermas zur Verfügung. Damit kann qualitativ hochwertiges Sperma unabhängig von Gewinnung, Verarbeitung und Versand jederzeit eingesetzt werden. Bei der Kryokonservierung muss der Verdüner zusätzlich die Funktion erfüllen, die Samenzellen vor den Einflüssen der hohen Temperaturschwankungen, die bei den Einfrier- und Auftauvorgängen auftreten, zu schützen. Dafür wird in der Regel Glycerin verwendet, das sich als das beste Kryoprotektivum erwiesen hat [74, 160, 53].

Die verschiedenen Protokolle unterscheiden sich bezüglich der Abkühl-, Einfrier- und Auftauvarianten nur wenig. In der Regel wird das Sperma nach der Verdünnung möglichst schnell auf 4°C abgekühlt [76]. Nach einer Adaptationszeit von mindestens einer Stunde [160], und dem Zusatz eines Kryoprotektivums erfolgt die Konfektionierung [155], und danach die eigentliche Kryokonservierung mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 10-30°C/Minute [222, 53]. Beim Auftauen wird das Sperma entweder acht Sekunden ins 70°C warmen oder 30 Sekunden ins 37°C warme Wasserbad gegeben [155, 204, 169]. Werden die Proben bei 70°C aufgetaut, verbessert sich die Vorwärtsbeweglichkeit nach dem Auftauen, und auch der Anteil anormaler Spermien sinkt etwas. Dieses Verfahren kann die Spermaqualität somit zwar minimal verbessern, der Erfolg hängt aber sehr stark von der exakten Einhaltung der Auftauzeit ab. Da bereits eine kurze Überschreitung der Auftauzeit die Spermaqualität verschlechtert, ist das Auftauen bei 70 °C in der Praxis wenig gebräuchlich.

Die Entwicklung und Verbesserung von Einfrierverfahren erfolgt bisher fast nur empirisch. Angesichts der Vielzahl von Parametern bei den Vorgängen Abkühlung, Einfrieren und Auftauen, den möglichen Variationen bei der Konzentration der Kryoprotektiva oder der Zusammensetzung der Verdüner, kann damit ein optimales Verfahren kaum erreicht werden. Eigentlich wäre es erforderlich, die physikalischen Vorgänge an den Zellen beim Einfrieren oder Auftauen zu untersuchen, um die Kryokonservierung von Samenzellen zu verbessern.

Um ein positives Trächtigkeitsergebnis zu erreichen, muss die Hündin zum richtigen Zeitpunkt mit der richtigen Technik und einer ausreichend hohen Anzahl Spermien mit gutem Befruchtungsvermögen besamt werden. Der optimale Besamungszeitpunkt liegt an den Tagen zwei bis fünf nach den Ovulationen, beziehungsweise an den Tagen vier bis sieben nach Beginn des Östrus [182, 231], weil die Eizellen ca. 48 Stunden nach Beginn des Östrus ovulieren und weitere zwei Tage zum vorläufigen Abschluss der meiotischen Teilung (Metaphase II) benötigen [225, 227]. Für die Bestimmung des exakten Zeitpunktes stehen eine Reihe von aussagekräftigen Parametern zur Verfügung, deren Kombination eine ausreichende Sicherheit bei der Bestimmung des Ovulationszeitpunktes erlaubt. Wichtige Untersuchungsverfahren sind dabei die klinische Untersuchung (z.B. Duldungsreflex und Vulvaschwellung [150], ein Abstrich von der Vaginalschleimhaut (> 90 Prozent kornifizierter Zellen zum Ovulationszeitpunkt [182, 225]), und die Progesteronmessung (> 7ng/Milliliter zum Zeitpunkt der Ovulationen [150, 197]).

Die Besamungsdosis ist insbesondere von der Lokalisation der Spermadeponierung und der Konservierungsart abhängig. In der Frage um die notwendige Besamungsdosis für frisches oder kryokonserviertes Sperma gibt es noch keine klare Antwort. Während in einigen Fällen sehr niedrige Besamungsdosen ( $35 \times 10^6$ ) gute Ergebnisse lieferten [243], werden auch sehr hohe Besamungsdosen empfohlen ( $310 \times 10^6$  Spermien) [210]. Insgesamt sind sich die Autoren jedoch einig, dass Besamungen mit einer höheren Besamungsdosis und mehreren Besamungen innerhalb einer Fertilitätsperiode zu besseren Ergebnissen führen [128]. Einigen Wissenschaftlern zur Folge sind für durchgehend gute Konzeptionsraten Besamungsdosen von  $150 - 200 \times 10^6$  Spermien notwendig [150, 199]. Bei einer intravaginalen Lokalisation der Spermadeponierung geht eine hohe Anzahl an Spermien verloren, da die Spermien die Cervix, die als Barriere für die Samenzellen dient, überwinden müssen [128]. Es ist deshalb sinnvoll, bei einer Besamung mit kryokonserviertem Sperma eine intrauterine Spermadeponierung vorzunehmen [128, 199, 11]. Allerdings kann im Fall einer intravaginalen Deponierung durch eine erhöhte Anzahl an Besamungen ebenfalls ein gutes Fruchtbarkeitsergebnis erzielt werden [128].

Das Wissen um die Besonderheiten der meiotischen Reifung der Eizellen beim Hund, die erst nach den Ovulationen im Eileiter das befruchtungsfähige Stadium der Metaphase II erreichen, war eine Voraussetzung für die Festlegung des optimalen Besamungszeitpunkts. Durch die Fortschritte bei den Verfahren zur Ovulationskontrolle sind die Erfolgchancen der Künstlichen Besamung stark gestiegen. Die Genauigkeit der Ovulationskontrolle mittels klinischer Untersuchung, Vaginoskopie, Vaginalzytologie und Progesteronmessung erlaubt eine zielgenaue Besamung, so dass auch bei nur einer Besamung innerhalb der Befruchtungsperiode gute Konzeptionschancen gegeben sein können.

Grundsätzlich können also mit der KB beim Hund annähernd gleiche Befruchtungserfolge erzielt werden, wie beim natürlichen Deckakt. Zusätzlich weist dieses Verfahren gegenüber dem natürlichen Deckakt viele Vorteile auf. Kryokonserviertes Sperma ist unbefristet haltbar, und kann leicht transportiert werden. Dadurch lässt sich das genetische Material der einzelnen Rassen auf Dauer erhalten, wodurch die Zuchtlinien verschiedener Deckrüden auch über den Tod des Rüden verfolgt werden können, was das Risiko der Inzucht beträchtlich minimiert.

Obwohl die Fortpflanzungsmedizin auf dem Gebiet der KB beim Hund weit entwickelt ist, ist die künstliche Besamung für die Hundezucht in den deutschen Verbänden noch nicht voll anerkannt. Auch im Punkt 12 des internationalen Zuchtreglements für Rassehunde der Federation Cynologique International [64] wird die Anwendung der KB beim Hund eingeschränkt: "Künstliche Besamung darf nicht bei Tieren angewandt werden, die sich nicht zuvor auf natürlicher Weise fortgepflanzt haben". Da zu erwarten ist, dass durch eine Änderung im Reglement der Zuchtverbände und Vereine bald eine vermehrte Nachfrage von Seiten der Züchter besteht, ist es sinnvoll, die Ausbildung auf dem Gebiet der KB beim Hund zu intensivieren.

Betrachtet man die Abfolge einer Künstlichen Besamung, so müssen hier sehr viele spezialisierte Techniken angewendet werden. Dies erfordert spezielle Kenntnisse in Andrologie und Gynäkologie, die über die üblichen Anforderungen in einer Kleintierpraxis hinausgehen. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Lernfälle mit Hilfe des CASUS-Programms erstellt, die sich mit der Thematik "KB beim Hund" beschäftigen. Das CASUS-Programm ist eine Form des E-Learnings, die sowohl in der Ausbildung als auch in der Fort- und Weiterbildung eingesetzt werden kann.

CASUS Lernfälle sind als interaktives Lehrmedium eine gute Ergänzung zur Wissensvermittlung durch Vorlesungen und Bücher. Der Benutzer ist bei der Bearbeitung flexibel in Zeit und Ort, was jedoch ein gewisses Maß an Selbstdisziplin erfordert. Durch die Rolle als Tierarzt in einem klinischen Fall rückt der Benutzer von der passiven in die aktive Rolle, da er mit der Beantwortung der Fragen selbst nach einer Problemlösung suchen muss.

In dieser Arbeit wurde darauf geachtet, dass die beiden Fälle möglichst praxisnah den genauen Vorgang und die Technik für Spermagewinnung, -untersuchung und -konservierung wie auch die künstliche Besamung selbst darstellen. Die Benutzer (praktischen Tierärzte, Studenten) können sich dabei neues Wissen aneignen und gleichzeitig bereits vorhandenes Wissen überprüfen. Für einen Lernfall wurde jeweils maximal eine halbe Stunde Bearbeitungszeit veranschlagt, um ein schnelles Erfolgserlebnis vermitteln zu können.

Um die Rezeption der beiden Lernfälle beurteilen zu können, durften Studenten der Tiermedizinischen Fakultät der LMU-München die Fälle anhand eines Fragebogens bewerten. Insgesamt wurden die Lernfälle positiv bewertet. Die Studenten hatten Freude an der Bearbeitung dieser Lernfälle und meinten mehrheitlich, einiges dabei gelernt zu haben. Das Programm war offenbar einfach zu bedienen, denn Bedienungsprobleme spielten kaum eine Rolle bei der Beurteilung.

Das Anforderungsniveau und der Stoffumfang der Lernfälle wurden unterschiedlich beurteilt. Das Anforderungsniveau war für die Studierenden in der klinischen Ausbildung (Rotation) richtig gewählt, während Studenten aus dem 2. - 7. Semester mit weniger Vorwissen das Anforderungsniveau vermehrt als etwas zu hoch empfanden. Dennoch hat auch diesen Studierenden die Bearbeitung des Falles Spaß gemacht, was dafür spricht, dass man den Lernfall nicht nur zur Wissensüberprüfung sondern auch zur reinen Wissensvermittlung nutzen kann.

In einigen Fällen wurde der Stoffumfang als etwas zu umfangreich eingestuft. In dieser Arbeit wurde versucht, die wesentlichen Informationen aus dem Komplex Künstliche Besamung in zwei Fällen zu verarbeiten. Theoretisch wäre natürlich eine Aufteilung des Stoffes in mehrere Fälle möglich. Mit einer Zerstückelung in sehr kleine Wissensblöcke geht aber eventuell der Praxisbezug verloren, der ja einen wesentlichen Anreiz zur Bearbeitung darstellen soll. Mit einer steigenden Aufsplitterung wächst zudem auch die Wahrscheinlichkeit, dass nicht alle Fälle eines Themenkomplexes bearbeitet werden. Letztendlich müssten die Fälle dann

vielleicht sogar in einer bestimmten Reihenfolge bearbeitet werden, um eine sinnvolle Wissensvermittlung zu erzielen. Die mehrheitliche Beurteilung zeigt, dass diese Einschätzung richtig, und die Teilung des Themas der künstlichen Besamung in zwei größere Themenkomplexe sinnvoll war.

Die Freitextkommentare zeigten, dass sich die Studenten einen starken Praxisbezug in der klinischen Ausbildung wünschen. Auch deswegen wurde in den Lernfällen versucht, genau diesen herzustellen.

Beinahe alle Studenten haben die Lernfälle alleine bearbeitet. Als positiv ist dabei zu sehen, dass der Student den Fall in seinem eigenen Tempo bearbeiten kann, und sich selbst die Antwort zu jeder Frage überlegt. Auf der anderen Seite könnten die Lernfälle aber auch in der Gruppe bearbeitet werden und zu gemeinsamen Diskussionen anregen. Außerdem könnten eventuell auftauchende Fragen ohne großes Nachschlagen gleich in der Runde geklärt werden. Beim vermehrten Einsatz von Online-Lernfällen von CASUS in der Zukunft wird sich zeigen, welche Arbeitsform bevorzugt wird.

Obwohl die Lernfälle von den Studenten durchweg positiv beurteilt wurden, kann nicht gesagt werden, ob sich der Lernerfolg durch die Bearbeitung wirklich gesteigert hat. Eine solche Beurteilung würde den Vergleich einer großen Anzahl Studenten mit etwa dem gleichen Vorwissen und dem gleichen Lernverhalten, oder den Vergleich mehrerer ganzer Semester unter Beobachtung des Lernverhaltens erfordern. Das Angebot von Lernfällen als ergänzendes Lehrmedium neben Vorlesungen und Büchern ist jedoch auf jeden Fall sinnvoll.

CASUS-Fälle sollen kein Ersatz für Vorlesungen oder die Wissensvermittlung durch Bücher sein. Die Bearbeitung von Lernfällen ist wahrscheinlich eher eine Form der Wissensüberprüfung. Gleichzeitig kann theoretisches Wissen virtuell an einem klinischen Fall "ausprobiert" werden, was zweifellos eine sinnvolle Ergänzung des klassischen klinischen Unterrichts sein kann. Die Evaluierung ergab, dass Studenten diese Art des Lernens gerne annehmen, und sich eine Weiterentwicklung dieser Lernform wünschen.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird der aktuelle Stand der wissenschaftlichen Literatur über die gesamte Thematik der künstlichen Besamung beim Hund dargestellt. Zusätzlich wurden zwei Lernfälle über die künstliche Besamung beim Hund erstellt und von Studenten der Tiermedizin evaluiert.

Ein Überblick über die Forschung zeigt, dass viele der zur künstlichen Besamung notwendigen Einzelmaßnahmen technisch weitgehend etabliert sind. Spermagewinnung und -untersuchung können auch unter Praxisbedingungen erfolgreich eingesetzt werden. Bei der Konservierung von Sperma ist der Einsatz von frisch verdünntem (Kühlung) oder tiefgefrorenem Samen (Kryokonservierung) möglich. In beiden Fällen muss mit einer individuell unterschiedlichen Reduktion des Befruchtungsvermögens gerechnet werden. Die Technik für die Besamung sollte abhängig von der Qualität und Art der Spermaproben gewählt werden. Die intrauterine Besamung erfordert Erfahrung und ein spezielles Instrumentarium, führt jedoch auch bei Verwendung von kryokonservierten Samenproben zu guten Trächtigkeitsraten. Die intravaginale Besamung ist technisch einfach durchzuführen, kann aber nur bei Einsatz qualitativ sehr guter frischer oder gekühlter Samenproben zu befriedigenden Fruchtbarkeitsergebnissen führen.

Die bisher bekannten Techniken zur Bestimmung des Besamungszeitpunktes bei der Hündin erlauben eine gute Präzision bei der Vorhersage des Zeitpunktes der Ovulationen. Die sogenannte Fertilitätsperiode befindet sich an den Tagen zwei bis fünf nach den Ovulationen. An diesen Tagen führt eine Doppelbesamung mit einer Besamungsdosis von  $150 - 200 \times 10^6$  Spermien in der Regel zu guten Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Lernfälle mit Hilfe des Casus-Programms erstellt. Sie sollen den Studenten die Technik der künstlichen Besamung vermitteln. Casus ist eine Form des E-Learnings, das der reinen Wissensvermittlung dient. Der erste Lernfall behandelt die Spermagewinnung, -untersuchung und -konservierung. Der zweite Lernfall beschäftigt sich mit der künstlichen Besamung selbst. Lernziele waren hier unter anderem die Bestimmung des optimalen Besamungszeitpunktes und die Technik der Sameneinführung.

Die Beurteilung der Lernfälle erfolgte mit einer Evaluierung durch Studenten der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilian Universität in München. Es zeigte sich, dass die Stu-

denen Freude an der Bearbeitung hatten, und nahezu alle Benutzer gerne weitere Lernfälle bearbeiten würden. Positiv wurde auch die leichte Bedienbarkeit des Programms bewertet.

Die durchgehend positive Beurteilung der Lernfälle zeigt, dass Casus-Lernfälle konventionelle Lehrmedien wie Bücher, Skripten und Vorlesungen ergänzen können. Allerdings kann anhand dieser Arbeit noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Lernerfolg durch eine Bearbeitung der Fälle gesteigert werden kann.

## 7 Summary

In this thesis the scientific literature about artificial insemination in dogs is reviewed. Additionally two clinical cases about artificial insemination in dogs, generated with the CASUS-programme, are presented together with the evaluation by students of veterinary medicine.

Most of the techniques necessary to perform artificial insemination have been established. Semen collection, semen analysis and preservation can be used successfully in practice. For sperm preservation the use of fresh diluted (cooled) or frozen sperm (cryopreservation) is possible. With both methods an individually variable reduction of fertilizing ability must be considered. The insemination technique should be chosen according to the quality and the preservation method of the sperm sample. Intrauterine insemination requires experience and a special equipment but provides good results even with the use of cryopreserved semen samples. Intravaginal semen deposition is technically simple; good fertilisation rates will be achieved only with the use of good quality fresh or cooled semen samples.

The techniques available for the determination of insemination timing in bitches, allows an accurate prediction of the ovulations. Insemination should be performed between the second and the fifth day after ovulation. A double insemination with an insemination dose of 150-200 million spermatozoa during this period of time will result in good fertilisation and whelping rates.

Within the framework of this thesis two cases were generated with the aid of the CASUS programme. CASUS is an E-Learning tool aimed at knowledge transfer. The first case is about semen collection, semen analysis and preservation. The second case is dealing with the procedure of artificial insemination in the bitch. In this case the students should be familiarized with the determination of the optimal insemination timing and the technique of sperm deposition.

The evaluation of the learning cases was accomplished by students of the veterinary department of the Ludwig-Maximilian-Universität in Munich. Students generally considered the cases a valuable tool. Nearly all users would like to continue working with this kind of e-learning tool. Handling of the programme was also judged very positively.

The positive evaluation demonstrates, that CASUS learning cases can supplement conven-

tional teaching methods such as books or lectures. However the impact of such learning tools on the learning success remains to be determined.

# Literaturverzeichnis

- [1] Aitken R.J., Best F.M., Richardson D.W., Djahanbakch O., Less M.M. (1982): The correlates of fertilizing capacity in normal fertile man. *J.Androl.* 38 68-76. 6 in 36
- [2] Aitken R.J., Sutton M., Warner P., Richardson D.W. (1985): Relationship between the movements characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona free hamster oocytes. *J.Reprod.Fertil.* 73 441-449. 5in 36
- [3] Aitken R.J., Clarkson J.S. (1988): Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J.Androl.* 9 367-376. 2in 36
- [4] Aitken R.J., Buckingham D., West K., Wu F.C., Zikopoulos K., Richardson D.W. (1992): On the contribution of leucocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculated of oligozoospermic patien. *J.Reprod.Fertil.* 94 451-462. 3in 36
- [5] Aitken R.J., Fisher H. (1994): Reactive oxygen generation by human spermatozoa. *Bioassays* 16 259-268. 4in 36
- [6] Almo D., Batista M., Gonzalez F., Rodriguez N., Cruz G., Cabrera F., Gracia A. (2005): Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 °C as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology.*63 72-82 14
- [7] Althouse G.C., Ko J.C.H., Hopkins S.M., Evans L.E. (1991): Effect of latex and vinyl examination gloves on canine spermatozoa motility. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 199 227-229 5aus3
- [8] Amann R.P. (1989): Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J.Androl.* 10 89-98. in 36
- [9] Amann R.P., Hammerstedt R.H. (1993): In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J.Androl.* 14 397-406 in 2
- [10] Andersen K. (1972): Fertility of frozen dog semen. *Acta.Vet.Scand.* 13 128-130. 2aus16
- [11] Andersen K. (1975): Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene* 10 1-4. 2 aus 18

- 
- [12] Ashworth P.J.C., Harrison R.A.P., Miller N.G.A., Plummer J.M., Watson P.F. (1995): Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectin binding in boar and ram sperm populations. *Mol.Reprod.Dev.* 40 164-176. aus44
- [13] Ayodeji O., Baker H.W. (1984): Is there a specific abnormality of sperm morphology in men with varicoceles? *Fertil.Steril.* 45 839-842. 10aus36
- [14] Auger J., Leonce S., Jouannet P., Ronot C. (1993): Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *J.Histochem.Cytochem.* 41 1247-1251. in 36
- [15] BadinandF., Fontbonne A., Maurel M.C., Siliart B. (1993): Fertilization time in the bitch in reation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears: *J.Reprod.Fertil.* 47 63-67 aus 20
- [16] Barros C., Fujimoto M., Yanagamachi E. (1973): Failure of zona penetration of hamster spermatozoa after prolonged preincubation in a blood serum fraction. *J.Reprod.Fertil.* 35 89-95. in 36
- [17] Barlow P., Delvigne A., Van Dromme J. (1991): Redictive value of classical and automated sperm analysis for in vitro fertilization. *Human.Reprod.* 6 119-124. in 36
- [18] Bielsa M.A., Andolz P., Gertis J.M. (1994): Which semen parameters have a predictive value for pregnancy in infertile couples. *Human Reprod.* 9 1887-1890. in 36
- [19] Boatman D.E., Bavister B.D. (1984): Stimulation of rhesus monkey sperm capacitation by cyclic nucleotide mediators. *J.Reprod.Fertil.* 71 357-366. in 36
- [20] Boyer S.P., Cavis R.O., Katz D.F. (1989): Automated semen analysis. *Curr.Probl.Obstet.Gyn.* 12 167-200. 22in 36
- [21] Breitwieser A. (2002): Akzeptanz von E-Learning. Studie von Cognos und Innotec.
- [22] Brewis i.A., Morton I.E., Moore H.D., England G.C. (2001): Solubilized zona pellucida proteins and progesterone induce calcium influc and the acrosome reaction in capacitated dog spermatozoa. *Mo.Reprod.Dev.* 4 280-282. aus1
- [23] Burkman L.J. (1991): Discrimination between non hyperactivated and classical hyperactivity motility patterns in human spermatozoa using computerized image analysis. *Fertil. Steril.* 55 363-371. 23in 36
- [24] Burkam L.J. (1984): Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: A comparison of fertile and oligozoospermic sperm population. *Arch.Androl.* 13 153. 24in 36
- [25] Budworth P., Ammann R.P., Hammerstedt R.H. (1987): A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. *J.Cairy Sci.* 70 1927-1936. in 36

- 
- [26] Budworth P., Ammann R.P., Chapman P.L. (1988): Relationships between computerized measurements of motion of frozen thawed bull spermatozoa and fertility. *J.Androl.* 9 41-54. in 36
- [27] De Cassia Soares Cardoso R., Silva A.R., da Silva L.D.M. (2006): Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender *Anim.Reprod.Sci.* 92 384 - 391
- [28] Cardoso R.C.S., Silva A.R., da Silva L.D.M. (2006): Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. *Anim.Rep.Sci.* 92 384-391 11
- [29] Cardoso R.C.S., Silva A.R., Silva L.D.M., Chirinea V.H., Souza F.F., Lopes M.C. (2007): Evaluation of fertilizing Potential of Frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay. *Reprod.Dom.Anim.* 42 11-16.
- [30] Chalah T., Brillard J.P. (1998): Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology.* 50 487-493. 46
- [31] Check J.H., Check M.L. Katsoff D. (2002): Prognosis for sperm fertilizability: analysis of different variables in men. *Arch.Androl.* 48 73-83. Diss Hannover
- [32] Chodorow S. (1996): Educators must take the electronic revolution seriously. *Acad Med* 71(3) 221-6.
- [33] Christiansen I.J. (1984): *Reproduction in the dog and cat.* Bailliere Tindall,London. Aus2
- [34] Clark D. (2002): Psychological myths in e-learning. *Med Teach* 24(6) 598-604.
- [35] Coetzee K., Kruger T.F., Lombard C.J. (1999): Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia* 31 161-168. in 36
- [36] Comhaire F.H., Huysse S., Hinting A., Vermeulen L., Schoonjans F. (1992): Objective semen analysis: Has the target been reached? *Human Reprod.* 7 237-241. in 36
- [37] Concannon P.W., Batista M. (1989): *Current Veterinary Therapy X. Small Animal Practice* p.1247t. 1aus32
- [38] Cremonesi F., Salamon L., Groppetti D., Pecile A. (2005): Results of a single transcervical endoscopic insemination using frozen semen in the bitch. *Vet.Res.Comm.* 29 187-189. 17
- [39] Cross N.L., Meizel S. (1989): Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol.Reprod.* 41 635-641. Diss Hanover in 1

- [40] Dahlbom M., Andersson M., Vierula M., Alanko M. (1997): Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in Progress. *Theriogenology* 48 687-698. in 1, 34 aus42
- [41] DasGupta S., Mills C.L., Fraser L.R. (1994): Ca<sup>2+</sup>-related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a CTC fluorescence assay. *J.Reprod.Fert.* aus45
- [42] David G., Severs S., Jouannet P. (1981): Kinematic of human spermatozoa. *Gamete Resort* 4 83-86. in 36
- [43] Davis R.O., Gravance C.G., Thal D.Ml., Miller M.G. (1993): Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertil.Steril.* 59 412-417 43aus36
- [44] Davis R.O., Katz D.F. (1993): Operational standards for CASA instruments. *J.Androl.* 14 385-394 45aus36
- [45] Davis R.O., Gravance C.G., Thal D.M., Miller M.G. (1994): Automated analysis of toxicant-induced changes in rat sperm head morphometry. *Reprod.Toxicol.* 8 521-529 44aus36
- [46] Didion B.A., Dobrinski J.R., Giles J.R., Graves C.N. (1989): Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Tes.* 22 51-57. aus2
- [47] Donnelly E.T., Lewis S.E., McNally J.A., Thompson W. (1998): In vitro fertilization and pregnancy rates: The influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil. Steril.* 70 305-314. in 36
- [48] Dott H.M., Foster G.C. (1979): The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *J. REprod. Fertil.* 55 161-166. in 36
- [49] Drudy L., Lewis S.E., Barry-Kinsella C., Harrison R.F., Thompson W. (1994): The influence of peritoneal fluid from patients with minimal stage of reated endometriosis on sperm motility parameters using computer-assisted semen analysis. *Human Reprod.* 9 2418-2423. in 36
- [50] Edwards R.G. (1962): Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals. *Nature* 196 446-450. 74aus1
- [51] Edwards R.G. (1965): Maturation in vitro of mouse, sheep, coq, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208 349-351. 75aus1
- [52] Edwards R.G. (1966): Mammalian eggs in the laboratory. *Sci.Am.* 215 72-81. 76aus1
- [53] Eilts B.E. (2005): Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *The-riogenology* 64 685-691. 9

- [54] Eilts B.E. (2005): Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology* 64 692-697. 10
- [55] England G.C.W. (1992): The Cryopreservation of dog semen. PhD Thesis, University of London, UK. 54in 36
- [56] England G.C.W. (1993): Cryopreservation of dog semen: a review. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 47 243-255. 41 in 42
- [57] England G.C.W. Verstegen J.P., Hewitt D.A. (2001): Pregnancy following in vitro fertilization of canine oocytes. *Vet.Rec.* 148 20-22. 86 in 1
- [58] Eshre (1998): Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Human Reprod.* 13 142-145. 55in 36
- [59] Evans E.I. (1933): The transport of spermatozoa in the dog. *Amer.J.Physiol.* 105 287-293. 1aus40
- [60] Farrel P.B., Foote R.H., McArdle M.M., Trouern-Trend V.L., Tardif A.L. (1996): Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J. Androl* 17 293-300. in 36
- [61] Farstad W. (1984): Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J.Small.Anim.Pract.* 25 561-565. 3aus19
- [62] Farstad W., Andersen Berg K. (1989): Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 39 289-292. 3 aus 32, 19 aus 19 3 aus 32
- [63] Farstad W. (1995): Semen cryopreservation in dogs and foces. *Anim.Reprod.Sci.* 42 251-260. 55 aus 19
- [64] FCI: <http://www.fci.be/reglements.aspx>
- [65] Feldman E.E., Nelson R.W. (1996): Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen. Feldman E.E., Nelson R.W., *Canine and feline endocrinology and reproduction*. Philadelphia: W.B. Saunders Co 734-739. 2 aus 40
- [66] Fenneuc D., Serres C., Jouanett P. (1985): Sliding spermatozoa a dyskinesia responsible for human infertility. *Fertil.Steril.* 44 508-511. 60in 36
- [67] Fontbonne A., Badinand F. (1993): Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine insemination of semen. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 47 325-327. 13 aus 16, 4 aus 32
- [68] Foote R.H. (1974): Die künstliche Besamung bei Hunden, Katzen und Pelztieren. M.+H. Scharper Hannover.

- [69] Foster R., Smith M.: Brucellosis. PetEducation.com
- [70] Foulkes J.A. (1977): The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J.Reprod.Fer.* 49 277-284 Diss-Verdünner
- [71] Freshman J.L. (2001): Clinical management of the subfertile stud dog. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.* 31 259-269. in 2
- [72] Freshman J.L. (2002): Semen collection and evaluation. *Clin.Technol.SmallAnim.Pract.* 17 104-7. aus3
- [73] Garner D.L., Johnson L.A., Yue S.T., Roth B., Haugland R.R. (1995): DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and Propidium Jodid. *J.Androl.* 15 620-629. aus46
- [74] Gil J., Lundeheim N., Söderquist L., Rodirguez-Martinez H. (2003): Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenoloy.* 59 1241-1255. 8aus15
- [75] Gill H.P., Kaufman C.F., Foote R.H., Kirk R.W. (1970): Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *Am.J.Vet.Res.* 31 1807-1813. 24aus20
- [76] Ginsburg K.A., Armant D.R. (1990): the influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and movement measurements obtained by manual and videomicrographic analysis. *Fertil.Steril.* 53 882-887. in 36
- [77] Goodwin M., Goding K.M., Regnier F. (1979): Sex pheromone in the dog. *Science.* 9;203(4380):559-61.
- [78] Govette G., Linde-Forsberg C., Ström B. (1996): A successful concept for freezing of dog semen. *13th Int.Comg.Anim.Reprod.(ICAR)* 2 5-8. aus44, 15 aus 16
- [79] Graham E.F., Rajamannan A.H.J., Schmehl M.K.L., Makilaurila M., Bower R.E. (1971): Preliminary reports on procedure and rationale for freezing boar semen. *A. I. Digest* 19, 12
- [80] Graham J.K., Kunze E., Hammerstedt R.H. (1990): Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol.Reprod.* 43 55-64. aus44
- [81] Gracance C.G., Vishwanath R., Pitt C., Garner D.L., Casey P. (1998): Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J.Androl.* 19 704-709. 40aus42
- [82] Green C.E., Watson P.F., (2001): Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122 889-898. in 2

- [83] Gröpper B. (2004): Einflüsse unterschiedlicher Verfahren zur Sperma-Tiefgefrierkonservierung auf Motilität und Membranintegrität von Hundespermien - Einsatz moderner spermatologischer Analyseverfahren. Diss.Hannover
- [84] Grunert J.H., de Geyter C., Bordt J., Schneider H.P., Nieschlag E. (1989): Does computerized image analysis of sperm movement enhance the predictive value of semen analysis for in-vitro fertilization results? *Int.J.Androl.ertil.Steril.* 12 329-338. 74in 36,
- [85] Guerin P., Ferrer M., Fontbonne A., Benigni L., Jacquet M. (1999): In vitro capacitation of dog spermatozoa as assessed by chlortetracycline staining. *Theriogenology* 52 617-628. in1
- [86] Günzel-Apel A.R. (1994): Fertilitätskontrolle und Samenübertragung beim Hund. Jena1994
- [87] Hammerstedt R.H., Graham J.K., Nolan J.P. (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive? *J.Androl.* 11 73-88 aus2, 22 aus 30
- [88] Hammerstedt R.H., Graham J.K. (1992): Cryopreservation of poultry semen: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 23 1-13 25 aus 25
- [89] Hancock J.L. (1951): A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature* 167 323-324. aus2
- [90] Harrop A.E. (1960): Natural service and artificial insemination. Harrop A.E., *Reproduction in the dog.* 93.99. 3aus40
- [91] Hay M.A., Goodrowe K.L. (1993): Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J.Reprod.Fertil.* 47 297-305 aus20
- [92] Hay M.A. King W.A., Gartley C.J., Leibo S.P., Goodrowe K.L. (1997): Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* 48 1329-1342. 71aus1
- [93] Hay M.A. King W.A., Gartley C.J., Leibo S.P., Goodrowe K.L. (1997): Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 57 99-108. 90aus1
- [94] Hermansson U., Forsberg C.L. (2006): Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology* 65 584-593. 8
- [95] Hess M. (2006): Documented and anecdotal effects of certain pharmaceutical agents used to enhance semen quality in the dog *Theriogenology.* 66 613-617.
- [96] Hewitt D.A., England G.C.W. (1997): The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim.Reprod.Science* 50 123-139. 37, 6aus1

- [97] Hewitt D.A., England G.C.W. (1998): An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Anim.Reprod.Science* 51 321-332. 45,aus1
- [98] Holt W.V., Head M.F., North R.D. (1988): Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cyomicroscope. *J.Exp.Zool* 246 305-314 Diss-Verdünner
- [99] Holt W.V., Head M.F., North R.D. (1992): Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol.Reprod.* 46 1086-1094
- [100] Holt W.V., Vatson P., Curry M., Holt C. (1994): Reproducibility of computer-aided semen analysis: Comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil.Steril.* 62 1277-1282. in 36
- [101] Hori T., Ichikawa M., Kawakami E., Tsutsui T. (2003): Artificial insemination of frozen epididymal sperm in beagle dogs. *J.Vet.Med.Sci.* 66 37-41. 5
- [102] Hori T., Hagiuda K., Kawakami E., Tsutsui T. (2004): Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. *Theriogenology* 63 1573-1583. 21
- [103] Hori T., Kaseki H, Fukuhara Y., Oba H., Mizutani T., Kamakami E., Tsutsui T. (2006): Effects of addition of sodium lauryl sulphate on Frozen-thawed canine spermatozoa. *J.Vet.Med.Sci.* 68 1125-1128
- [104] Hori T., Odaka S., Oba H., Mizutani T., Kawakami E., Tsutsui T. (2006): Effects of liquid nitrogen vapour sensitization conditions on the quality of frozen thawed dog spermatozoa. *J.Vet.Med.Sci.* 68 1055-1061
- [105] Iguer-Ouada M., Verstegen J.P. (2000): Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog sperm analysis. *Theriogenology* 55 1143-1158. 28
- [106] Iguer-Ouada M., Verstegen J.P. (2001): Evaluation of the "Hamilthon Thorn Computer based automated system" for dog semen analysis. *Theriogenology* 55 733-749. in 36, in1
- [107] Jequir A.M., Ukombe E.B. (1983): Erros inherent in the performance of routine semen analysis. *Br.J.Urol.* 55 434-436. 84in 36
- [108] Jeulin C., Lewin L.M., Chevrier C., Schoevaert-Brossault D. (1996): Changes in flagellar movement of rat spermatozoa along the length of the epididymis: Manual and computer-aided image analysis. *CellMotilCytoskeleton* 35 147-161. in 36

- [109] Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G., Zeneveld L.J:D: (1984): Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J.Reprod.Fertil.* 70 219-228. Diss Hanover
- [110] Johnston S.D. (1991): Performing an complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet.Clin.North.Am.* 21 545-551. aus2,3aus1
- [111] Karp L.E., Williamson R.A., Moore D.E., Shy K.K., Plymate S.R., Smith W.D. (1981): Sperm penetration assay: Useful test in evaluation of male fertility. *Obstet.Gynaecol.* 57 620-623. aus37
- [112] Kawakami E., Vandevort C.A., Mahi-Brown D.A., Overstree J.W. (1993): Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. *Biol.Reprod.* 48 841-845. aus1
- [113] Kawakami E., Arai T., Nakamura U. (1999): Effects of medium containing heparine and theophylline on capacitation and metabolic enzyme activities of ejaculated spermatozoa from dogs with asthenozoospermia. *Anim.Reprod.Sci.* 54 251-259. aus2
- [114] Kawakami E., Morita Y., Hori T., Tsutsui T. (2002): Lectin-binding characteristics and capacitation of canine epididymal spermatozoa. *J.Vet.Met.Sci.* 64 543-549. aus1
- [115] Kim H.J., Oh H.J., Jang G., Kim M. K. (2007): Birth of puppies after intrauterine and intratubal insemination with frozen-thawed canine semen. *Journal of Vet Scien.* 8 75-80
- [116] Kraemer M., Fillion C., Martin-Pont H., Auger J. (1998): Factors influencing human sperm kinematic measurements by the celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Hum.Reprod.* 13 611-619. in 36
- [117] Kustritz R., Margaret V. (2005): Reproductive behavior of small animals. *Theriogenology* 64 734-746.
- [118] Kumi-Diaka J. (1993): Subjecting the canine spermatozoa to the hypoosmotic swelling test. *Theriogenology* 39 1279-1289. in Diss Hannover aus2
- [119] Kumi-Diaka J., Badtram G. (1994): Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology* 41 1355-1366 Diss Hanover aus2
- [120] Kuroda H. and Hiroe K. (1972): Studies on the metabolism of the dog. I. season variation on the semen quality and an the aerobic metabolism of spermatozoa. *JPN J Anim Reprod* 17 89-98.
- [121] Kutzler M.A. (2005): Semen collection in the dog. *Theriogenology* 64 747-754. 3

- [122] Larsen R.E. (1980): Infertility in the male dog. Morrow, D.A. (Ed), Current Therapy in Theriogenology 2. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 646-654 in 2
- [123] Lees G.E., Castleberry M.W. (1997): The use of frozen semen for artificial insemination of german shepherd dogs. J.Am.Anim.Hosp.Assoc. 13 382-386. 20aus20
- [124] Lengwinat T., Blottner S. (1994): In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. Anim.Reprod.Sci. 35 291-301. 6aus6
- [125] Lippold G. (2003): Erfolgreiches Lernen - Lernen lernen.
- [126] Linde-Forsberg C. (1991): Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. Vet..Clin.No.Am: Sm.Anim.Prac. 21 467-485. 19 aus 16
- [127] Linde-Forsberg C. (1995): Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. Semin.Vet.Med.Surg.(Small Animal) 10 48-58. 10 aus 32
- [128] Linde-Forsberg C., Ström H.B., Govette G. (1999): Comparison of fertility data from vaginal vs. intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. Theriogenology 52 11-23. in 44, 11 aus 19
- [129] Linde-Forsberg C. (2001): Regulations and Recommendations for International Shipment of Chilled and Frozen Canine Semen. International Veterinary Information Service. Ithaca, New York, Usa. Document No. A 1209.0501. (15 sid), 1in 25
- [130] Linford E., Glover F.A., Bishop C., Stewart D.L. (1976): The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. J.Reprod.Fert. 47 283-291. 54in 36
- [131] Lyon, H.C., Jr. et al. (1992): PlanAlyzer, an interactive computer-assisted program to teach clinical problem solving in diagnosing anemia and coronary artery disease. Acad Med 67(12) 821-8.
- [132] Mack S.O., Wolf D.P., Tash J.S. (1988): Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. Biolog.Reprod. 38 270-280. 97aus36
- [133] Mahadevan M.M., Miller M.M., Moutos D.M. (1997): Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics in vitro. Human Reprod.1 12 119-123. 102in 36
- [134] Mahi C.A., Yanagimachi R. (1976): Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. J.Exp.Zool. 196 189-196. 81aus1, 11 aus32
- [135] Marks S.L., Dupuis J., Mickelsen W.D., Memon M.A., Platz Jr. C.C. (1994): Conception by urse of post-mortem epididymal semen extraction in a dog. J.Am.Vet.Med Assoc. 204 1639-1640. 2aus7

- [136] Marz R. B.A. (1996): Sind Computerprogramme bessere Lernmedien als Bücher? [www.univie.ac.at/Med-Chemie/www-publications/CMS/CMS-Artikel.html](http://www.univie.ac.at/Med-Chemie/www-publications/CMS/CMS-Artikel.html).
- [137] Mastromonaco G.F., Bay M.A., Goodrowe K.L. (2002): The effects of oocyte storage and cumulus cell presence on canine pellucida penetration by domestic dog spermatozoa. *Theriogenology* 57 1123-1134. 72aus1
- [138] Mayenco-Aguirre A.M., Cortes A.B.P. (1998): Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology* 50 195-204. 41
- [139] MacLeod J. (1965): The semen examination. *Clin.Obstet.Gynecol.* 8 115-127. 98in 36
- [140] Mialot J.P., Comun C., Cassou B. (1985): Insemination artificielle chez la chienne: Mise en place de semence fraîche avec le pistolet souple "Osiris". *Pratique medicale et chirurgicale de l'animal de compagnie* 20 213-220. 23 aus 16
- [141] Mickelsen W.D., Memon M.A., Anderson P.B., Freeman D.A. (1993): The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology* 39 553-560. 7aus42, 4 aus 40
- [142] Moberg T.F. und M.E. (1999): Whitcomb, Educational technology to facilitate medical students' learning: background paper 2 of the medical school objectives project. *AcadMed* 74(10) 1146-50.
- [143] Morris S.T., Coutts J.R., Robertson L. (1996): A detailed study of the effects of video frame rates of 25, 30, and 60 Hz on human sperm movement characteristics. *Human Reprod.* 11 304-310. in 36
- [144] Mortimer D., Shu M.A., Tan R. (1986): Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Human Reprod.* 1 299-303. 115in 36
- [145] Mortimer D., Goel N., Shu M.A. (1988): Evaluation of the CellSoft automated semen analysis system in a routine laboratory setting. *Fertil.Steril.* 50 960-968. 114in 36, in31
- [146] Mortimer S.T., Mortimer D. (1990): Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J.Androl.* 11 195-203. 111in 36,
- [147] Morton D.B., Bruce S.G. (1989): Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen fresh semen quality in dogs. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 39 311-316. aus2
- [148] Neuwinger J., Knuth U.A., Nieschlag E. (1990): Evaluation of the Hamilton-Thorn 2030 motility analyser for routine semen analysis in an infertility clinic. *Int.J.Androl.* 13 100-109. aus36
- [149] Neuwinger J., Behre H.M., Nieschlag E. (1990): Computerized semen analysis with sperm tail detection *Human.Reprod.* 5 719.723. aus36

- 
- [150] Nizanski W. (2005): Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of prostatic fluid: Use of an infusion pipette and the Osiris catheter. *Theriogenology* 66 470-483. 19
- [151] Nishiyama T., Kinugasa T., Kimura T., Watanabe G., Taya K., Tsumagari S., Takeishi M. (1999): *J.Am.Anim.Hosp.Assoc.* 35 348-352. 12aus32
- [152] Nöthling J.O., Volkmann D.H. (1993): Effect of addition of autologous prostatic fluid on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 47 329-333. 9aus21, 27 aus 19
- [153] Nöthling J.O., Gerstenberg C., Volkmann D.H. (1995): Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *J.S.Afr.Vet.Ass.* 66 49-55. 28 aus 19
- [154] Nöthling J.O., Shuttleworth R., de Haas K., Thomplson P.N. (2004): Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP *Theriogenology* 64 975-991. 23
- [155] Nöthling J.O., Shuttleworth R. (2005): The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology* 63 1469-1480 12
- [156] Nöthling J.O., Gerber D., Conebrander B., Dijkstra M., Bakker T., Cramer K., (2007): The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl witz Equex STM paste on Andromed. *Theriogenology* 67 264-275
- [157] Nunez-Martinez I., Moran J.M., Pena F.J. (2007): Sperm indewes obtaines using computer-assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *International Journal of Andrology* ISSN 0105-6263
- [158] Oettle EE. (1986): Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Vet.Med.* 81 263-266. aus2
- [159] Oettle EE. (1993): Sperm morphology and fertility in the dog. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47 257-260. in 1, 6aus42
- [160] Okano R., Murase T., Asano M., Tsubota T. (2004): Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *J.Vet.Met.Sci.* 66 1359-1364. 15
- [161] Olar T.T., Bowen R.A., Pickett B.W. (1989): Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology* 31 451-61. 59in19

- [162] Ombelet W., Menkveld R., Kruger T.F., Steeno O. (1995): Sperm morphology assessment: Historical review in relation to fertility. *Human Reprod.Update* 1 543-557. 120in 36
- [163] Ombelet W., Pollet H., Bosmans E., Vereecken A. (1997): Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Human Reprod.* 12 1015-1020. 121in 36
- [164] Otoi T., Muramaki M., Fujii M., Tanaka M., Ooka A., Suzuki T., et al. (2000): Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro. *Vet.Rec.* 146 52-53. 85aus1
- [165] Ozuah P. (2002): Undergraduate Medical Education: Thoughts on Future Challenges. *Med Educ* 2 8-10.
- [166] Paivio A. (1986): *Mental representations: A dual coding approach.* Oxford: Oxford University Press.
- [167] Pena A.I., Quintela L.A., Herradon P.G. (1998): Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology* 50 1211-1220. 43
- [168] Pena A.I., Johannisson A., Linde-Forsberg C. (1999): Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 52 965-990. 44, aus1
- [169] Pena A., Linde-Forsberg C. (2000): Effects of equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54 859-875. 4aus25
- [170] Pena A.I., Johannisson A., Linde-Forsberg C. (2001): Validation of slow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 57 149-179. aus1
- [171] Pena A.I., Lopez-Lugilde L., Barrio M., Becera J.J., Quintela L.A., Herradon P.G. (2003): Studies on the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of frozen-thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitation conditions. *Reprod.Dom.Anim.* 38 27-35. 12 aus 25
- [172] Pena A.I., Lopez-Lugilde L., Barrio M., Becera J.J., Quintela L.A., Herradon P.G. (2003): Effects of equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology* 59 1725-1739. 17 aus 25
- [173] Pena Martinez A.I. (2004): Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Science* 82-83 209-224. 2
- [174] Petrunkina A.M., Simon K., Günzel-Apel A.-R., Töpfer-Petersen E. (2003): Regulation of capacitation of canine spermatozoa during co-culture with heterologous oviductal epithelial cells. *Reprod.Domest.Anim.* 38 455-463. aus1

- [175] Petrunkina A.M., Gröppler B., Günzel-Apel A.-R., Töpfer-Petersen E. (2004): Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane shanges and predicting freezability in dog semen. Soc.f.Rep.a.Fert. ISSN:1470-1626 1741-7899 13
- [176] Philipps P.H., Lardy H.A. (1940): A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen: J.Dairy.Sci. 23 399-404 Diss-Verdünner
- [177] Pineda M.H. (1977): A simple method for collection of semen from dogs. CaninePract. 4 14-18. aus3
- [178] Pinto C.R.F., Eilts B.E., Paccamonti D.L. (1998): The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. Theriogenology 50 301-305. 40
- [179] Ponglowhapan S., Essen-Gustavsson B., Forsberg C.L. (2004): Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. Theriogenology 62 1498-1517. 6, 4aus7
- [180] Ponglowhapan S., Chatdarong K., Sirivaidyapong S., Lohachit C. (2006): Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. Theriogenology 66 1633-1636. 7
- [181] Pogorzelski S.A. (2005): Untersuchungen zur Kryokonservierung von Schafspemien unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der Verdünner, Verdünnungsprotokolle und Einfriermethoden auf die Spermienqualitätsparameter. Diss
- [182] Pretzer S.D., Lillich R.K., Althouse G.C. (2005): Single, transcervical insemination using frozen-thawed semen in the Greyhound: A case series studie. Theriogenology 65 1029-1036. 20
- [183] Reproductive Revolutions (2006): Infertility in Stud Dog. Newsletter-Equine and Canine.
- [184] Rigeau R., Rivera M., Palomo M.J., Fernandez-Novell J.M., Mogas T., Ballester J., et al. (2002): Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. Reproduction 123 579-591. 26aus6
- [185] Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A. (2002): Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. Theriogenology. 57 1669-1681. aus1, aus42 70
- [186] Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A. (2002): Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. Theriogenology. 60 1553-1568 31
- [187] Rijsselaere T., Van Soom A., Hoflack G., Maes D., de Kruif A. (2003): Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser Theriogenology. 62 1292-1306. 42

- [188] Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., Verberckmoes S., de Kruif A. (2004): Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*. 61 1589-1602 26
- [189] Rijsselaere T., Van Soom A., Hoflack G., Maes D., de Kruif A. (2004): Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology* 62 1292-1306. 42
- [190] Rijsselaere R., Van Soom A., Tanghe S., Coryn M., Maes D., de Druif A. (2005): New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology* 64 706-719. 1
- [191] Robertson L., Wolf D.P., Tash J.S. (1988): Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: Identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol.Reprod.* 39 797-805. 130in 36
- [192] Rodrigues B.A., Dos Santos L.C., Rodrigues J.L. (2004): Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol.Reprod.Dev* 67 215-223. 41aus1
- [193] Rodriguez-Gil J.E., Monserrat A., Rigau T. (1994): Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*. 42 815-829. aus2
- [194] Rodriguez-Martinez H., Ekwall H., Linde-Forsberg C. (1993): Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 47 279-285. 39 in 42
- [195] Rota A., Ström B., Linde-Forsberg C. (1995): Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology* 44 885-900 in 2, aus1
- [196] Rota A., Ström B., Linde-Forsberg C., Rodriguez-Martinez H. (1997): Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology* 47 1093-1101. in *Diss Hannover*, 30, 10aus25, 30
- [197] Rota A., Linde-Forsberg C., Vanozzi J., Romagnoli S., Rodriguez-Martinez H. (1998): Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezingZ-Thawing rates. *Reprod.Domest.Anim.* 33 355-61. 20 aus 26
- [198] Rota A., Pena A.I., Linde-Forsberg C., Rodriguez-Martinez H. (1999): In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim.Reprod.Sci.* 57 199-215. aus1
- [199] Rota A., Iguer-Ouada M., Verstegen J., Linde-Forsberg C. (1999): Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a TRIS extender with or without Equex STM Paste. *Theriogenology* 52 1045-1058. 12aus19

- [200] Rota A., Milani C., Cabianca G., Martini M. (2006): Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 65 1848-1858.
- [201] Rota A., Milani C., Romagnoli S. (2007): Effect of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen motility and sperm acrosome status. *Theriogenology* 67 520-525.
- [202] Saacke R.G., White J.M. (1972): Semen quality tests and their relationship to fertility. Proceedings of the fourth technical conference on artificial insemination and reproduction, national association of animal breeders, Columbia, Missouri, pp.2-7 aus2
- [203] Schaffer H.E., Almquist J.O. (1948): Vital staining of bovine spermatozoa with an eosin-aniline blue staining mixture. *J.Cairy Sci.* 31 677 aus2
- [204] Schäfer-Somi S., Kluger S., Knapp E., Klein D., Aurich C. (2006): Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology.* 66 173-182 25
- [205] Schmitt F. (2008): Erstellung und Evaluierung zweier Lernprogramme im Fachgebiet der Veterinärimmunologie mit dem Autorensystem Casus. DissMünchen
- [206] Schoysmen R., Van-der-Zwalmen P. (1992): Towards the definition of the fertilizing spermatozoa. *Acta.Eur.Fertil.*23 131-140. 20aus41
- [207] Seagar S.W.J. (1986): Artificial insemination in dogs. Burke T.J., *Small Animal reproduction and Fertility.* 207-217. 5aus40
- [208] Shin S., Carmichael L.E. (1999): Canine Brucellosis caused by *Brucella canis*. Diagnostic Laboratory and Baker Institute for Anim. Health, Coll. Of Vet. Med., Cornell Univ., Ithaca, N.Y., USA
- [209] Silva A.R., Cardoso R.C.S., Silva L.D.M. (1998): Efeito do processo de descongelacao sobre a viabilidade do semen canino in vitro. *Cien.Anim.* 8 75-80. 16 aus 30
- [210] Silva L.D.M, Onclin K., Lejeune B., Verstegen J.P. (1996): Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet.Rec.* 138 154-157. 5aus19, 15 aus 32, 39 aus 16
- [211] Sirivaidyapong S., Bevers M.M., Conebrander B. (1999): Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane localized progesterone receptor. *J.Androl.* 20 537-544. 13 aus 24
- [212] Sirivaidyapong S., Cheng F.P., Marks A., Voorhout W.F., Bevers M.M., Colenbrander B. (2000): Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenolog.* 53 789-802. aus1
- [213] Sirivaidyapong S. (2002): Motility and viability of canine epididymal sperm collected by different methods. Proceedings of 3rd EVSSAR congress Liege. p.170 aus20

- [214] <http://www.studvet.de/downloads/1.derzyklushd.pdf>
- [215] Slott V.L., Jeffay S.C., Cyer C.J., Barbee R.R., Perreault S.D. (1997): Sperm motion predicts fertility in male hamsters treated with alpha-chlorohydrin. *J. Androl.* 18 708-716. in 36
- [216] Smith S.C., England G.C.W. (2001): Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured by computer-aided sperm analysis. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 57 151.159. in 1
- [217] Ström B., Rota A., Linde-Forsberg C. (1997): In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 33 77-82. aus44
- [218] Suarez S.S. (1996): Hyperactivated motility in sperm. *J. Androl* 17 331-335. 145in 36
- [219] Szasz F., Sirivaidyapong S., Cheng F.P., Voorhout W.F., Marks A., Colenbrander B. (2000): Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol.Reprod.Dev.* 55 289-298. aus1
- [220] Takahashi K., Uchida A., Kitao M. (1990): Hypoosmotic swelling test of sperm. *Arch. Androl.* 25 225-242. Diss Hannover
- [221] Talbot P., Chacon R.S. (1981): A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J.Exp.Zool.* 215 201-208. aus2
- [222] Thirumala S., Ferrer M.S., Al-Jarrah A., Eilts B.E., Paccamonti C.L., Devireddy R.V. (2003): Cryopreservation of canine spermatozoa: theoretical prediction of optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents. *Cryobiology* 47 109-124 4
- [223] Thomas P.G.A., Surman V., Myers-Wallen V.N., Concannon P.W., Ball B.A. (1992): Addition of sodium dodecyl sulphate to the TRIS-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. *Proc.12th Int.Congr.Anim.Reprod.(ICAR)* 4 1823-25. 16aus25
- [224] Thomassen R., Sanson G., Drogenaes A., Fougner J.A., Andersen Berg K., Farstad W. (2006): Artificial insemination with frozen soemen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology* 66 1645-1650. 18
- [225] Thomassen R., Farstad W. (2009): Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology* 71 190-199.
- [226] Traas A.M., Root Kustritz M.V. (2004): Effect of administrating oxytocin of prostaglandein F2alpha on characteristics of the canine ejaculate. *Can. Vet. J.* 45 999-1002. 27

- [227] Tsumagari S., Ichikawa Y., Toriumi H., Ishihama K., Morita M., Kanamaki M., Takeishi M. (2003): Optimal timing for canine artificial insemination with frozen semen and parentage testing by microsatellite markers in superfecundation. *J.Vet.Med.Sci.* 65 1003-1005. 32,
- [228] Tsutsui T., Tezuka T., Shimizu T., Murao I., Kawakami E., Ogasa A. (1988): Artificial insemination with fresh semen in beagle bitches. *Jpn.J.Vet.Sci.* 50 193-198 13 aus 33, 6 aus 19, 44 aus 16
- [229] Tsutsui T. (1989): Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J.Reprod.Fert., Suppl.*39, 269-275. 18aus32
- [230] Tsutsui T., Shimizu T., Ohara N., Shiba Y., Hironaka T., Orima H., et al. (1989): Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn. *Jpn.J.Vet.Sci.* 51 257-263. 60aus19
- [231] Tsutsui T., Kawakami E., Murao I., Ogasa A. (1989): Transport of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch: observations through uterine fistula. *JpnJ.Vet.Sci.* 51 560-565. 7aus40
- [232] Tsutsui T., Hase M., Tanaka A., Fujimura N., Hori T., Kawakami E. (2000): Intra-uterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of ovus ES paste-supplemented egg yolk tris-fructose citrate. *J.Vet.Med.Sci.* 62 603-606 8 aus 33, 18 aus 19, 33
- [233] Tsutsui T., Tanaka A., Takagi Y., Nakagawa K., Fujimoto Y., Murai M., Anzai M., Hori T. (2000): Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *J.Vet.Med.Sci.* 62 1241-1245 12 aus 33, 16 aus 32
- [234] Tsutsui T., Hori T., Yamada A., Kirihara N., Kawakami E., Hori T. (2003): Intratubal insemination with fresh semen in dogs. *J.Vet.Med.Sci.* 65 659-661 33, 15 aus 5
- [235] Verstegen J., Iguer-Ouada M., Onclin K. (2002): Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57 149-79. 36, in1
- [236] Verstegen J., Onclin K., Iguer-Ouada M. (2007): Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: In vitro and in vivo studies. *Theriogenology* 64 720-733 5
- [237] Ward J.P. et al. (2001) Communication and information technology in medical education. *Lancet* 357(9258) 792-6.
- [238] Watson P.F. (1975): Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram Spermatozoa. *Vet. Rec.* 97 12-15. in 1
- [239] Watson P.F., Martin I.C. (1975): Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Aust.J.Biol.Sci.* 28 153-159 Diss-Verdünner

- [240] Watson P.F., Martin J.C. (1976): Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluents containing egg yolk during cooling and freezing on the fertility of ram semen. *Therigenology* 6 559-564
- [241] Watson P.F. (1995): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Rep.Tert.Dev.* 7 781-891. aus2
- [242] Wentling T. W.C., Gallaher J., La Fleur J., Wang C., Kanfer A. (2000): E-Learning: A Review of Literature. <http://learning.ncsa.uiuc.edu/papers/elearnlit.pdf>.
- [243] Wilson M.S. (1993): Non surgical intra-uterine insemination in bitches using frozen semen. *J.Reprod.Fertil.Suppl.* 47 307-311. 47 aus 16
- [244] Wilson B.G. (1997): Reflections on constructivism and instructional design. *Instructional development paradigms*, ed. C. R. Dills and A. J. Romiszowski (Eds.) Educational Technology Publications: Englewood Cliffs, NJ. 63-80.
- [245] WHO, WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction, 3rd ed.- Cambridge: Cambridge university Press. 163in 36
- [246] Yamada S., Shimazu Y., Kawaji H., Nakazawa M., Nito K., Toyoda Y. (1992): Maturation, fertilization and development of dog oocytes in vitro. *Biol.Reprod.* 46 853-858. aus37, 83 aus1
- [247] Yamada S., Shimazu Y., Kawao Y., Nakazawa M., Nito K., Toyoda Y. (1993): In vitro maturation and fertilisation of pre-ovulatory canine oocytes. *J.Reprod.Fert.Suppl.* 47 227-229. aus37
- [248] Yanagimachi R. (1970): In vitro capacitation of golden hamster spermatozoa by homologous and heterologous blood sera. *Biol.Reprod.* 3 147-153. 157in 36
- [249] Yanagimachi R. (1994): Mammalian fertilization. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 189-31. aus2
- [250] Yanagimachi R. (1994): Fertility of mammalian spermatozoa: Its development and relativity. *Zygote* 2 371-372. 160in 36
- [251] Zaini A., Jennings M.G., Baker H.W.G. (1985): Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men? *Int.J.Androl.* 8 427-435. 164in 36
- [252] Zami A., Jennings M.G., Baker H.W.G. (1985): Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men? *Int.J.Androl.* 8 427-435. aus2

- 
- [253] Zhu J., Barratt C.L., Lippes J., Pacey A-A., Cooke I.D. (1994): The sequential effects of human cervical mucus, oviductal fluid, and follicular fluid on sperm function. *Fertil.Steril.* 61 1129-1135. 165in 36

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Braun für die Überlassung des Themas und der stets freundlichen, jederzeit gewährten Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Christiane Otzdorff, Dr. Beate Walter und Dr. Nina Brugger für die große Hilfe für alles was die Lernfälle und der Beschaffung der benötigten Literatur betrifft, für die vielen Ratschläge und die große Geduld, die sie bewiesen, bedanken.

Bei Frau Dr. Inga Hege möchte ich mich für die Unterstützung bei der Erstellung und Bearbeitung der Lernprogramme bedanken. Sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite, wenn es um die Umsetzung neuer Ideen oder Änderungen ging.

Meiner Mitstreiterin Nina danke ich für die zahlreichen wertvollen Ratschläge und Bemühungen, mit denen sie ihre eigenen Erfahrungen an mich weitergab.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei Herrn David Franke für die große Unterstützung und den Beistand während der Doktorarbeit bedanken.

Meiner ganzen Familie danke ich für ihren unerschütterlichen Glauben an mich, ihre Aufmunterungen und ihren Beistand nicht nur im Verlauf dieser Arbeit.

Nicht zuletzt sei all meinen Freunden für ihre Anteilnahme und Geduld gedankt, die sie mir gegenüber erwiesen haben.