

Einsatz von Akupunktur zur Verbesserung der
Spermienqualität genomisch geprüfter Jungbulln – eine
randomisiert kontrollierte Studie

von Theresa Antonia Stübinger

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

Einsatz von Akupunktur zur Verbesserung der
Spermienqualität genomisch geprüfter Jungbullen – eine
randomisiert kontrollierte Studie

von Theresa Antonia Stübinger
aus Würzburg

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Mitbetreuung durch: Dr. Christiane Otzdorff

Angefertigt in: Interdisziplinäre Schmerzambulanz, Klinik für
Anaesthesiologie, Klinikum der LMU München

Mentor: Prof. Dr. Dominik Irnich

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Michael H. Erhard

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	4
1.	Spermatologie des Bullen.....	4
1.1.	Physiologischer Ablauf der Spermatogenese	4
1.2.	Morphologischer Aufbau des Spermiums.....	5
1.3.	Spermagewinnung und -untersuchung	6
1.4.	Einflussfaktoren auf die Spermienqualität	10
1.4.1.	Effekte am Tier.....	10
1.4.1.1.	Innere Faktoren	10
1.4.1.2.	Äußere Faktoren	11
1.4.2.	Effekte in der Prozessierung	16
1.5.	Bedeutung der Spermienqualität	17
2.	Grundlagen der Veterinärakupunktur	19
2.1.	Definition	19
2.2.	Historischer Überblick	20
2.3.	Philosophischer Hintergrund und traditionelle Konzepte der TCVM	24
3.	Veterinärakupunktur bei andrologischen Funktionsstörungen	27
3.1.	Traditionelle Grundlagen therapeutischer Akupunkturansätze.....	27
3.2.	Einsatz von Akupunktur in der Andrologie	28
III.	MATERIAL UND METHODEN	37
1.	Studiendesign	37
2.	Probandenkollektiv	38
2.1.	Einschlusskriterien	39
2.2.	Ausschlusskriterien	40
3.	Randomisierung	40
4.	Intervention.....	40
4.1.	Akupunkturbehandlung	40
4.2.	Kontrollverfahren	44
5.	Zielparameter	44

5.1.	Hauptzielparameter	44
5.2.	Nebenzielparameter	44
6.	Erhebung der Zielparameter	48
6.1.	Spermagewinnung	48
6.2.	Beurteilung der Spermienqualität	48
6.3.	Beurteilung der Libido	50
7.	Statistische Auswertung: Fallzahlschätzung und Datenanalyse	51
8.	Ethik	53
IV.	ERGEBNISSE	54
1.	Randomisiert kontrollierte Studie	54
1.1.	Charakteristika des Probandenkollektivs	54
1.2.	Datenerhebung	55
1.3.	Hauptzielparameter	56
1.4.	Nebenzielparameter	58
1.4.1.	Spermienqualität	58
1.4.1.1.	Zeitreihenanalyse	58
1.4.1.2.	Inter- und Intragruppen-Vergleich vor und nach Intervention	65
1.4.2.	Libido	67
1.4.2.1.	Reaktionszeit	67
1.4.2.2.	Annahme der Sprungpartner	68
2.	Kohortenstudie	68
2.1.	Charakteristika des Probandenkollektivs und Datenerhebung	68
2.2.	Spermienqualität	69
2.2.1.	Zeitreihenanalyse	69
2.2.2.	Vergleich vor und nach der Intervention	75
2.3.	Libido	76
2.3.1.	Reaktionszeit	76
2.3.2.	Annahme der Sprungpartner	77
V.	DISKUSSION	78
1.	Diskussion der Ergebnisse	78
1.1.	Hauptzielparameter	78
1.2.	Nebenzielparameter	79

1.2.1.	Spermienqualität.....	79
1.2.1.1.	Vergleich zu Tierstudien	80
1.2.1.2.	Vergleich zu humanexperimentellen Studien	80
1.2.1.3.	Einfluss des Bullenalters auf die Spermienqualität.....	82
1.2.2.	Libido	83
1.3.	Effekte der Akupunktur bei Bullen mit guter Spermienqualität	83
2.	Diskussion der Methodik	84
2.1.	Probandenkollektiv.....	84
2.2.	Intervention	86
2.3.	Zielparameter	89
3.	Schlussfolgerung und Ausblick.....	90
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	92
VII.	SUMMARY.....	95
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	98
IX.	ANHANG	118
1.	Dokumentationsbogen zur Erfassung der Libido	118
2.	Setup-Parameter des „ <i>IVOS II Clinical</i> “	119
3.	Entwicklung der Spermienparameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum: Behandlungsgruppe	120
4.	Entwicklung der Spermienparameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum: Kontrollgruppe.....	122
5.	Entwicklung der Spermienparameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum: gute Kohorte	124
X.	DANKSAGUNG	126

Abkürzungsverzeichnis

3E	Akupunkturpunkt/-meridian 3-Erwärmer
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADR	Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter
BG	Behandlungsgruppe
Bl	Akupunkturpunkt/-meridian Blase
CASA	computer assistierte Spermienanalyse (englisch: <i>computer assisted/aided sperm analysis-system</i>)
d	Tag (englisch: <i>day</i>)
Di	Akupunkturpunkt/-meridian Dickdarm
DNA	Desoxyribonukleinsäure (englisch: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
1n DNA	geteilter Chromosomensatz (ein Chromatid)
2n DNA	haploider Chromosomensatz (zwei Chromatiden)
4n DNA	diploider Chromosomensatz (vier Chromatiden)
Dü	Akupunkturpunkt/-meridian Dünndarm
Gb	Akupunkturpunkt/-meridian Gallenblase
GB	Gigabyte
GCP	Gute klinische Praxis (englisch: <i>good clinical practice</i>)
GEE	generalisierte Schätzgleichungen (englisch: <i>Generalized Estimating Equations</i>)
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
He	Akupunkturpunkt/-meridian Herz
ICR	Interquartilsabstand (englisch: <i>interquartile range</i>)
IVAS	Internationale Akupunkturgesellschaft (englisch: <i>International Veterinary Acupuncture Society</i>)
Kg	Akupunkturpunkt/-meridian Konzeptionsgefäß
KG	Kontrollgruppe
KI	Konfidenzintervall

Le	Akupunkturpunkt/-meridian Leber
LED	lichtemittierende Diode (englisch: <i>light-emitting diode</i>)
Lg	Akupunkturpunkt/-meridian Lenkergefäß
Lu	Akupunkturpunkt/-meridian Lunge
m	Monat
Ma	Akupunkturpunkt/-meridian Magen
MG	Modellgruppe
mod.	modifiziert
mOsmol	Milliosmol
MP	Akupunkturpunkt/-meridian Milz
Ni	Akupunkturpunkt/-meridian Niere
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pc	Akupunkturpunkt/-meridian Pericard
PGF2 α	Prostaglandin F2 α
SPSS	englisch: <i>Statistical Package for Social Sciences</i>
STRICTA	Standards für die Präsentation kontrollierter Akupunkturstudien (englisch: <i>STandards for Reporting Interventions in Controlled Trials of Acupuncture</i>)
TB	Terabyte
TCM	Traditionell Chinesische Medizin
TCVM	Traditionell Chinesische Veterinärmedizin
TSH	Thyreoidea stimulierendes Hormon
w	Woche

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Originalaufzeichnung einer Akupunkturtafel des Pferdes aus dem 17. Jh. mit Punkt-Nomenklatur in chinesischer Schrift (HEERDE, 1999)	22
Abbildung 2: Hauptleitbahnen beim Hund (mod. nach EUL-MATERN, 2014).....	25
Abbildung 3: Studiendesign der randomisiert kontrollierten Studie.....	38
Abbildung 4 a und b: Akupunkturpunkte der Studie (mod. nach AMBRONN, 2001 (a) und SCHOEN, 2008 (b)).....	43
Abbildung 5: Spermienmotilitätsanalyse: Schematische Darstellung der tatsächlich zurückgelegten, der gemittelten und der kürzesten Strecke eines Spermiums zwischen Start- und Endpunkt (mod. nach AMANN & WABERSKI, 2014).....	45
Abbildung 6: CASA-System (HAMILTON-THORNE, 2016)	49
Abbildung 7: Beispiel eines Monitorbilds nach Probenanalyse (HAMILTON-THORNE, 2016)	50
Abbildung 8: CONSORT-Flussdiagramm (SCHULZ et al., 2010).....	55
Abbildung 9: Einzeltierentwicklung bezüglich mangelhafter bzw. physiologischer Spermienmotilität und -morphologie	58
Abbildung 10 a–n: Entwicklung der Spermienparameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum.....	64
Abbildung 11 a–n: Entwicklung der Spermienparameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum – gute Kohorte.....	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mindestanforderungen für unverdünntes Sperma bei Besamungs- und Deckbullen (mod. nach Krause, 2012).....	8
Tabelle 2: Das Meridiansystem (Inhalte aus EUL-MATERN, 2014).....	26
Tabelle 3: Darstellung der Verbesserung der Spermienqualität nach Elektroakupunktur am Rattenmodell (Inhalte aus JIN et al., 2017).....	31
Tabelle 4: Humanmedizinische Studien zum Einfluss der Akupunktur auf die Spermienqualität – nicht kontrollierte Studien	35
Tabelle 5: Humanmedizinische Studien zum Einfluss der Akupunktur auf die Spermienqualität – kontrollierte Studien	36
Tabelle 6: Akupunkturpunkte der Studie	42
Tabelle 7: Zielparameter der Studie	47
Tabelle 8: Verteilungsannahmen und Linkfunktionen der Nebenzielparameter	52
Tabelle 9: Kategorisierung der Bullen nach Altersgruppen.....	54
Tabelle 10: Anzahl der für die Datenanalyse verfügbaren Spermaproben pro Tier pro Studienphase	56
Tabelle 11: Verteilung der Tiere mit mangelhafter bzw. physiologischer Spermienmotilität und -morphologie vor und nach Intervention.....	57
Tabelle 12: Zeitreihenanalyse zur Darstellung des Einflusses der Faktoren Gruppe, Zeit und Bullenalter auf die Nebenzielparameter	60
Tabelle 13: Inter- und intragruppen-Vergleich vor und nach Intervention; Angabe der Werte: Median (IQR)	66
Tabelle 14: Reaktionszeit im Rahmen der Spermagewinnung im Zeitraum während und nach der Intervention.....	67
Tabelle 15: Zeitreihenanalyse zur Darstellung des Einflusses der Faktoren Zeit und Bullenalter – gute Kohorte	70
Tabelle 16: Vergleich der Spermienparameter zwischen den Zeiträumen vor und nach Intervention; Angabe der Werte: Median (IQR) – gute Kohorte	75
Tabelle 17: Reaktionszeit im Rahmen der Spermagewinnung im Zeitraum während und nach der Intervention – gute Kohorte.....	76

I. EINLEITUNG

Mit der Einführung der genomischen Selektion erfuhr die Rinderzucht weltweit eine erhebliche Umstrukturierung. Durch die frühzeitige Verfügbarkeit von Zuchtwerten bereits nach der Geburt eines Kalbes und der daraus resultierenden Verkürzung des Generationsintervalls¹ können Bullen nunmehr schon mit Beginn der Geschlechtsreife zur Spermien-gewinnung herangezogen werden (MELBAUM et al., 2016). Dies hat zur Konsequenz, dass in Deutschland mittlerweile bis zu 70 % der Besamungen mit Spermia dieser – aus genetischer Perspektive – kostbaren Jungbullen durchgeführt werden (GOCKEL, 2017; OSMERS & HERRMANN, 2017). Gleichwohl ist festzustellen, dass ein genetisch hoher Zuchtwert nicht zwingend mit einer guten Spermienqualität einhergeht. Schließlich genügt ein nicht unerheblicher Anteil der eingesetzten Tiere den Mindestanforderungen nicht (AMANN & DEJARNETTE, 2012; OSMERS & HERRMANN, 2017). Angesichts dessen besteht offenkundig ein großes Interesse der Besamungsbetriebe, die Spermienqualität von Jungbullen zu optimieren, um die Möglichkeiten der wirtschaftlichen Gewinnmaximierung gänzlich ausschöpfen zu können.

Die Wissenschaft konnte bisher keine Ergebnisse liefern, mit denen adäquat auf dieses Bedürfnis reagiert werden könnte. So wurden nur wenige Forschungsarbeiten publiziert, die eine Beeinflussung der Spermienqualität des Bullen durch therapeutische Intervention zum Gegenstand hatten (z. B. Gabe von Hormonen, Mineralstoffen oder ungesättigten Fettsäuren). Zudem ist zu konstatieren, dass deren Resultate teilweise konträr ausfallen (KUMAR et al., 2006; SAJJAD et al., 2007; GHOLAMI et al., 2010; AMAREGOUDA, 2014; GROPPER, 2015). Aufgrund dessen beschränken sich die derzeitigen Optionen, Einfluss auf die Spermienqualität zu nehmen, darauf, das Management im Rahmen der Bullenhaltung sowie der Spermien-gewinnung und -prozessierung zu optimieren (ALMQUIST, 1978; EVERETT & BEAN, 1982; BROWN, 1994; VAN CAMP, 1997; GARNER et al., 2001; NEHRING et al., 2005; FUERST-WALTL et al., 2006; SEHNER, 2006).

Einen neuartigen Lösungsansatz zur nachhaltigen Verbesserung der Spermienqualität von Bullen kann möglicherweise die Akupunktur bieten. Diese Therapieform, die einen Teilbereich der Traditionell Chinesischen Medizin, hier der Traditionell Chinesischen Veterinärmedizin, darstellt, basiert auf einem empirischen Wissenskonglomerat, das sich in

¹ Zeitraum zwischen der Geburt eines Tieres und der Geburt dessen Nachkommen.

China über mehrere Jahrtausende hinweg entwickelt hat (LIANGYUE et al., 1987; XIE & PREAST, 2013a, 2013b). Außerhalb des asiatischen Raumes ist die wenig invasive Behandlungsmethode, bei der spezielle Punkte der Hautoberfläche durch das Setzen von Nadeln stimuliert werden, seit der Mitte des 20. Jh. sowohl in der human- als auch in der tiermedizinischen Praxis etabliert (HALTRECHT, 1999; SIERPINA & FRENKEL, 2005). Mit der Gründung von Akupunktur-Fachgesellschaften, wie z. B. der Deutschen Ärztesellschaft für Akupunktur (1951) oder der *International Veterinary Acupuncture Society* (1974), wurden nicht nur Qualitätsstandards für Praxis und Ausbildung konstituiert, sondern auch die Auseinandersetzung mit wissenschaftlichen Fragestellungen forciert. Indes hinkt die tiermedizinische Akupunkturforschung jener aus der Humanmedizin hinterher – zum einen hinsichtlich der Anzahl der publizierten Forschungsarbeiten, zum anderen in Bezug auf deren methodische Qualität (HABACHER et al., 2006; ROSE et al., 2017).

Mit Blick auf die Studienlage zur Wirkung von Akupunktur auf die Spermienqualität bestätigt sich dieser Befund. Während in der humanmedizinischen Wissenschaft gut konzipierte, randomisiert kontrollierte Studien vorliegen, die größtenteils positive Effekte auf die Spermienqualität, insbesondere die Motilität und die Morphologie, nachweisen (SITERMAN et al., 1997; SITERMAN et al., 2000; GURFINKEL et al., 2003; PEI et al., 2005; DIETERLE et al., 2009; KUCUK et al., 2016), lassen sich vergleichbare Analysen in der Tiermedizin nicht finden. So existieren nur wenige Einzelfallberichte und Fallserien (Bulle: (KOTHBAUER & MENG, 1983; HOLZMANN, 1986; ARLT et al., 2006; ARLT & HEUWIESER, 2009); Hengst: (KOTHBAUER, 2005); Eber: (CHAN et al., 1990)), die aufgrund der geringen Tierzahl sowie teilweise erheblicher methodischer Mängel keinen belastbaren Erkenntnisgewinn versprechen. Um die Forschungslücke zu schließen, die sich – wie eingangs dargestellt – gerade bei genomisch geprüften Jungbullen auftut, war es Ziel der vorliegenden Studie, den Einfluss von Akupunktur auf deren Spermienqualität und Libido zu untersuchen.

Es wurden zwei Analysen durchgeführt: eine randomisiert kontrollierte Studie (Hauptstudie) sowie eine Kohortenstudie. In der randomisiert kontrollierten Studie wurden Jungbullen mit mangelhafter Spermienqualität einer Akupunktur- oder keiner Behandlung (Kontrolle) unterzogen. Untersucht wurde dabei der Anteil der Bullen, der nach Akupunkturbehandlung eine physiologische Spermienqualität aufwies. Zusätzlich wurden weitere Spermieigenschaften aus den Überkategorien der Spermienquantität, -motilität und -morphologie erhoben sowie die Libido der Tiere bewertet. In der Kohortenstudie

wurden Jungbullen mit guter Spermienqualität einer Akupunkturbehandlung unterzogen. Untersucht wurden dabei Spermiegütemerkmale aus den Überkategorien der Spermienquantität, -motilität und -morphologie sowie die Libido der Tiere, um mögliche negative Wirkungen der Therapie identifizieren zu können. Daraus ergaben sich folgende Forschungshypothesen:

Randomisiert kontrollierte Studie:

- Primäre Studienhypothese: Der Anteil der Bullen mit mangelhafter Spermienqualität verringert sich nach Akupunktur- im Vergleich zu keiner Behandlung.
- Sekundäre Studienhypothese: Bullen mit mangelhafter Spermienqualität weisen nach Akupunkturbehandlung bessere Werte hinsichtlich der Spermiegütemerkmale aus den Überkategorien der Spermienquantität, -motilität und -morphologie sowie der Libido auf als Tiere nach keiner Behandlung.

Kohortenstudie:

- Studienhypothese: Bei Bullen mit guter Spermienqualität wirkt sich Akupunktur nicht nachteilig auf die Spermiegütemerkmale aus den Überkategorien der Spermienquantität, -motilität und -morphologie sowie die Libido der Tiere aus.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Spermatologie des Bullen

1.1. Physiologischer Ablauf der Spermatogenese

Der Begriff Spermatogenese bezeichnet den in den Samenkanälchen des Hodens zyklisch ablaufenden Spermienbildungsprozess, der mit der Geschlechtsreife einsetzt (ROOSEN-RUNGE, 1962). Bullen erreichen diese im Alter von ca. 8–11 Monaten (LUNSTRA, 1982). Die Spermatogenese umfasst die Spermatozytogenese mit der Vermehrung der Spermogonien sowie die Spermio-genese mit der Ausdifferenzierung der Spermatischen (EKSTEDT et al., 1986). Hieran fügt sich eine abschließende Reifung im Nebenhoden, mit der die Entwicklung der Spermien beendet ist (ORGEBIN-CRIST et al., 1962).

Den Ausgangspunkt der Spermatozytogenese stellen sog. Stammspermatogonien dar, welche in der präpubertären Phase über die Zwischenstadien der Gonozyten und Prospermatogonien aus den Primordialkeimzellen hervorgehen (BUSTOS-OBREGON et al., 1975). Die Stammspermatogonien erfahren beim Bullen sechs mitotische Teilungen. Neben neuen Stammzellen entstehen hierbei aufeinander folgend die – aufgrund ihrer topografischen Lage in den Samenkanälchen und ihrer unterschiedlichen Morphologie zu klassifizierenden – Typ A-, Typ I (Intermediär)- und Typ B-Spermatogonien, aus denen sich letztendlich die Spermatozyten 1. Ordnung entwickeln (EKSTEDT et al., 1986). Diese treten als diploide Zellen (4n DNA) in die Meiose ein und durchlaufen nacheinander zwei Reifeteilungen. Aus der ersten Reifeteilung resultieren die haploiden Spermatozyten 2. Ordnung (2n DNA), aus der zweiten die Spermatischen (1n DNA) (STEGGER, 2001). Der vollständige Prozess der Spermatozytogenese umfasst beim Bullen ca. 44 Tage (JOHNSON, 1995).

Die sich anschließenden, beim Bullen ca. 17 Tage andauernden (JOHNSON, 1995), Umgestaltungsvorgänge der runden Spermatischen zu hochdifferenzierten Spermien werden unter der Bezeichnung Spermio-genese zusammengefasst. Diese lässt sich in vier Phasen, die Golgi-, die Kappen-, die Akrosom- und die Reifungsphase, untergliedern. Während dieser Differenzierungsprozesse treten insbesondere die Kondensation des Chromatins und die speziesspezifische Ausgestaltung des Spermienkopfes, die Bildung des Akrosoms wie auch die Entwicklung der Geißel in den Vordergrund. Zudem verliert die Spermienzelle den Großteil ihres Zytoplasmas in Form eines Residualkörpers sowie mehrerer tubulo-bulbärer Komplexe. Ein kleinerer Anteil bleibt als Zytoplasmatropfen zunächst am Schwanz des Spermiums haften, ehe er sich während der Nebenhodenpassage (s. u.) ablöst. Im

Anschluss an die Reifungsphase erfolgt die als Spermiation bezeichnete Freisetzung der Spermien ins Lumen der Samenkanälchen. Von dort gelangen die Spermien schließlich über das *Rete testis* und die *Ductuli efferentes* in den Nebenhoden (RÜSSE & SINOWATZ, 2015). Im Verlauf der 8–14-tägigen Nebenhodenpassage (ORGBIN-CRIST et al., 1962; ROSS & ENTWISTLE, 1979) erlangen die Bullenspermien ihre vollständige Befruchtungsfähigkeit. Während des Transports vom Nebenhodenkopf zum Nebenhodenschwanz erfolgen verschiedene physiologische, biochemische und morphologische Veränderungen, die insgesamt als epididymale Spermienreifung bezeichnet werden. Als sichtbarstes Zeichen ist die Ablösung des Zytoplasmatrofens vom Mittelstück zu erkennen. Weiterhin kommt es zur Umstrukturierung der Plasmamembran und des Akrosoms sowie zu Veränderungen hinsichtlich der Motilität und des Stoffwechsels (RÜSSE & SINOWATZ, 2015).

1.2. Morphologischer Aufbau des Spermiums

Lichtmikroskopisch gliedert sich die Spermienzelle beim Säugetier in Kopf und Schwanz. In elektronenmikroskopischer Ansicht lässt sich der Schwanz weiterhin in einen Halsabschnitt, ein Mittel-, ein Haupt- und ein Endstück unterteilen (RÜSSE & SINOWATZ, 2015). Die gesamte Spermienzelle wird von einer Plasmamembran umgeben. Diese weist durch ihre Doppellipidschicht und die darin eingelagerten Moleküle die typische Bauweise von Biomembranen auf. Im Gegensatz zu Membranen somatischer Zellen zeigt sie jedoch einen regional unterschiedlichen molekularen Aufbau. Überdies enthält sie einen hohen Anteil an Cholesterin, das vor allem im Bereich des Kopfes die Fluidität der Membran herabsetzt, sowie eine große Menge an ungesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden (ROVAN, 2001).

Der löffelförmige Kopf besteht, neben einer geringen Menge an Zytoplasma, aus einem Zellkern mit stark kondensierter DNA. Die vorderen 2/3 des Kopfes sind von einer spezifischen Organelle, dem Akrosom, überzogen. Dieses ist aus zwei Membranen zusammengesetzt, die kaudal miteinander in Verbindung stehen. Die innere Membran liegt dem Zellkern an, die äußere der Plasmamembran (EDDY & TOSHIMORI, 2015). Das Akrosom lässt sich in das Apikalsegment, das Hauptsegment und das Äquatoralsegment untergliedern und beinhaltet mehrere hydrolytische Enzyme, die für die Penetration der Eihüllen notwendig sind (FAWCETT, 1970).

Der Spermienhals bildet die gelenkige Verbindung zwischen Spermienkopf und -schwanz. Er besteht aus dem Gelenkkopf, welcher kranial über eine Basalplatte mit der Implantationsgrube des Kopfes sowie kaudal mit dem sog. Streifenkörper in Verbindung

steht (EDDY & TOSHIMORI, 2015). Der Streifenkörper enthält das proximale Zentriol, das die Zygote nach der Befruchtung zur ersten Furchungsteilung befähigt. Aus dem distalen Zentriol, das im reifen Spermium nicht mehr zu identifizieren ist, entwickelt sich während der Spermienreifung das Axonem, ein zentraler Achsenfaden, der sich über die gesamte Länge des Spermischwanzes zieht (RÜSSE & SINOWATZ, 2015). Das Axonem besteht aus zwei zentralen, isoliert voneinander vorliegenden Mikrotubuli, die von einem Bündel aus neun Mikrotubulipaaaren umgeben werden. Diese bestehen jeweils aus einem vollständig entwickelten A- und einem nur teilweise ausgebildeten B-Tubulus. Der etwas kleinere A-Tubulus besitzt zwei kurze Dyneinarme, über die er mit dem nächsten Tubuluspaar in Verbindung steht (FAWCETT, 1970). Durch kinetisch-energetische Prozesse der Dyneinarme werden die Doppeltubuli gegeneinander verschoben, was zu einer gleichmäßigen Bewegung des Flagellums führt (TURNER, 2006). Den äußeren Mikrotubulipaaaren sind jeweils sog. Mantelfasern zugeordnet, die das Axonem bis zum letzten Drittel des Hauptstücks umgeben (SERRES et al., 1983; HAIDL et al., 1991). Das Mittelstück wird durch das Vorhandensein von Mitochondrien definiert. Über End-zu-End-Verbindungen verknüpft, ordnen sich die längsovalen Mitochondrien schraubenförmig zu einer Helix an. Diese verläuft zwischen Hals und Jensens-Ring, einer elektronendichten Struktur, die den Übergang zum Hauptstück markiert (EDDY & TOSHIMORI, 2015). Das Hauptstück, das den größten Teil des Schwanzes darstellt, weist unter der Plasmamembran eine Ringfaserscheide auf. Diese umringt die Mantelfasern und teilt sich in eine dorsale und eine ventrale Längsleiste auf, die seitlich über feine Rippen miteinander verknüpft sind (PESCH & BERGMANN, 2006). Im Endstück der Geißel finden sich weder Ring- noch Mantelfasern. Mitunter fehlt auch das zentrale Mikrotubuluspaar, sodass die äußeren Mikrotubuli des Axonems nur noch ungeordnet verlaufen (ROVAN, 2001).

1.3. Spermagewinnung und -untersuchung

Die Methode der Wahl zur Ejakulatgewinnung beim Besamungsbullen stellt die Samenentnahme mithilfe einer künstlichen Vagina dar (LEWIS, 1998). Diese erfolgt unter Ausnutzung der Reflexkette des natürlichen Paarungsverhaltens (Vorspiel – Emission – Erektion – Aufsprung – Umklammerung – Suchbewegungen – Einführen – Ejakulation – Nachstoß – Absprung – Erschlaffung – Nachspiel). Zur Auslösung der Reflexkette sind olfaktorische, optische sowie taktile Reize nötig, die es während des gesamten Samenentnahmeprozesses anzubieten gilt (LEIDING, 2007). Dabei stellt der „Torbogen“ (Umriss der hinteren Körperhälfte eines Rindes) den wichtigsten Schlüsselreiz dar, der durch einen Aufsprungsbullen oder ein Phantom bereitgestellt werden kann (EIBL, 1959). Während des

Vorspiels erfolgt zunächst, zur sexuellen Anregung, ein mehrminütiges Vorbeiführritual am Sprungpartner/Phantom sowie ein oder zwei „Blindsprünge“ ohne Spermaentnahme (WEITZE, 2001). Nach ausreichender Stimulation wird, bei erneutem Aufsprung des Bullen, der Penis durch einen Samenentnahmetechniker an eine künstliche Vagina herangelenkt, die schließlich den Ejakulationsreflex auslöst (KRAUSE, 2012). Mit dem Abstieg des Bullen wird die künstliche Vagina vom Penis abgezogen und das sich daran befindende Samenauffangglas unter Wärmeschutz entfernt und dem Labor zur qualitativen und quantitativen Untersuchung zur Verfügung gestellt (EIBL, 1959).

Die sich einer Ejakulatentnahme in der Regel direkt anschließende konventionelle Samenuntersuchung berücksichtigt im Allgemeinen makroskopische, mikroskopische und chemisch-physikalische Analyseverfahren. Die makroskopische Spermauntersuchung umfasst die grobsinnliche Prüfung von Volumen, Aussehen (Farbe und Konsistenz) und Geruch des Ejakulats (WEITZE, 2001). Hygienisch einwandfrei gewonnene Ejakulate gesunder Bullen sollten eine Mindestmenge von 2 ml (Jungbullen) oder 4 ml (adulte Bullen) erreichen und von rahmartiger Beschaffenheit, weißer bis weiß-gelblicher Farbe und leicht aromatischem Geruch sein (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2006; KRAUSE, 2012). Anomale Befunde stellen eine molkeähnliche oder wässrige Konsistenz (verminderte Spermiedichte), eine rote, grünliche oder graue Farbe (Blut, Eiterbeimengungen, Verunreinigungen) sowie ein urinöser oder fauliger Geruch dar (KRAUSE, 2012). Die mikroskopische Untersuchung beinhaltet die Schätzung der Spermiedichte, -motilität, -morphologie und -vitalität sowie die Bestimmung von Agglutination, Fremdzellen und Beimengungen im Ejakulat. Mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops werden die einzelnen Parameter anhand von Nativ-, gefärbten und fixierten Präparaten ausgezählt und in hierarchischer Reihenfolge protokolliert (WEITZE, 2001; WABERSKI & PETRUNKINA, 2007). Die Mindestanforderungen für unverdünntes Sperma bei Besamungs- und Deckbullen (Normospermie) sowie davon abweichende Befunde inklusive ihrer Nomenklatur sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Mindestanforderungen für unverdünntes Sperma bei Besamungs- und Deckbullen (mod. nach Krause, 2012)

Darstellung der Mindestanforderungen für unverdünntes Sperma (Normospermie) bei Besamungs- und Deckbullen und davon abweichende Veränderungen unterschiedlichen Schweregrades

Beurteilungskriterium	Volumen (ml)	Dichte (x 10 ⁶ /mm ³)	Motilität (Massen- und Vorwärtsbewegung (%))	Morphologie (abweichende Spermien (%))	Verunreinigungen
Normospermie (alle Befunde erfüllen die Mindestanforderungen)	Jungbullen: > 2 Adulte Bullen: > 4	> 0,6	M: +++/++++ V: > 70	< 20 (darunter ≤ 5 Kopf-, ≤ 10 Kopfkapfenveränderungen)	keine
Dyspermie (geringgradige bis mittelgradige Abweichungen)	< 1 (Oligospermie)	< 0,4 (Oligozoospermie)	V: < 40 (Asthenozoospermie)	> 30 (Teratozoospermie)	keine
Pathospermie (hochgradige Abweichungen)	< 0,5	< 0,2	M: ± V: < 20	> 50	Mäßige bis schwere Pollutospermie (Blut, Eiter, Harn)
Vollständiger Verlust des betreffenden Merkmals	Aspermie (kein Ejakulat)	Azoospermie (Ejakulat enthält keine Spermien)	Akino- (alle Spermien unbeweglich) oder Nekrozoospermie (alle Spermien tot)	Völlige Teratozoospermie	Völlige Pollutospermie, keine Samenzellen

Abk.: M: Massenbewegung; ml: Milliliter; mm³: Kubikmillimeter; V: Vorwärtsbewegung; ++: zahlreich; +++: massenhaft; ±: sehr vereinzelt

Die den Untersuchungsgang abschließende chemisch-physikalische Prüfung integriert die Bestimmung von pH-Wert (Normbereich 6,4–7,0) und Osmolarität (Normbereich 280–300 mOsmol) des Ejakulats sowie die Ermittlung der Spermienresistenz unter Belastung. Für letztere existieren verschiedene Testverfahren, bei denen die Samenzellen thermischem, osmotischem oder lagerungsbedingtem Stress ausgesetzt werden; z. B. „Thermoresistenztest“, Tiefgefrierung, „Hypoosmotischer Schwelltest“, „Haltetest“ (WABERSKI & PETRUNKINA, 2007). Mindestanforderungen existieren hinsichtlich des „Haltetests“ (Vorwärtsbeweglichkeit nach Lagerung bei 72 Stunden: > 50 %) und der Tiefgefrierung (Vorwärtsbeweglichkeit nach Auftauen: > 50 % bei 2/3 der gewonnenen Ejakulate) (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2006).

Neben den aufgeführten konventionellen Untersuchungsmethoden existieren überdies entwickelte, spezialisierte Testverfahren, die zahlreiche spezifische – über die Standardpermatologie hinausgehende – Parameter berücksichtigen. Neben aufwendigen Spermien-Eileiter-Bindungsassays, Kapazitations- und Zonabindungs- oder -penetrationstests sind vor allem die Durchflusszytometrie, die computergestützte Spermienanalyse sowie das Fluoreszenzimagining als einzelzell-orientierte Verfahren zu nennen, welche die Fertilitätsprognosen nachweislich verbessern (WABERSKI & PETRUNKINA, 2007; PETRUNKINA et al., 2008; TSAKMAKIDIS, 2016). Insbesondere durch die – in der mikroskopischen Spermauntersuchung als defizitär etikettierte – Objektivität der Befunderhebung, die Standardisierbarkeit der Messtechnik sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewinnen diese Analyseverfahren kontinuierlich an Bedeutung (WABERSKI & PETRUNKINA, 2007; RIJSSELAERE et al., 2012). Als einschränkend für den regelmäßigen Einsatz in Praxisbetrieben sind die hohen Anschaffungskosten der Gerätschaften anzusehen, die gegenwärtig überwiegend der spezialisierten Labordiagnostik vorbehalten sind (NIŻAŃSKI et al., 2012; RIJSSELAERE et al., 2012). In Deutschland verfügen lediglich große Besamungsstationen, wie z. B. die „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ (Kooperationsbetrieb der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie) oder die „CRV Deutschland GmbH“, mittlerweile über die Technologie einer computergestützten Spermienanalyse (WABERSKI & PETRUNKINA, 2007; AMANN & WABERSKI, 2014). Diese erstmals 1979 vorgestellte (DOTT & FOSTER, 1979), auch als CASA-System (*computer assisted/aided sperm analysis-system*) (AMANN & WABERSKI, 2014) bezeichnete, Technik basiert auf der Digitalisierung mikroskopischer Ejakulat-Bilder und deren elektronischer Auswertung (AMANN & KATZ, 2004). Über ein vollautomatisiertes

Videomikrographiesystem, das über ein Phasenkontrastmikroskop, eine Videokamera und eine geeignete Computersoftware verfügt (YESTE et al., 2018), werden Spermien im Ejakulat anhand ihrer Größe, Luminanz und Bewegungsform identifiziert. Durch die Analyse und den Vergleich mehrerer Einzelaufnahmen können schließlich simultan die Konzentration sowie verschiedene Morphologie- und Motilitätsparameter der Spermien erfasst werden (KRAUSE, 2012). Bedeutend sind insbesondere diverse Geschwindigkeits- und Bewegungsrichtungsgrößen, die mittels konventioneller, mikroskopischer Untersuchung nicht detektiert werden können (RIJSSELAERE et al., 2005).

1.4. Einflussfaktoren auf die Spermienqualität

Die Spermienqualität des Bullen kann, wie auch bei anderen Spezies, durch verschiedenste Faktoren beeinflusst werden. Hierbei ist zu unterscheiden, ob eine Beeinflussung vor der Spermagewinnung (Effekte am Tier) oder im Anschluss daran (Effekte in der Prozessierung) stattfindet, wobei erstere vom Tier selbst („innere Faktoren“) oder von sonstigen Umständen („äußere Faktoren“) ausgehen kann.

1.4.1. Effekte am Tier

1.4.1.1. Innere Faktoren

Zu den „inneren Faktoren“ ist zuvorderst der Einfluss der Bullenrasse auf die Spermienqualität zu zählen, der in mehreren Untersuchungen nachgewiesen wurde (FIELDS et al., 1979; SCHWAB et al., 1987; CHENOWETH et al., 1996; SÖDERQUIST et al., 1996; BRITO et al., 2002; ASAD et al., 2004; HIRWA et al., 2017). So wurde beispielsweise die Überlegenheit von Holstein-Friesian- gegenüber Jersey-Rindern hinsichtlich des Ejakulatvolumens (HIRWA et al., 2017) sowie eine höhere Spermienkonzentration bei Aberdeen- im Vergleich zu Montana-Hereford-Bullen festgestellt (FIELDS et al., 1979). Auf ein ausführliches Ergebnisbild der Zuchtunterschiede und deren Auswirkungen auf die Spermienqualität wird an dieser Stelle aufgrund des Umfangs der in den Studien verglichenen Rassen inklusive deren Kreuzungen verzichtet.

Gleichfalls wird die Qualität von Spermaproben durch das Alter eines Bullen bestimmt. Zahlreiche Untersuchungen zeigen eine Verbesserung der spermatologischen Basisparameter mit fortschreitender Lebenszeit (MATHEVON et al., 1998). So liefern Bullen unter zwei Lebensjahren die schlechtesten Ejakulate hinsichtlich Volumen, Spermiengesamtzahl und -motilität (PALDUSOVA et al., 2014; ARGIRIS et al., 2018). Mit zunehmendem Alter ist eine Verbesserung der Qualität zu verzeichnen, die nach dem Erreichen einer

Plateauphase (mit 6–10 Lebensjahren) letztendlich wieder abnimmt (STALHAMMAR et al., 1989; MATHEVON et al., 1998; FUERST-WALTL et al., 2006; ARGIRIS et al., 2018; MURPHY et al., 2018c). Während der Qualitätsanstieg in direktem Zusammenhang mit den physiologischen Veränderungen steht, die der Organismus im Rahmen des Erreichens der sexuellen Reife erfährt (AMANN, 1983; MATHEVON et al., 1998), ist der Rückgang im Alter auf degenerative Veränderungen des Hodengewebes zurückzuführen (HIRWA et al., 2017).

Ferner steht auch der anatomisch-physiologische Zustand des Hodens und des Skrotums in Korrelation mit der Spermienqualität beim Bullen. So werden, insbesondere bei jungen Bullen, ein geringes Hodenvolumen, eine weiche Hodenkonsistenz, ein geringer Skrotalumfang sowie eine körpernahe skrotale Aufhängung mit einer geringen Spermienqualität in Verbindung gebracht (WEITZE, 2001; BRITO et al., 2002; BRITO et al., 2004).

Neben von der Norm abweichenden anatomischen Verhältnissen können freilich auch pathologische Zustände der Reproduktionsorgane (Skrotum, Hoden, Nebenhoden, akzessorische Geschlechtsdrüsen) eine minderwertige Spermienqualität bedingen. Neben angeborenen Missbildungen, Traumata sowie entzündlichen oder neoplastischen Veränderungen sind auch zahlreiche weitere Ursachen für derartige Pathologien verantwortlich, wie z. B. hormonell bedingte Dysfunktionen oder autoimmune Prozesse (VAN CAMP, 1997). Überdies können auch Allgemeinerkrankungen des Bullen durch Produktion von schädigenden Noxen oder indirekt über endokrine Störungen der Gonaden eine Beeinträchtigung der Spermatogenese erwirken (WEITZE, 2001).

1.4.1.2. Äußere Faktoren

Weiterhin existieren „äußere Faktoren“, die sich auf die Spermatozoenqualität auswirken können. Diese umfassen Einflüsse der Umwelt und des Managements im Rahmen der Bullenhaltung sowie der Spermagewinnung auf der einen Seite und die gezielte therapeutische Behandlung von Bullen mit minderwertiger Spermienqualität auf der anderen Seite.

Hinsichtlich der natürlichen Einwirkungen der Umwelt sind an erster Stelle insbesondere jahreszeitliche Effekte zu nennen, die am Bullen ausführlich untersucht wurden (FUENTE et al., 1984; SCHWAB et al., 1987; STALHAMMAR et al., 1989; SÖDERQUIST et al., 1996; MATHEVON et al., 1998; IGNA et al., 2010; BHAKAT et al., 2011; SNOJ et al., 2013; DE CASTRO et al., 2017; MALAMA et al., 2017). Die Mehrzahl der existenten Studien deklariert eine saisonale Einflussnahme auf die Spermienproduktion über die Temperatur, die Luftfeuchtigkeit, den Luftdruck sowie die Tageslänge (MATHEVON et al.,

1998). Als ursächlich werden klimatisch bedingte Veränderungen der skrotalen Thermoregulation, des endokrinen Profils sowie der Ansprechbarkeit des Hodens auf Gonadotropine angesehen (MALAMA et al., 2017). Die Ergebnisse der einzelnen Analysen differieren jedoch. So beschreiben einige Autoren – die europäische Klimazone betrachtend – eine Verschlechterung von bovinen Spermaproben während der Sommer- (SÖDERQUIST et al., 1996; MATHEVON et al., 1998; IGNA et al., 2010; MALAMA et al., 2017), andere hingegen während der Wintermonate (FUENTE et al., 1984; STALHAMMAR et al., 1989; SNOJ et al., 2013). Untersuchungen aus tropischen Regionen proklamieren unisono eine Qualitätsabnahme außerhalb der Regenzeit (BHAKAT et al., 2011; DE CASTRO et al., 2017). Neben klimatischen Faktoren können überdies Mangelzustände von Spurenelementen für eine minderwertige Spermienqualität beim Bullen verantwortlich sein. Ursache hierfür kann primär deren vermindertes Vorkommen in Böden und dementsprechend in Futtermitteln sein; aber auch Interaktionen mit anderen Futterinhalts- oder Mineralstoffen können sekundär die Aufnahme über den Darm behindern. Erwähnenswert sind vor allem Zink, Selen, Jod, Eisen, Kupfer, Molybdän und Mangan, die bei unzureichender Konzentration im Organismus zu einer dysfunktionalen Steroidproduktion oder einer Schädigung des Hodengewebes und damit zu einer gestörten Spermatogenese führen können. Fernerhin sind auch sog. Xenobiotika zu den die Spermatozoenqualität beeinflussenden Umweltfaktoren zu rechnen. Hierbei handelt es sich um anthropogene chemische oder physikalische Substanzen, wie z. B. Pestizide, Düngemittel, Abgase, Industriechemikalien oder Strahlungen, die hauptsächlich indirekt über das Futter in den Organismus gelangen können (GOLBS, 2001). Die Qualität der Samenzellen kann dabei über prätestikuläre (Störung der hormonellen Kontrolle), testikuläre (Schädigung des Hodengewebes) und posttestikuläre Angriffspunkte (Destruktion der ausgereiften Spermien) geschmälert werden (KÖHN et al., 2000; GOLBS, 2001).

Im Kontext der Bullenhaltung ist zunächst der Einfluss der Fütterung auf die Spermatozoenqualität anzubringen, der in erster Linie bei Jungtieren zu Tage treten kann. So kann ein übermäßiges Energiedefizit während des Wachstums in einem verzögerten Erreichen der Pubertät, einer testikulären Atrophie sowie einer reduzierten Spermienproduktion resultieren. Ebenfalls bewirken proteinarme Rationen bei längerer Gabe unter Umständen eine temporäre Einschränkung der Reproduktionsfunktion. Adulte Tiere zeigen eine geringere Anfälligkeit, sodass vergleichbare Effekte erst bei extremer Unterernährung in Erscheinung treten (BROWN, 1994; VAN CAMP, 1997). Umgekehrt kann sich auch eine extensive Fütterung durch skrotale Fettablagerungen und eine damit einhergehende

herabgesetzte Thermoregulation des Hodens schädigend auf die Samenzellen auswirken (COULTER et al., 1997; VAN CAMP, 1997; BARTH & WALDNER, 2002). Überdies ist auch der Einsatz von Pharmaka und deren potentielle Nebenwirkungen auf die Spermienqualität erwähnenswert (GOLBS, 2001). Derartige Zusammenhänge wurden bislang allerdings vorwiegend am Menschen untersucht; die aktuelle Studienlage am Bullen ist als defizitär zu beschreiben und erlaubt keine dahingehenden Aussagen. Humanmedizinische Studien führen die spermatozoenschädigende Wirkung zahlreicher Medikamente an. Beispielhaft sind an dieser Stelle Arzneimittel aus den Wirkstoffklassen der Zytostatika, Immunsuppressiva, Antiemetika, Antihypertensiva sowie bestimmter Antibiotika (z. B. Aminoglykoside) zu nennen (KÖHN et al., 2000; SAMPLASKI & NANGIA, 2015). Aufgrund der teilweise geringen Relevanz der untersuchten Arzneimittel im Rahmen der Rindermedizin sowie der unterschiedlichen Wirkung reproduktionstoxischer Medikamente bei verschiedenen Spezies (GOLBS, 2001), scheinen diese Ergebnisse für die Haltung von Bullen jedoch nur von nachrangiger Bedeutung zu sein.

Zu den Faktoren, welche die Ejakulatbeschaffenheit im Rahmen des Spermagewinnungsprozesses beeinflussen können, zählt vor allem die Frequenz der Samenentnahmen. So resümieren einige Untersuchungen, dass ein Absamungsintervall von weniger als vier Tagen eine Abnahme des Ejakulatvolumens sowie der Spermienkonzentration zur Folge hat (ALMQUIST, 1978; EVERETT & BEAN, 1982; SCHWAB et al., 1987; MATHEVON et al., 1998; FUERST-WALTL et al., 2006). Selbige Parameter waren auch bei solchen Ejakulaten reduziert, die innerhalb eines Tages auf eine Erstabsamung folgend gewonnen wurden (EVERETT & BEAN, 1982; FUERST-WALTL et al., 2006; BOUJENANE & BOUSSAQ, 2013; MURPHY et al., 2018c). Zudem existieren Publikationen, die eine nicht ordnungsgemäße Durchführung (ALMQUIST, 1978) und Dauer (KOMMISRUUD & BERG, 1996) der sexuellen Vorstimulation des Bullen und damit indirekt das mit der Samenentnahme betraute Personal für eine suboptimale Spermienqualität verantwortlich machen (MATHEVON et al., 1998; FUERST-WALTL et al., 2006).

Den letzten Gesichtspunkt in diesem Zusammenhang bildet der Versuch, die Spermienqualität von Bullen therapeutisch zu optimieren. Insbesondere für Reproduktionsbetriebe bietet ein solcher Ansatz, im Zeitalter der künstlichen Befruchtung, die Möglichkeit zur Gewinnmaximierung. Diesem Bestreben von Seiten der Wirtschaft kann jedoch die Wissenschaft bis dato nicht gerecht werden. Es existieren nur wenige Studien, die eine Verbesserung der Spermienqualität des Bullen nach therapeutischer Intervention untersuchen. Dies begründet sich mutmaßlich in der Tatsache, dass in der Humanmedizin diesbezüglich

nur wenig zufriedenstellende Ergebnisse erzielt wurden, welche eine Übertragung auf das Rind zuließen. So stehen, abgesehen von der kausalen Hormontherapie des Hypogonadismus (Unterfunktion der Gonaden), bisher keine wirksamen Behandlungsformen der männlichen Infertilität zur Verfügung (HAIDL, 2003). Positive Resultate empirischer Therapieversuche (z. B. mit Antiöstrogenen, Aromatasehemmern, Mastzellblockern, Zinksalzen, Antioxidantien, Enzymen (Kallikrein)) erfuhren keine Bestätigung im Rahmen randomisiert kontrollierter Studien und mündeten demzufolge in keiner Arzneimittelzulassung (KÖHN et al., 1999; WEIDNER et al., 2006). Nach aktueller – dünner – Studienlage gibt es auch beim Bullen kaum positive, in groß angelegten Studien legitimierte, Resultate. Bislang untersuchte Ansätze zur Verbesserung der Spermienqualität – mit überwiegend geringer Fallzahl – sind im Folgenden dargestellt, wobei die Akupunktur, als Kernthema der vorliegenden Arbeit, an dieser Stelle keine weitere Berücksichtigung findet, sondern in einem eigenen Kapitel umfassend aufgeführt wird (siehe Kap. II.3.2.).

Forschungsansatz mehrerer Studien ist zum einen die Hormontherapie. Untersuchungen mit PGF 2α und Oxytocin (n = 2–10) wiesen partiell einen signifikanten Anstieg der Spermienkonzentration im Anschluss an die Medikation nach (PGF 2α : p = 0,02 (MASOUMI et al., 2011), p < 0,05 (HAFS et al., 1974); Oxytocin: p < 0,025 (BERNDTSON & IGBOELI, 1988), p < 0,05 (KLENNER & BORYCZKO, 1980)), wobei die Zunahme durch einen – aufgrund von Stimulation der kontraktilen Hodenkapsel angeregten – erhöhten Abtransport reifer Spermien aus dem Nebenhoden und weniger durch eine Beeinflussung der Spermatogenese begründet wird. In anderen Studien (n = 4–18) wurde ein Anstieg der Spermienkonzentration nicht bestätigt: PGF 2α : (KLENNER & BORYCZKO, 1980; RAO et al., 1986; AMAREGOUDA, 2014); Oxytocin: (AMAREGOUDA, 2014). Untersuchungen mit GnRH liefern ein ähnlich indifferentes Ergebnisbild. So stehen Studien (n = 2–8) mit einer signifikanten Verbesserung der Spermienqualität (Konzentration und Motilität: p-Wert nicht gegeben (nur Abstract vorhanden) (CHANDER et al., 2004); Morphologie: p < 0,05 (SAJJAD et al., 2007)) Analysen ohne derartigen Effekt (GÁBOR et al., 1995; AMAREGOUDA, 2014; ROMANELLO et al., 2018) gegenüber.

Zugleich finden sich, wie auch in der Humanmedizin, Studien, welche die Wirksamkeit von Mineralstoffen auf die Spermienqualität untersuchten. Die einheitlich ausfallenden Ergebnisse der Analysen (n = 7–18) zeigen eine Verbesserung der Spermienqualität nach Supplementierung von Zink (Konzentration und Motilität: p < 0,05 und < 0,01 (CUPIC et al., 1998); Konzentration, Motilität und Vitalität: p < 0,01 (KUMAR et al., 2006)) und

Mineralstoffgemischen (*Miragest*²) auf (Motilität: p-Wert nicht gegeben (MÜLLER & SZILAGYI, 1966)). Stoffen, die in organischer Form zugeführt werden, wird dabei eine größere Wirkkraft auf die Spermienqualität zugeschrieben als Elementen in anorganischen Verbindungen (ARTHINGTON et al., 2002; ROWE et al., 2014).

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss mehrfach ungesättigter Fettsäuren – als prädominanter Bestandteil der Plasmamembran von Spermatozoen – auf die Spermienqualität. In einigen Studien (n = 15–21) führte die Zufütterung von Leinsamenöl/ α -Linolensäure (MOALLEM et al., 2015), Sonnenblumenöl/ α -Linolensäure (ADEEL et al., 2009) oder Futterzusatzstoffen/Docosahexaensäure und Eicosapentaensäure (GHOLAMI et al., 2010) zu einer signifikanten Verbesserung (p < 0,05) der Spermienmotilität. Andere Autoren beobachteten keine dahingehenden Effekte nach Verabreichung ungesättigter Fettsäuren/ α -Linolensäure (GROPPER, 2015; GÜRLER et al., 2015). Die Spermienkonzentration blieb in allen Untersuchungen unangiert.

Neben den genannten Therapieversuchen mit Hormonen, Mineralstoffen und Fettsäuren existieren außerdem Ansätze, die bisher jeweils nur im Rahmen einzelner Studie analysiert wurden (MÜLLER & BRANDL, 1977; CLÉMENT et al., 2010; DE SOUZA et al., 2012; CHEN et al., 2017). Müller & Brandl (1977) führten eine Untersuchung mit Kallikrein (Enzym) durch (n = 3), das bei allen Bullen einen signifikanten Anstieg (p = 0,001) der Spermienmotilität bewirkte. Clement et al. (2010) (n = 78) beobachteten einen signifikant-positiven Effekt (p < 0,05) der Maca-Pflanze (*Lepidium meyenii*, Kressegewächs aus den Anden) auf Spermienzahl und -motilität sowie den Anteil an Spermatozoen mit DNA-Defekten. Auch existiert eine Fallserie, die die qualitätsfördernde Wirkung einer homöopathischen Behandlung auf die Spermatozoen von vier Bullen beschreibt. Die Tiere wurden individuell nach homöopathischer Vorgehensweise mit *Sulphur*, *Phosphorus*, *Lycopodium* und *Argentum nitricum* behandelt, woraufhin sich die Anzahl der Ejakulate mit definierten Mindestanforderungen signifikant (p < 0,05) erhöhte (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1998; DE SOUZA et al., 2012). Die aktuellste Studie in diesem Zusammenhang untersuchte an 35 Bullen die Wirkung von Letrozol, einem sog. Aromatasehemmer (Aromatase = Hauptenzym der Östrogensynthese). Verzeichnet wurde ein signifikanter Anstieg (p < 0,01) der Spermienmotilität nach Medikation (CHEN et al., 2017).

² Mineralstoffgemisch aus Calcium, Phosphor, Magnesium, Eisen, Mangan, Kupfer, Cobalt, Jod, Zink, Silicium, Molybdän, Vitamin A, B, D und E sowie essentiellen Amino- und Fettsäuren.

1.4.2. Effekte in der Prozessierung

Abschließend sind Faktoren anzuführen, welche die Qualität von Spermien nach deren Gewinnung (in-vitro) im Rahmen der Prozessierung beeinflussen. Darunter ist insbesondere die von Besamungsstationen durchgeführte Haltbarmachung von Spermien in flüssigem Stickstoff (Kryokonservierung) zu verstehen, die im Einzelnen die Konfektionierung inklusive Verdünnung, das Abkühlen und Einfrieren, die Lagerung bei -196 °C und letztendlich das Wiederauftauen von Spermien umfasst (BARBAS & MASCARENHAS, 2009). Im Verlauf dieser Verfahrensschritte wirken obligat chemische, osmotische, thermische und mechanische Einflüsse auf die Spermatozoen ein (VISHWANATH & SHANNON, 2000; ANDRABI, 2009), sodass die Zahl der lebenden Spermien während des Gesamtprozesses erheblich abnimmt (CURRY, 2000; ANDRABI, 2009). Seit den Anfängen der künstlichen Besamung zielt die wissenschaftliche Forschung demnach darauf ab, diese Verluste so gering wie möglich zu halten. Kontinuierlich werden zahlreiche Studien veröffentlicht, die an verschiedenen Punkten (v. a. Verdünnungsmedium sowie Einfrier- und Auftaukurve) angreifende Optimierungsansätze liefern. Auf deren Ergebnissen basierend existieren mittlerweile standardisierte Kryokonservierungs-Protokolle (MEDEIROS et al., 2002), die allerdings, aufgrund des ständigen Neuerscheinens von Studien (FUJIKAWA et al., 2018; MURPHY et al., 2018a; MURPHY et al., 2018b; NONGBUA et al., 2018; KHALIL et al., 2019), einer konstanten Anpassung bedürfen.

Einer der Hauptansatzpunkte, die Spermenschädigung im Verlauf des Kryokonservierungsprozesses zu minimieren, ist die Verwendung eines Verdünnungsmediums. Von vorrangiger Bedeutung sind hierbei dessen Inhaltsstoffe. So enthalten aktuell verkäufliche Verdünnungsmedien für Bullensperma neben Kryoprotektiva (v. a. Glycerin (POLGE et al., 1949) und Eidotter (PHILLIPS, 1939) oder pflanzliche Lecithine (LAYEK et al., 2016)) auch schwache Puffer zur Stabilisierung von pH-Wert und osmotischem Druck (v. a. TRIS oder Zitrat), Kohlenhydrate zur Bereitstellung von Energie (z. B. Glukose oder Fructose), Antioxidantien zum Schutz gegen Sauerstoffradikale (z. B. Glutathion oder Cystein) (NEHRING et al., 2005) sowie Antibiotika zur Hemmung von Keimwachstum (v. a. Penicillin und Streptomycin) (BARBAS & MASCARENHAS, 2009). Allerdings spielt neben der Zusammensetzung des Verdünnungsmediums auch dessen relative Menge im Vergleich zum Ejakulatvolumen eine entscheidende Rolle in Bezug auf die Spermienqualität (GARNER et al., 2001). So führen zu hohe Verdünnungsgrade ($> 1:37$) im Zuge der Konfektionierung zu einer relativen Reduzierung des Seminalplasma-Anteils ($< 3\%$) (NEHRING et al., 2005). Der daraus resultierende Mangel essentieller Komponenten (z. B.

Proteine, Steroide, Prostaglandine, Kohlenhydrate, Mineralstoffe, Spurenelemente (PETZOLDT, 2001)) bringt eine Destruktion der Spermien mit sich, was auch als „Verdünnungseffekt“ bezeichnet wird. Eine Verringerung dieses Vitalitätsverlustes kann durch eine kompensatorische Supplementierung von Seminalplasma erreicht werden (MAXWELL & JOHNSON, 1999; GARNER et al., 2001).

Einen erheblichen Einfluss auf die Spermienqualität hat außerdem das im Verlauf der Kryokonservierung angewendete Temperaturregime. So wird für den Abkühlvorgang von 37 °C auf 5 °C ein mehrstündiger Temperaturabfall von ca. 0,1–0,2 °C pro Minute, für den Einfriervorgang auf -110 °C ein Temperaturabfall von ca. 10–100 °C pro Minute, für die Konservierung eine konstante Temperatur von -196 °C sowie für den Auftauvorgang auf 37 °C ein Erwärmen der Spermien bei ca. 38 °C über 30 Sekunden hinweg empfohlen (ENNEN et al., 1976; JANUSKAUSKAS et al., 1999; VISHWANATH & SHANNON, 2000; CHAVEIRO et al., 2006; SEHNER, 2006). Davon abweichende Temperaturkurven resultieren in einer verminderten Überlebensrate der Spermatozoen nach dem Auftauen (VISHWANATH & SHANNON, 2000; SUKHATO et al., 2001; WEITZE, 2001; SEHNER, 2006; ANDRABI, 2009). Die Dauer der Konservierung spielt im Hinblick auf die Spermienqualität keine Rolle. Aufgrund der Tatsache, dass bei einer Temperatur von -196 °C alle thermodynamischen Prozesse der Zellen unterbrochen sind, ist bei dieser Form der Lagerung lediglich die kosmische Hintergrundstrahlung als spermenschädigender Faktor in Erwägung zu ziehen. Derartige Beeinträchtigungen sind allerdings erst bei einer Aufbewahrung von mehreren tausend Jahren zu erwarten (MAZUR, 1980).

1.5. Bedeutung der Spermienqualität

In der modernen Rinderzucht ist die Vorhersage der Einsatzfähigkeit eines Bullen für die künstliche Besamung von großer Bedeutung (LIGNER, 2009), um ein effektives Detektieren hochfertiler Tiere (HOCHSCHULZ, 2003) und damit die Erzeugung vieler Nachkommen gewährleisten zu können. Gegenüber dem Interesse der Zuchtindustrie, die Fertilität anhand von einfachen spermatologischen in-vitro-Untersuchungen prognostizieren zu können, steht jedoch eine Kontroverse in der Wissenschaft. Zahlreiche Studien, die einen korrelativen Zusammenhang zwischen der Spermienqualität und der Fertilität untersuchten (KATHIRAVAN et al., 2011), liefern inkonsistente Ergebnisse, wobei Unterschiede hinsichtlich der verwendeten Analyseverfahren zu erkennen sind (s. u.). Die häufigste Methode zur Erfassung der Fertilität stellt dabei die Ermittlung der Non-Return-Rate dar, die den Anteil der Kühe beschreibt, der zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Besamung

nicht erneut besamt werden muss und demnach als trächtig gewertet wird (PEPPER-YOWELL, 2011).

Untersuchungen, denen eine konventionelle mikroskopische Analyse des Ejakulats zugrunde lag, erzielten zum Teil signifikante, unterschiedlich hohe Korrelationen zwischen einzelnen spermatologischen Parametern – vorwiegend der Spermienmotilität und -morphologie – und der Fertilität (WOOD et al., 1986; KARABINUS et al., 1990; BARTH et al., 1992; KJAESTAD et al., 1993; CHRISTENSEN et al., 1999). Andere, auf gleiche Weise durchgeführte, Studien bestätigten diese Zusammenhänge nicht (SÖDERQUIST et al., 1991; ANDERSSON et al., 1992; JANUSKAUSKAS et al., 1999). Als ursächlich für diese Divergenz wird insbesondere die Subjektivität der Messmethode und die damit einhergehende Ungenauigkeit und Variabilität von Seiten des Untersuchers angebracht (LINFORD et al., 1976; CHRISTENSEN et al., 1999; MOCE & GRAHAM, 2008). Außerdem sei diese Methodik ungeeignet, mehrere Parameter eines Spermiums simultan zu erfassen, was häufig eine Überschätzung der befruchtungsfahigen Spermien in einer Probe mit sich bringt (JANUSKAUSKAS et al., 1999; GRAHAM & MOCE, 2005).

Dementgegen stehen auf objektiven Messmethoden, insbesondere dem CASA-System, basierende Studien aus den letzten zwei Jahrzehnten, die neben der Motilität vor allem die Spermienkinetik ins Zentrum ihrer Untersuchung stellten. Die Resultate der Studien fallen, im Gegensatz zu oben genannten Analysen, einheitlicher aus. So wiesen die meisten Autoren einen korrelativen Zusammenhang der betrachteten Spermienparameter – vor allem der Motilität sowie der sog. Geschwindigkeitsparameter – und der Fertilität nach (FARRELL et al., 1998; CSEH et al., 2003; KATHIRAVAN et al., 2008; MOCE & GRAHAM, 2008; KUMAR et al., 2014; NAGY et al., 2015; MORRELL et al., 2017). Die Minderheit der Studien erzielte keine dahingehenden Resultate (BAILEY et al., 1994; GILLAN et al., 2008). Trotz der eindeutigeren Ergebnislage besteht dennoch Unklarheit, ob mit Hilfe des CASA-Systems gemessene Einzelparameter eine Vorhersage der Befruchtungsfähigkeit eines Ejakulats zulassen (NEHRING et al., 2005; KASTELIC & THUNDATHIL, 2008; SIMONIK et al., 2015). Die Kombination mehrerer Spermienparameter sowie verschiedener Messmethoden steigert jedenfalls die Vorhersagekraft einer Spermprobe um ein Vielfaches (FARRELL et al., 1998; JANUŠKAUSKAS & ŽILINSKAS, 2002; NEHRING et al., 2005; GILLAN et al., 2008; MOCE & GRAHAM, 2008; PUGLISI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; SELLEM et al., 2015).

Es bleibt also festzuhalten, dass die Routinemikroskopie auf Besamungsstationen lediglich

die Selektion von qualitätsgeminderten Spermaproben, jedoch keine Aussage über den späteren Befruchtungserfolg von Ejakulaten erlaubt (HOLT & VAN LOOK, 2004; NEHRING et al., 2005). Automatisierte objektive Messmethoden, wie die Analyse mittels CASA-System, haben dagegen das Potenzial, die Fertilität exakter vorherzusagen (FARRELL et al., 1998; KATHIRAVAN et al., 2011; NAGY et al., 2015). Von Relevanz ist dabei insbesondere die simultane Erfassung mehrerer Spermienparameter. Dies ist durch die Tatsache zu begründen, dass ein Spermatozoon als multikompartimentelle Zelle über mehrere Eigenschaften verfügen muss, um eine Eizelle erfolgreich befruchten zu können. Eine Methode, welche die Messung nur eines oder weniger Parameter inkludiert, reicht demnach nicht aus, um eine Vorhersage über die Fertilität treffen zu können (JANUŠKAUSKAS & ŽILINSKAS, 2002). Momentan scheint die objektive Analyse mehrerer Parameter und deren Kombination das präziseste Verfahren, die Befruchtungsfähigkeit eines Ejakulats zu prognostizieren (OLIVEIRA et al., 2013; SIMONIK et al., 2015). Jüngst werden hierfür vermehrt auch die mittels CASA-System messbaren Geschwindigkeitsparameter herangezogen (NAGY et al., 2015), deren positive Korrelation zur Fertilität sich größtenteils auch in humanmedizinischen Studien bestätigte (FETTEROLF & ROGERS, 1990; LIU et al., 1991; LARSEN et al., 2000; HIRANO et al., 2001).

2. Grundlagen der Veterinärakupunktur

2.1. Definition

Die Akupunktur ist eine empirisch begründete Behandlungsform der Traditionell Chinesischen Medizin (TCM) und der Traditionell Chinesischen Veterinärmedizin (TCVM). Beide Systeme sind eingebettet in ein jahrtausendealtes Denkmodell der chinesischen Kultur, auf dessen Basis sich verschiedene Therapiekonzepte entwickelt haben (LIANGYUE et al., 1987; XIE & PREAST, 2013a, 2013b). Neben Arzneimittel- und Ernährungstherapie, Massageverfahren und Bewegungsübungen – welche, bis auf letztere, bei Mensch und Tier angewendet werden – stellt die Akupunktur nur einen Teilbereich der Traditionell Chinesischen (Veterinär-)Medizin dar (SCHWARTZ, 2008; NI, 2011).

Die Methodik der Akupunktur spiegelt sich in der Bedeutung des Begriffes wider, der aus dem Lateinischen stammt (*acus* = Nadel; *pungere* = stechen) und das Stechen mit Nadeln an bestimmten Körperstellen, den sog. Akupunkturpunkten, bezeichnet (LIMEHOUSE & TAYLOR-LIMEHOUSE, 2009). Einen das lateinische Verständnis ergänzenden Definitionsansatz gibt Roger de la Fuye, der Begründer der französischen Akupunkturbewegung, mit folgender Beschreibung bezüglich Vorgehen und Anwendung: „Die Akupunktur

verwendet Einstiche mit Metallnadeln an genau festgelegten Hautpunkten, die spontan oder druckschmerzhaft sein können, bei funktionellen, reversiblen Erkrankungen oder Störungen zu diagnostischen und/oder therapeutischen Zwecken“ (BISCHKO, 1994). Während diese Begriffsbestimmung ausgehend vom lateinischen Wortursprung nur die Therapie mit Nadeln berücksichtigt, beinhaltet die chinesische Terminologie (*Zhen Jiu* = Stechen und Brennen) darüber hinaus die lokale Wärmeapplikation (WESTERMAYER, 2013). Bei dieser auch als Moxibustion bezeichneten Methode werden Akupunkturpunkte durch das Verbrennen von kleinen Mengen getrockneten Beifußkrauts (*Artemisia vulgaris*) erwärmt (STUX et al., 2008). Das Heilkraut wird hierbei entweder direkt auf der rasierten Haut (direkte Moxibustion) oder indirekt auf einem der Haut aufliegenden isolierenden Zwischenmedium (z. B. Salz, Ingwerscheibe) entzündet (indirekte Moxibustion). Neben der klassischen Behandlung mit Nadeln und Wärme umfasst die Bezeichnung Akupunktur nach heutigem Verständnis auch moderne Reizverfahren, wie z. B. Laserakupunktur (Bestrahlung mit Licht), Elektrische Stimulations- und Sonoakupunktur (Stimulation mit Strom bzw. Ultraschall) oder Injektionsakupunktur (Injektion von Lösungen oder Arzneimitteln) (ALTMAN, 2009).

Bezüglich der Lokalisation und Anordnung von Akupunkturpunkten unterscheidet man die Traditionell Chinesische Körper- sowie die insbesondere vom Westen entwickelte Mikrosystemakupunktur. Die Körperakupunktur basiert auf einem System von Kanälen, den sog. Leitbahnen bzw. Meridianen, welche die einzelnen Akupunkturpunkte funktionell miteinander verbinden. Der Mikrosystemakupunktur hingegen liegt das Prinzip zugrunde, dass der ganze Organismus oder Teile davon mit speziellen Hautarealen, den Mikrosystemen, in reflektorischer Verbindung stehen und auf diese projiziert werden (GLEDITSCH, 2002). Das heutzutage bekannteste und am häufigsten angewandte Mikrosystem ist das Somatotop der Ohrmuschel, das den gesamten Körper repräsentiert (NOGIER, 1980; AMBRONN et al., 2001). Die zwei dargestellten Akupunkturkonzepte finden sowohl beim Menschen wie auch beim Tier Anwendung, wenn auch die Existenz von Meridianen beim Tier tiefergehenden Erläuterungen bedarf und daher im folgenden Kapitel im Kontext des historischen Abrisses behandelt wird.

2.2. Historischer Überblick

Im Gegensatz zur Humanakupunktur ist die Geschichte der Veterinärakupunktur verhältnismäßig wenig untersucht. Es finden sich nur vereinzelt englisch- oder deutschsprachige Publikationen, welche die historischen Zusammenhänge der Tierakupunktur aufarbeiten;

diese liefern zudem widersprüchliche Angaben zur Entstehungszeit in China. So postulieren einige Autoren eine mit der Domestizierung der Tiere einhergehende Entwicklung der Veterinärakupunktur und begründen deren Anfänge auf mehrere Jahrhunderte v. Chr. (JOECHLE, 1978; JAGGAR, 1992; ROBINSON, 2007). Dabei beziehen sie sich insbesondere auf mündlich überlieferte Legenden oder Steingemälde und -skulpturen aus dieser Zeit. Andere wiederum monieren diese aus ihrer Sicht spekulativ gedeuteten und fehlinterpretierten Anhaltspunkte und insistieren auf einem mehrere Jahrhunderte n. Chr. datierten Beginn der Tierakupunktur (IMRIE et al., 2001; RAMEY & BUELL, 2004). Ungeachtet dieser Diskussion um die exakten frühzeitlichen Ursprünge finden sich jedenfalls erste tatsächliche Hinweise auf Akupunktur bei Tieren im Titel eines in der Bibliographie der Sui-Dynastie (581–618) gelisteten, jedoch nicht überlieferten chinesischen Werkes („*Ma jing kong xue tu*“, dt.: Atlas der Meridiane und Akupunkturpunkte beim Pferd) (DESPEUX, 1981; KLIDE & KUNG, 1986). Während der folgenden Jahrhunderte wurden zahlreiche weitere Schriften veröffentlicht (KROKOWSKI & FATRAI, 2007); beispielhaft sind folgende Quellen zu nennen: „*Qi-min Yao Shu*“, dt.: Grundlegende Techniken für Bauern (~6. Jh.), enthält Auflistung zahlreicher Akupunkturbehandlungen für Tiere; „*Fan-mu Cuan-yan Fang*“, dt.: Erprobte Heilmittel der Nomaden (~960–1279), enthält Anhang zur Veterinärakupunktur; „*Quian Ji Tong-xuan Lun*“, dt.: Dissertation über die Behandlung kranker Pferde (~1279–1368), beschreibt die Behandlung von Pferden mit Akupunktur und Moxibustion (JAGGAR & ROBINSON, 2008). Mit dem Erscheinen des in der historischen Entwicklung der Veterinärmedizin bedeutenden „Pferdeklassikers“ („*Yuan Heng liao ma ji*“) Anfang des 17. Jh. (KLIDE & KUNG, 1986; JAGGAR & ROBINSON, 2008) erlebte die Veterinärakupunktur in China eine erste Blütezeit. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass die medizinische Versorgung zu jener Zeit lediglich Nutztieren vorbehalten war, die vor allem als Kriegs- oder Lasttiere dienten. Insbesondere Ausführungen zum Pferd nehmen daher in der damaligen Literatur eine dominante Stellung ein; aber auch die Behandlung von Wiederkäuern und Geflügel war von Bedeutung (DESPEUX, 1981). Zu betonen ist außerdem die Tatsache, dass die Akupunkturpunkte damals keinem Meridian-Konzept unterlagen, wie es seinerzeit in der Humanakupunktur existierte (DESPEUX, 1981; KLIDE & KUNG, 1986; KOTHBAUER & MENG, 1990; HEERDE, 1999; ROBINSON, 2006), sondern ohne Leitbahnbezug isoliert oder geordnet nach Körperregionen verwendet wurden (HEERDE, 1999) (siehe Abbildung 1). Die Urheber des „Pferdeklassikers“ bekräftigten sogar, dass der Behandlung am Tier nicht das humanmedizinische System zugrunde liegt und distanzieren sich ausdrücklich von diesem (RAMEY &

BUELL, 2004). Zur Begründung bezogen sie sich auf die im Konfuzianismus obligatorische Abgrenzungsdogmatik, wonach der Mensch als „göttliches Wesen“, das Tier hingegen als „Sachgegenstand“ einzustufen ist (DESPEUX, 1981).

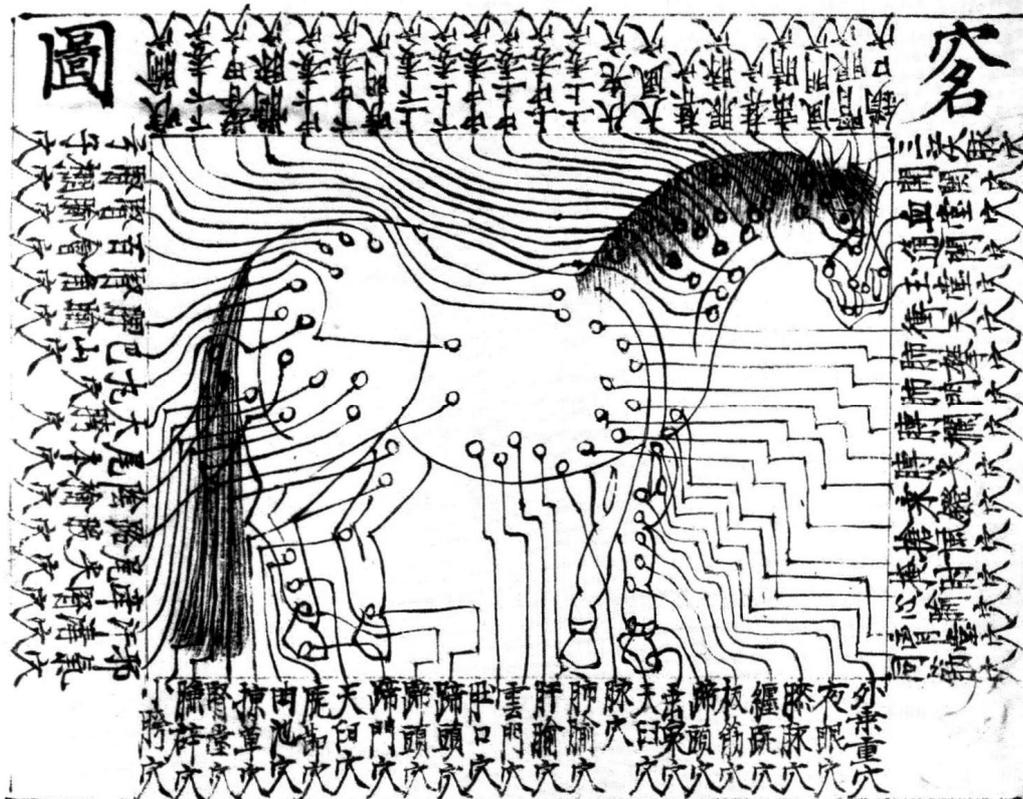


Abbildung 1: Originalaufzeichnung einer Akupunkturtafel des Pferdes aus dem 17. Jh. mit Punkt-Nomenklatur in chinesischer Schrift (HEERDE, 1999)

Darstellung des historischen Akupunktursystems am Beispiel des Pferdes. Im Gegensatz zum humanmedizinischen Konzept liegen die Akupunkturpunkte ungeordnet und ohne Leitbahnbezug vor.

Der „Pferdeklassiker“ und verwandte Werke aus dem frühen 17. Jh. (z. B. „*Ma Shu*“, dt.: Das Buch der Pferde (1594), enthält ein Kapitel zu Akupunktur; „*Zhenjiu Dacheng*“, dt.: Kompendium der Akupunktur und Moxibustion (1601), humanmedizinischer Text mit Einfluss auf die Veterinärakupunktur) markieren die letzten großen Fortschritte der Tierakupunktur in China (JAGGAR & ROBINSON, 2008), deren Entwicklung während der frühen Qing-Dynastie (1644–1840) größtenteils stagnierte und daher nur durch eine geringe Anzahl von Publikationen dokumentiert ist (EUL-MATERN, 2014). Beispielhaft sind folgende Quellen anzuführen: „*Yang Gen Ji*“, dt.: Anthrologie der Tierproduktion und Agrarwissenschaft (~1644–1840), enthält Details über Akupunktur und Moxibustion bei Rindern; „*Niu-yi Jin Han*“, dt.: Goldener Führer der Rinderkrankheiten (1644–1840), enthält 35 Akupunkturpunkte (JAGGAR & ROBINSON, 2008). Während der späten Qing-

Periode (1840–1911) erfuhr die Entwicklung der Akupunktur – sowohl im human- als auch im tiermedizinischen Bereich – schließlich zunehmend eine Unterdrückung (JAGGAR & ROBINSON, 2008). Wegen politischer und wirtschaftlicher Umstrukturierungen zur Zeit der „Opium-Kriege“ (1839–1860) sowie aufgrund des wachsenden Einflusses der westlichen Medizin rückte die TC(V)M für mehrere Jahrzehnte in den Hintergrund. Erst ab etwa 1949 wurde unter der Herrschaft Mao Zedongs die Traditionell Chinesische Medizin und damit auch die Akupunkturbehandlung bei Tieren wieder gefördert und praktiziert (KOTHBAUER & MENG, 1990).

In der zweiten Hälfte des 20. Jh. lässt sich eine unterschiedliche Entwicklung der Veterinärakupunktur in China und der westlichen Welt erkennen. Während in China am Tier weiterhin die Traditionell Chinesische Veterinärakupunktur praktiziert wurde, konstituierte sich in Europa und Amerika ein sog. „transpositionelles System“. Dessen Ursprünge finden sich in den 1980er Jahren, als amerikanische Tierärzte das in ihren Augen rudimentäre, uneinheitliche und schwer zu erlernende chinesische Konzept zu modifizieren begannen. Bislang existierende, isoliert vorliegende Punkte am Tier (v. a. Nutztier; siehe Abbildung 1) wurden durch das für den Menschen bestehende einheitliche Meridian- und Punktekonzept ersetzt. Akupunkturtafeln für Hund und Katze, die zu dieser Zeit in China gar nicht existierten, wurden gänzlich neu konzipiert (RAMEY, 2000; RAMEY & BUELL, 2004; ROBINSON, 2007; BRUNO et al., 2015). In China stieß diese Transkription zum Teil auf starke Ablehnung und wurde als „Humanakupunktur-Fassade“ diskreditiert (HEERDE, 1999). Auch im Westen blieb das transponierte System zunächst nicht unangefochten. Neben der Anzweiflung der Existenz von Meridianen beim Tier stellten Kritiker vor allem die unterschiedliche Anatomie von Mensch und Tier und die damit einhergehenden Unstimmigkeiten hinsichtlich der Punktübertragung zur Debatte (FLEMING, 2009). Insbesondere die unterschiedliche Anzahl der Zehen und Wirbel der verschiedenen Tierarten stand im Zentrum der Kritik (ROBINSON, 2006). Nichtsdestotrotz hat sich das transpositionelle Akupunktursystem mittlerweile fest im Westen etabliert und bildet die Basis der wissenschaftlichen Forschung. Auch die internationale Akupunkturgesellschaft (*IVAS: International Veterinary Acupuncture Society*) sowie deren nationale Untergruppierungen legen dieses Konzept ihrer Lehre und Ausbildung zugrunde. Standardwerke der westlichen Veterinärakupunktur enthalten inzwischen transponierte Punktetafeln aller konventionellen Haustierarten (Pferd, Rind, Geflügel, Hund, Katze) (SCHOEN, 2008; DRAEHMPAEHL & ZOHMANN, 2009). Aufgrund der Vielzahl an Tierspezies, die heutzutage eine medizinische Versorgung erfährt, stellt die Punktekartierung allerdings kein

abgeschlossenes Geschehen, sondern einen fortdauernden Prozess dar, wie Veröffentlichungen verschiedener Transpositionsversuche zeigen (CLEMMONS-CHEVIS, 2007; KROKOWSKI & FATRAI, 2007; YIN et al., 2008; KOO et al., 2010).

2.3. Philosophischer Hintergrund und traditionelle Konzepte der TCVM

Die Traditionell Chinesische (Veterinär-)Medizin stellt eine Jahrtausende alte Heilkunst dar, welche im zeitlichen sowie theoretischen Zusammenhang unterschiedlicher philosophischer Strömungen in China entstand. Ihre Inhalte beruhen demnach auf komplexen Denkmodellen des Konfuzianismus, Buddhismus und Taoismus (THEWS & FRITZ, 2011), deren wesentliche Begrifflichkeiten an dieser Stelle eingeführt und in Zusammenhang gebracht werden sollen.

In der TC(V)M steht, im Gegensatz zur westlichen Medizin, die energetische Einordnung von Gesundheit und Krankheit im Vordergrund (WASKOWIAK, 2005). Wohlbefinden und Stabilität beruhen hiernach auf einem energetischen Gleichgewicht, was auf ein harmonisches Zusammenspiel des Körpers und seiner Umwelt zurückzuführen ist. Sowohl im Mikro- (Körper) als auch im Makrokosmos (Universum) formt sich ein solches Gleichgewicht durch Abstoßung und gleichzeitige Abhängigkeit gegensätzlicher Kräfte, welche als *Yin* und *Yang* bezeichnet werden (LIMEHOUSE & TAYLOR-LIMEHOUSE, 2009). Alle organischen Strukturen und physiologischen Funktionen des Körpers sowie sämtliche Ereignisse und Daseinszustände der gesamten Umwelt können *Yin* und *Yang* zugeordnet werden (LIANGYUE et al., 1987). Im Spannungsfeld des Körpers zwischen den Polen von *Yin* und *Yang* fließt das sog. *Qi*, welches die dem gesamten Kosmos zugrunde liegende „Lebenskraft“ symbolisiert. Es ist Grundlage aller Existenzvorgänge im Körper und somit verantwortlich für sämtliche Organfunktionen (FOCKS et al., 2010). *Qi* wird dem Organismus durch die Aufnahme aus verschiedenen Energiequellen (z. B. Nahrung, Atemluft) zugeführt, durch Transformation für den Körper zugänglich gemacht und gleichmäßig auf alle Organe, Gefäße und Meridiane (siehe Kap. II.2.1.) verteilt (KLEBER, 1989).

Während in der Traditionell Chinesischen Veterinärakupunktur – wie im vorherigen Kapitel dargestellt – keine Meridiane existieren, sieht das humanmedizinische sowie das davon abgeleitete transpositionelle veterinärmedizinische Akupunktursystem zwölf Haupt- sowie acht Sonderleitbahnen vor (STUX et al., 2007; LIMEHOUSE & TAYLOR-LIMEHOUSE, 2009). Die Hauptleitbahnen, auf denen sich die meistverwendeten Akupunkturpunkte befinden, liegen paarig und spiegelbildlich zur Körpermitte (EUL-MATERN, 2014). Man unterscheidet *Yin*- und *Yang*-Meridiane, wobei die *Yin*-Meridiane an der Innen- bzw.

Ventralseite und die *Yang*-Meridiane an der Außen- bzw. Dorsalseite des Körpers verlaufen. Vier Meridiane, bestehend aus zwei *Yin*- sowie zwei *Yang*-Meridianen, bilden einen sog. Meridianumlauf (STUX et al., 2007). Die Sonderleitbahnen verkörpern überdies weitere Energiebahnen, die größtenteils Punkte der Hauptleitbahnen integrieren. Lediglich das Lenker- sowie das Konzeptionsgefäß, welche in der dorsalen und ventralen Medianlinie des Körpers verlaufen, verfügen über eigene Punkte; ihnen wird daher eine besondere Bedeutung beigemessen (KAMPIK, 1998). Eine schematische Darstellung des transpositionellen Meridiansystems findet sich in Abbildung 2 am Beispiel des Hundes. Eine Zusammenstellung inklusive Nomenklatur, gängiger Abkürzungen und Punktzahl pro Leitbahn ist Tabelle 2 zu entnehmen.

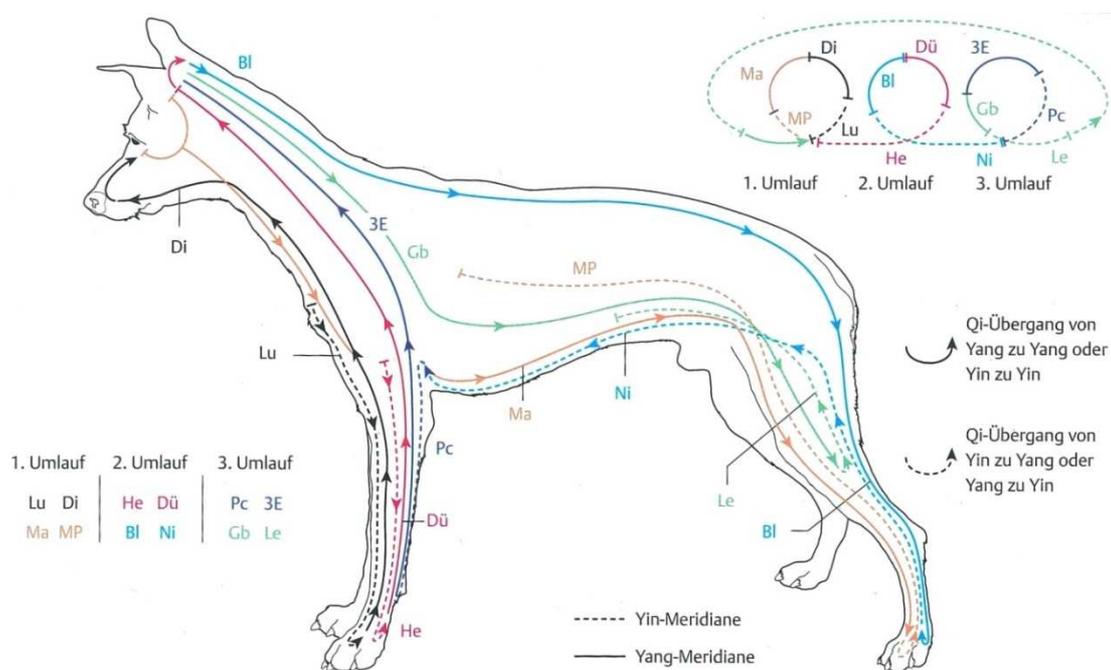


Abbildung 2: Hauptleitbahnen beim Hund (mod. nach EUL-MATERN, 2014)

Darstellung der Hauptleitbahnen beim Hund, geordnet nach Umläufen; vgl. Tabelle 2. Abk.: Bl: Blase; Di: Dickdarm; Dü: Dünndarm; Gb: Gallenblase; He: Herz; Le: Leber; Lu: Lunge; Ma: Magen; MP: Milz; Ni: Niere; Pc: Perikard; 3E: 3-Erwärmer

Tabelle 2: Das Meridiansystem (Inhalte aus EUL-MATERN, 2014)

Auflistung der zwölf Haupt- sowie der zwei wichtigsten Sondermeridiane und ihrer gängigen Abkürzungen. Jeder Meridian weist entweder *Yin*- oder *Yang*-Qualität auf und verfügt über eine bestimmte Anzahl an Akupunkturpunkten. Vier Hauptmeridiane bilden einen sog. Meridianumlauf.

	Meridianbezeichnung	gängige Abkürzung	Yin/Yang	Anzahl der Punkte
← 1. Umlauf	Lunge	Lu	Yin	11
	Dickdarm	Di	Yang	20
	Magen	Ma	Yang	45
	Milz	MP	Yin	21
← 2. Umlauf	Herz	He	Yin	9
	Dünndarm	Dü	Yang	19
	Blase	Bl	Yang	67
	Niere	Ni	Yin	27
← 3. Umlauf	Perikard	Pc	Yin	9
	3-Erwärmer ³	3E	Yang	23
	Gallenblase	Gb	Yang	44
	Leber	Le	Yin	14
SM	Lenkergesäß	Lg	Yang	28
	Konzeptionsgefäß	Kg	Yin	24

Abk.: SM: Sondermeridiane

Jede Hauptleitbahn ist funktionell mit einem der zwölf sog. „Zang-Fu-Organen“ gekoppelt und entsprechend nach diesem benannt (EUL-MATERN, 2014). Anders als nach westlichem Verständnis umfasst in der TC(V)M jedes „Organ“ neben Körperfunktionen auch Gewebe, Sinnesorgane, Umwelteinflüsse, Emotionen und psychische Aktivitäten, sodass man von einem sog. „Funktionskreis“ spricht (FOCKS et al., 2010). Jeder „Funktionskreis“ wiederum ist einem Symbol der „5 Wandlungsphasen“ zugewiesen (LIANGYUE et al., 1987). Die Theorie der „5 Wandlungsphasen“ repräsentiert ein Entsprechungssystem, bei dem kosmische, anatomische, physiologische und psychische Erscheinungen den Elementen Holz, Feuer, Erde, Metall und Wasser zugeordnet werden (KAMPIK, 1998). Diese Elemente und ihre Entsprechungen beschreiben demnach die Phänomene der Natur,

³ Das Organ 3-Erwärmer besitzt in der westlichen Medizin keine anatomische Entsprechung und stellt eine funktionelle Einheit der drei Körperhöhlen Thorax, Abdomen und Becken dar (STUX et al., 2007).

bringen Erde und Universum in Zusammenhang und berücksichtigen die Einheit von Körper, Seele und Geist. Dabei stehen sie in gegenseitiger Wechselwirkung und unterliegen einem sich energetisch fördernden und kontrollierenden Zyklus, der alle periodischen Prozesse des Lebens widerspiegelt (PLATSCH, 2014).

Das Denkmodell der „5 Wandlungsphasen“ sowie die Theorie von *Qi* und *Yin* und *Yang* stellen die Basis der Pathologie und Diagnostik der TC(V)M dar, indem sich Krankheitszustände oder -prozesse durch Störungen dieser Systeme äußern und entsprechend erkannt werden können (LIMEHOUSE & TAYLOR-LIMEHOUSE, 2009). Das therapeutische Ziel der Akupunktur liegt in einer Behebung dieser Störungen durch einen Ausgleich von Dysbalancen und einer Harmonisierung der Lebenskräfte (STUX et al., 2007). Durch Reizung von speziellen Akupunkturpunkten kann Einfluss auf die Eigenregulation des Körpers genommen und somit ein energetisches Gleichgewicht in Organen und Meridianen hergestellt werden (STEINMETZ, 2014).

3. Veterinärakupunktur bei andrologischen Funktionsstörungen

3.1. Traditionelle Grundlagen therapeutischer Akupunkturansätze

Nach traditionell chinesischer Vorstellung werden die Genitalorgane und ihre Funktion dem Nierensystem zugesprochen (STUX et al., 2007). Dieses befindet sich, wie auch nach schulmedizinischem Verständnis, im kaudalen Abdomen des Körpers. Speichersubstanz der Nieren ist die Essenz (*Jing*), die sowohl *Yin*- als auch *Yang*-Aspekte impliziert und sich aus vor- und nachgeburtlichen Anteilen zusammensetzt. Während die vorgeburtliche Essenz dem Fetus bei der Empfängnis vererbt wird, wird die nachgeburtliche Essenz kontinuierlich aus der Nahrung aufgenommen und transformiert. Beide *Jing*-Formen bilden die Grundlage aller körperlichen Substanzen und sind verantwortlich für das Wachstum, die Entwicklung und die Fortpflanzung eines Individuums (FOCKS et al., 2010).

Urogenitalen Erkrankungen und Funktionsstörungen beim Mann/männlichen Tier liegt im Umkehrschluss eine Schwächung der Nierenfunktion zugrunde, was auf sexuelle Überbeanspruchung, konstitutionelle Schwäche oder ein *Qi*-Defizit zurückzuführen sein kann (STUX et al., 2007; TIANDONG & XIANXUN, 2007). Der damit einhergehende Essenzverlust resultiert in einem Nieren-*Yin*- oder -*Yang*-Mangel, dessen Manifestation sich negativ auf die Spermienqualität auswirken kann. So kann ein Nieren-*Yin*-Mangel zur Austrocknung und somit zu einem mengenmäßig geringen, zähflüssigen Ejakulat mit niedriger Spermienzahl führen. Ein Nieren-*Yang*-Mangel hingegen bedingt gegebenenfalls Spermien mit mangelhafter Motilität in wässrigem Ejakulat (HEMM, 2008).

Diese Grundlagen berücksichtigend beinhaltet der Therapieansatz der Akupunktur zum einen die Stärkung der Nieren und das Wiederauffüllen der Essenz (TIANDONG & XIANXUN, 2007), zum anderen eine Regulierung des Nieren-*Yins* bzw. -*Yangs*. Hierfür sind insbesondere Punkte des Konzeptionsgefäßes sowie des Nieren- und Blasenmeridians angezeigt (LIANGYUE et al., 1987). Darüber hinaus stellt die Ohrakupunktur eine sinnvolle Ergänzung dar. Bei vorliegendem Nieren-*Yang*-Mangel ist zudem eine Moxibustions-Therapie indiziert (STELTING, 2008) (siehe Kap. II.2.1.).

Die in Kapitel I.2.3. vorgestellten und an dieser Stelle konkret auf einen Krankheitsbereich (andrologische Störungen) übertragenen energetischen Denkmodelle der Traditionell Chinesischen Medizin beruhen auf einem empirischen Wissenskonglomerat, das sich über mehrere Jahrtausende hinweg entwickelt hat (CHEUNG, 2011). Jedoch werden auf diesen Theorien basierende Akupunkturkonzepte und deren Wirkung auf spezielle Krankheitsbilder seit einigen Jahrzehnten zunehmend auch wissenschaftlich erforscht. Studien, die den Einfluss von Akupunktur bei andrologischen Erkrankungen untersuchen, wurden erstmals in den 1980er Jahren durchgeführt (siehe Folgekapitel).

3.2. Einsatz von Akupunktur in der Andrologie

Der Einfluss von Akupunktur auf die Spermienqualität beim Bullen wurde erstmalig von Kothbauer, dem Mitbegründer der westlich-wissenschaftlichen Veterinärakupunktur, oberflächlich beschrieben. In einer Einzelfallbehandlung im Jahr 1975 unterzog er einen Zuchtstier mit „unbrauchbaren“ Ejakulaten aufgrund entzündlicher Veränderungen der akzessorischen Geschlechtsdrüsen einer Akupunkturbehandlung. Der Bulle erhielt in wöchentlichen Abständen fünf Akupunktur- und Moxibustionseinheiten an sieben verschiedenen Punkten (Bl 22, 31; Lg 2, 3, 4; Kg 2, 6; Abkürzungsverzeichnis der Akupunkturpunkte siehe Tabelle 2). Bis zu drei Tage nach den einzelnen Behandlungen wurden „brauchbare Ejakulate“ gewonnen; nähere Angaben zu einzelnen spermatologischen Parametern wurden nicht gemacht. Weitere Akupunkturanwendungen zeigten keinen vergleichbaren Effekt. Eine anschließende pathologisch-histologische Untersuchung des Bullen befundete nekrotische Prozesse der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, die nicht weiter interpretiert worden sind (KOTHBAUER & MENG, 1983).

Detailliertere Beschreibungen zur Verbesserung einzelner Ejakulatqualitätsparameter durch Akupunktur liefert eine Untersuchung an drei Bullen aus dem Jahr 1986. Betrachtet wurden Dichte, Motilität (vorwärts-, orts- und unbewegliche Spermien), Vitalität (lebende

und tote Spermien) und Transmigrationsrate⁴ der Spermien; Angaben bezüglich des Vorliegens eines andrologischen Krankheitsbildes der Tiere liegen nicht vor. Die Bullen wurden zehnmal an neun Akupunkturpunkten (Bl 23, 31; Kg 3, 6; Lg 20; Ma 30, 36; MP 6; Le 8) behandelt, wobei vier Punkte (Bl 23, 31; Ma 36; MP 6) zusätzlich elektrisch stimuliert wurden. Während der Interventionsphase wurde bei den Bullen im Gesamtdurchschnitt ein Anstieg des Anteils der vorwärtsbeweglichen Spermien um 20 % ($p = 0,002$), eine Erhöhung der Transmigrationsrate um 10 % ($p = 0,004$) sowie ein Abfall des Anteils der toten Samenzellen um 10 % ($p = 0,04$) verzeichnet. Die restlichen untersuchten Parameter veränderten sich nicht (HOLZMANN, 1986).

Die aktuellsten Publikationen, die Akupunktur in Zusammenhang mit andrologischen Funktionsstörungen des Bullen untersuchen, stammen aus den Jahren 2006 und 2009. Sechs Tiere mit verminderter durchschnittlicher Spermiedichte (< 1 Mrd./ml) und/oder vermindertem mittlerem Ejakulatvolumen (< 3 ml) (ARLT et al., 2006) bzw. ein Bulle mit vorliegendem Libidomangel (ARLT & HEUWIESER, 2009) wurden während eines Zeitraums von drei bzw. sieben Wochen therapiert. Beschrieben werden in beiden Fällen Akupunktur- und Moxibustionsbehandlungen mit einem einheitlichen Punkteschema (Bl 23, 31; Lg 3, 4; Ni 3). Zielparameter waren in beiden Untersuchungen das Ejakulatvolumen, die Spermiedichte und die -motilität sowie in der Einzelfalluntersuchung zusätzlich die Libido, die sich jeweils bei keinem der Tiere signifikant verbesserten.

Neben den vorgestellten Untersuchungen am Bullen lassen sich entsprechende auch für andere Tierarten finden. In einer lückenhaft dargestellten Studie an vier Ebern (keine Angabe zum Vorliegen eines andrologischen Krankheitsbildes) wurde der Einfluss von Akupunktur an den Punkten Bl 23 und Lg 20 auf die Samenqualitätsparameter Dichte und Motilität sowie den Prozentanteil pathologisch veränderter Spermien analysiert. Nach neun Behandlungen innerhalb von drei Wochen war kein signifikanter Anstieg der gemessenen Parameter zu erkennen. Die Autoren beschreiben lediglich eine „tendenzielle Zunahme“ der Gesamtspermienzahl, differenzieren jedoch nicht, ob diese bei allen oder nur einzelnen Tieren zu erkennen war (CHAN et al., 1990).

Ein kursorischer Fallbericht über einen Araberhengst mit „vorwiegend toten Spermien“ im Ejakulat – der Autor führt hier keinen Prozentsatz an – beschreibt die Akupunkturbehandlung mit verschiedenen Stimulationsverfahren. Aufgrund des zunächst ausbleibenden Erfolgs einer Nadel- und Moxibustionsbehandlung an den Punkten Bl 22

⁴ Anteil der progressiv beweglichen Spermien, die sich aktiv gegen eine Strömung bewegen können.

und MP 6 wurden die darauffolgenden Behandlungen um die Punkte Lg 16 und 3E 22 ergänzt, welche durch Injektion von *Echinacea compositum forte* und Zuführung von elektrischem Strom zusätzlich stimuliert wurden. Der Anteil der toten Spermien sank daraufhin „um 25 %“. Genauere Informationen stehen von Seiten des Autors nicht zur Verfügung (KOTHBAUER, 2005).

Des Weiteren findet sich eine rezente, randomisiert kontrolliert durchgeführte Studie aus China (in Form eines Abstracts in englischer Sprache), welche die Wirkung von Elektroakupunktur an Ratten untersucht. Spermiedichte, -lebensfähigkeit, -motilität und Anzahl der A- und B-Spermien⁵ wurden mithilfe eines CASA-Systems analysiert. 105 Tiere, bei denen durch Ornidazol-Gabe (tägliche Substituierung von 400mg/kg während des gesamten Studienzeitraums) erfolgreich eine Asthenozoospermie⁶ provoziert wurde, wurden in jeweils vier Behandlungs- (n = 34), Kontroll- (n = 36) und Modellgruppen (n = 35) aufgeteilt. Die vier Behandlungsgruppen (BG) wurden mit unterschiedlichen Stromstärken (2 oder 100 Hz) zu unterschiedlichen Behandlungszeiträumen (drei, fünf oder neun Tage) und -intervallen (täglich oder jeden zweiten Tag) an den Punkten Bl 23 und Ma 36 stimuliert. Die Kontrollgruppen (KG) erhielten jeweils dasselbe Therapieschema wie die zugehörigen BG, erfuhren jedoch keine elektrische Stimulation; die entsprechenden Modellgruppen (MG) erhielten keinerlei Intervention. Bei Tieren, die lediglich über drei Tage hinweg behandelt wurden (2 Hz, drei Tage, täglich), war weder im Vergleich zur KG noch im Vergleich zur MG ein signifikanter Anstieg eines der untersuchten Parameter zu erkennen ($p > 0,05$). Tiere, die dagegen mindestens fünf Tage lang therapiert wurden, wiesen nach der Akupunktur, verglichen mit der entsprechenden KG und MG, eine signifikante Verbesserung einzelner oder aller Messgrößen auf (siehe Tabelle 3). Die Spermiedichte blieb in allen Fällen unbeeinflusst (JIN et al., 2017).

⁵ A-Spermien: schnell progressive Spermien; B-Spermien: langsam progressive Spermien (COOPER & YEUNG, 2006).

⁶ Spermien mit verminderter Motilität (siehe auch Tabelle 1).

Tabelle 3: Darstellung der Verbesserung der Spermienqualität nach Elektroakupunktur am Rattenmodell (Inhalte aus JIN et al., 2017)

Dargestellt ist jeweils die Verbesserung der einzelnen Spermienparameter, die die Behandlungsgruppe nach Elektroakupunktur gegenüber der Modell- und der Kontrollgruppe aufwies. Parameter, die keinen Anstieg gegenüber der Modell- oder der Kontrollgruppe erfuhren, sind nicht aufgeführt.

Behandlungsgruppe	Anstieg gegenüber Modellgruppe	Anstieg gegenüber Kontrollgruppe
2 Hz, drei Tage, täglich	-	-
2 Hz, fünf Tage, jeden zweiten Tag	Lebensfähigkeit, Motilität, A- und B-Spermien (p < 0,05)	A- und B-Spermien (p < 0,05)
2 Hz, neun Tage, jeden zweiten Tag	Lebensfähigkeit, Motilität, A- und B-Spermien (p < 0,001)	Lebensfähigkeit, Motilität, A- und B-Spermien (p < 0,001)
100 Hz, neun Tage, jeden zweiten Tag	Lebensfähigkeit, Motilität (p < 0,001), A- und B-Spermien (p < 0,01)	Lebensfähigkeit (p < 0,05), Motilität, A- und B-Spermien (p < 0,01)

Abk.: Hz: Hertz

Im Gegensatz zur Tiermedizin existieren im Bereich der Humanmedizin deutlich mehr experimentelle Studien, die den Einfluss von Akupunktur auf die Spermienqualität untersuchen. Auch einige zu dieser Thematik veröffentlichte Reviews (CRIMMEL et al., 2001; SEYBOLD, 2004; NG et al., 2008; FRANCONI et al., 2011; GAO et al., 2014; JERNG et al., 2014; QU et al., 2017) sowie Einzelfallberichte (SHEALY et al., 1990; CLAICI, 2008; BIDOUEE et al., 2011; STÉPHAN, 2012) spiegeln das Forschungsinteresse auf diesem Gebiet wider. Nichtsdestotrotz ist dieses im Vergleich zu anderen Themenbereichen, wie z. B. der Schmerzmedizin, als eher gering anzusehen; so finden sich in den Datenbanken „pubmed“, „embase“ und „google scholar“ bislang 13 klinische Studien aus dem andrologischen Bereich. Eine Übersicht ist den Tabellen 4 und 5 am Ende dieses Kapitels zu entnehmen.

Unter den 13 Arbeiten finden sich sechs kontrollierte (vier randomisiert kontrollierte Studien, zwei kontrollierte Kohortenstudien) und sieben nicht-kontrollierte Studien (sechs Kohortenstudien, eine Fallserie). Die Untersuchungen stammen aus dem europäischen, dem asiatischen und dem mittelamerikanischen Raum und wurden im Zeitraum von 1984 bis 2016 publiziert. Die Fallzahl der Studien liegt zwischen 12 und 57 Patienten, die aufgrund folgender Indikationen im Durchschnitt 17-mal (Min: 10, Max: 45) an zehn Akupunkturpunkten (Min: 3, Max: 16) behandelt wurden: Oligozoospermie⁷ und/oder

⁷ Verminderte Anzahl von Spermien im Ejakulat.

Asthenozoospermie⁸ und/oder Teratozoospermie⁹. Siterman et al. (2000) untersuchten überdies Patienten mit Azoospermie¹⁰. In beinahe der Hälfte der Studien (6/13, 46,2 %) wurde reine Nadelakupunktur angewandt; daneben auch Nadelakupunktur in Kombination mit Moxibustion (4/13, 30,8 %), Elektroakupunktur (2/13, 15,4 %) sowie Elektroakupunktur in Kombination mit Moxibustion (1/13, 7,7 %). Als Kontrollintervention wurde entweder keine Behandlung (3/6, 50 %), Akupunktur und Moxibustion an nicht therapeutischen Punkten (1/6, 16,7 %) oder *Sham* (Schein)-Akupunktur mit Streitberger-Nadeln¹¹ (1/6, 16,7 %) durchgeführt. Kucuk et al. (2016) verglichen indes Elektroakupunktur mit einem operativen Eingriff an Varikozele-Patienten. Insgesamt ist festzustellen, dass nur zwei Studien die Spermatogenesedauer des Menschen bei der Auswahl der Messzeitpunkte im Nachuntersuchungszeitraum berücksichtigten (DIETERLE et al., 2009; KUCUK et al., 2016). Die in den Studien am häufigsten untersuchten spermatologischen Basisparameter stellen die Ejakulatdichte, die Spermienmotilität sowie die Spermienmorphologie dar; darüber hinaus erhobene Parameter sind in Tabelle 4 in der Spalte „Sonstiges“ gelistet.

Die Ejakulatdichte war Gegenstand aller Untersuchungen. Drei von sechs kontrollierten Studien verzeichneten einen signifikanten Anstieg der Dichte nach Akupunkturbehandlung in der BG und/oder der KG: Siterman et al. (2000) wiesen in der BG (Akupunktur) eine signifikante Zunahme der Dichte bei 7 von 15 Azoospermie-Patienten nach ($p \leq 0,01$); die KG (keine Behandlung) blieb unbeeinflusst. Kucuk et al. (2016) registrierten sowohl in der BG (Elektroakupunktur) als auch in der KG (operative Behebung der Varikozele) einen signifikanten Anstieg der Dichte (BG: $p = 0,004$; KG: $p = 0,045$). In der Untersuchung von Dieterle et al. (2009) veränderte sich die Dichte bei Patienten der BG (Akupunktur) nicht, jedoch erhöhte sich diese signifikant bei den Patienten der KG (*Sham*-Akupunktur mit Streitberger-Nadeln) ($p = 0,018$). Hinsichtlich der nicht-kontrollierten Studien wurde eine signifikante Zunahme der Spermiedichte in vier von sieben Untersuchungen erreicht: $p < 0,01$ (FISCHL et al., 1984); $p < 0,01$ (MING-HUA, 2005); $p < 0,05$ (ZHEN-BEI, 2005); $p < 0,05$ (HE et al., 2011).

⁸ Vermehrtes Auftreten von Spermien mit verminderter Beweglichkeit im Ejakulat.

⁹ Vermehrtes Auftreten pathologischer Spermien im Ejakulat.

¹⁰ Vollständiges Fehlen von Spermien im Ejakulat.

¹¹ Placebo-Akupunkturadel mit stumpfer Spitze, die sich bei Berührung der Haut teleskopartig ineinander verschiebt, ohne die Haut zu penetrieren. Zur Fixierung der Nadel dient ein auf der Haut angebrachtes Klebepflaster. Diese Konstruktion suggeriert dem Patienten somit einen (nicht stattfindenden) Einstich und ein Eindringen der Nadel in die Haut (STREITBERGER & KLEINHENZ, 1998).

Die Spermienmotilität wurde in zwölf (5/6 kontrollierten, 7/7 nicht-kontrollierten) Studien analysiert. Drei der kontrollierten Studien zeigten einen signifikanten Anstieg des Anteils der beweglichen Spermien in der BG (Akupunktur), nicht aber in der KG (keine Behandlung bzw. *Sham*-Akupunktur): $p \leq 0,05$ (SITERMAN et al., 1997); $p = 0,017$ (PEI et al., 2005); $p = 0,035$ (DIETERLE et al., 2009). In der Untersuchung von Kucuk et al. (2016) stieg der Prozentsatz der beweglichen Spermien in beiden Gruppen signifikant an (BG: $p = 0,028$; KG: $p = 0,015$). Bezüglich der nicht-kontrollierten Studien verzeichneten sechs von sieben Autoren positive Resultate: $p < 0,01$ (FISCHL et al., 1984); $p < 0,05$ (GERHARD et al., 1992); $p < 0,01$ (schnell bewegliche Spermien) (MINGMIN et al., 2002); $p < 0,01$ (MING-HUA, 2005); $p < 0,05$ (ZHEN-BEI, 2005); $p < 0,05$ (Spermiengeschwindigkeitstest) (HE et al., 2011).

Die Spermienmorphologie war Gegenstand vier kontrollierter und vier nicht-kontrollierter Studien. Drei der kontrollierten Studien wiesen signifikante Anstiege einzelner oder mehrerer morphologischer Parameter in der BG nach. Die KG blieb jeweils unbeeinflusst: $p \leq 0,05$ (intaktes Axonema, Fertilitätsindex) (SITERMAN et al., 1997); $p \leq 0,05$: (normalgeformte Spermien) (GURFINKEL et al., 2003); $p = 0,002$ (Prozentsatz „gesunder“ Spermien), $p = 0,013$ (normale Position des Akrosoms), $p < 0,001$ (normale Form des Akrosoms, normale Form des Kerns), $p = 0,005$ (normales Muster des Axonems, normaler Aufbau der Mantelfasern), $p = 0,022$ (normale Form des Axonems) (PEI et al., 2005). Bei drei der nicht-kontrollierten Studien wurde ebenso eine positive Wirkung der Akupunktur auf die Spermienmorphologie registriert: Gerhard et al. (1992) und Mingmin et al. (2002) beschreiben einen signifikanten Anstieg des Anteils der morphologisch intakten Spermien ($p < 0,05$), während He et al. (2011) einen signifikanten Abfall des Prozentsatzes der missgebildeten Spermien aufzeigen ($p < 0,05$).

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass eine eindeutige Aussage über die Wirksamkeit von Akupunktur auf die Spermienqualität beim Tier nur schwer getroffen werden kann. Bei den wenigen Veröffentlichungen handelt es sich mehrheitlich – mit Ausnahme der randomisiert kontrollierten Rattenstudie von Jin et al. (2017) – um unwissenschaftlich und lückenhaft beschriebene Einzelfallberichte oder Analysen mit sehr geringen Fallzahlen ($n = 3-6$). Hinzu kommt, dass sich die Untersuchungen hinsichtlich der Zielgrößen unterscheiden, sodass ein dahingehender Vergleich wenig ertragreich ist. Die in den Arbeiten als positiv hervorgehobenen, jedoch größtenteils ohne Signifikanzen untermauerten, Ergebnisse sind demnach unter Vorbehalt zu interpretieren. Im Vergleich zum Tier liefert die Humanmedizin mehrere Studien zu dieser Thematik, darunter einige mit

Kontrollintervention. Die Studien weisen größere Fallzahlen und vorwiegend einen ausführlich beschriebenen Methodik-Teil vor. Auch werden die Samenqualitätsparameter Dichte, Motilität und Morphologie von der Mehrzahl der Autoren analysiert, sodass eine Gegenüberstellung der Ergebnisse möglich ist. Bezüglich der Ejakulatdichte fallen diese, wie in den Tabellen 4 und 5 zu erkennen, divergent aus. Die Motilitäts- und Morphologieparameter dagegen erfuhren in beinahe allen Studien eine signifikante Verbesserung nach Akupunkturbehandlung. Eine Abhängigkeit der Resultate von der Stimulationsart (Nadelakupunktur, Elektro-Akupunktur, Moxibustion oder Kombinationen) ist hierbei nicht auszumachen.

Tabelle 4: Humanmedizinische Studien zum Einfluss der Akupunktur auf die Spermienqualität – nicht kontrollierte Studien

SD	Autor, Jahr, Land	n	Indikation	Intervention	Anzahl & Dauer der Behandlungen	Anzahl der Aku-Punkte	Spermatologische Basisparameter			
							Dichte	Motilität	Morphologie	Sonstiges
KS	Fischl, 1984, Österreich	28	OZ & AsZ	Aku	10 (3,5 W)	8	↑	↑	n. u.	EV, Hormonparameter →
KS	Gerhard, 1992, Deutschland	30	OZ & AsZ & TZ	Aku & Moxa	10 (2 W)	Aku: 8 Moxa: 5	→	↑	↑ (Morphologie) ↓ (Kopffekte)	Vitalität, Testosteron ↑ weitere Hormonparameter, physikalisch/chemische Parameter → EV ↓
KS	He, 2011, Singapur	35	OZ & AsZ & TZ	Elektro-Aku & Moxa	30 (6 W)	3	↑	↑ (Spermiengeschwindigkeitstest)	↓ (missgebildete Spermien)	EV, Testosteron ↑ weitere Hormonparameter → klinische Symptome* ↓
KS	Ho, 2015, Singapur	12	-	Elektro-Aku	20 (10–12 W)	16	→	→	→	Spermienbindungstest ↑ EV, Vitalität →
KS	Minghua, 2005, China	39	OZ & AsZ & TZ	Aku & Moxa	45 (12 W)	10	↑	↑	n. u.	↑ Vitalität
KS	Mingmin, 2002, Deutschland	22	OZ u/o AsZ u/o TZ	Aku	16 (8 W)	12	→	→	→ (Motilität) ↑ (schnell bewegliche Spermien)	↑ (normal geformte Spermien)
FS	Zhen-bei, 2005, China	34	-	Aku & Moxa	10 (3 W)	9 bzw. 4 (abwechselnd)	↑	↑	n. u.	-

*lumbosacrale Schmerzen; Schwindel; Spermatorrhoe; vorzeitige Ejakulation; Harndrang

Abk.: Aku: Akupunktur; AsZ: Asthenozoospermie; AZ: Azoospermie; bioch.: biochemisch; bzw.: beziehungsweise; EV: Ejakulatvolumen; FS: Fallserie; KKS: kontrollierte Kohortenstudie; KS: Kohortenstudie; Moxa: Moxibustion; n = Fallzahl; n. u.: nicht untersucht; OZ: Oligozoospermie; RCT: *randomized controlled trial* (dt.: randomisiert kontrollierte Studie); SD: Studiendesign; TZ: Teratozoospermie; u/o: und/oder; W: Wochen; zytol.: zytologisch; ↑: signifikanter Anstieg; ↓: signifikanter Abfall; →: kein signifikanter Unterschied

Tabelle 5: Humanmedizinische Studien zum Einfluss der Akupunktur auf die Spermienqualität – kontrollierte Studien

SD	Autor, Jahr, Land	n	Indikation	Intervention		Anzahl & Dauer der Behandlungen	Anzahl der Akupunkte	Spermatologische Basisparameter							
				BG	KG			Dichte		Motilität		Morphologie		Sonstiges	
								BG	KG	BG	KG	BG	KG		
RCT	Dieterle, 2009, Deutschland	57 (BG: 28, KG: 29)	OZ & AsZ	Aku	Sham-Aku (Streitberger-Nadeln)	12 (6 W)	10	→	↑	↑	→	→	n. u.	n. u.	EV: BG ↓, KG →
RCT	Gurfinkel, 2003, Brasilien	19 (BG: 9, KG: 10)	OZ u/o AsZ u/o TZ	Aku & Moxa	Aku und Moxa an nicht-therapeutischen Punkten	20 (10 W)	Aku: 8 Moxa: 17	→	→	→	→	→	↑ (normal-geformte Spermien)	→	EV: BG, KG →
RCT	Kucuk, 2016, Türkei	30 (BG: 15, KG: 15)	Varikozele (OZ & AsZ & TZ)	Elektro-Aku	Varikozelektomie	16 (8 W)	6	↑	↑	↑	↑	→	→	→	-
RCT	Pei, 2005, Deutschland	40 (BG: 28, KG: 12)	OZ u/o AsZ u/o TZ	Aku	Keine Behandlung	10 (5 W)	10	→	→	↑	→	→	↑ (7/9 Parametern)	→	-
KKS	Siterman, 1997, Israel	32 (BG: 16, KG: 16)	OZ u/o AsZ u/o TZ	Aku	Keine Behandlung (gematchte Kontrolle)	10 (5 W)	12	→	→	↑	→	→	↑ (intaktes Axonema, Fertilitätsindex)	→	Lebensfähigkeit: BG ↑, KG →
KKS	Siterman, 2000, Israel	40 (BG: 20, KG: 20)	OZ u/o AsZ u/o TZ u/o AZ	Aku	Keine Behandlung (gematchte Kontrolle)	10 (5 W)	12	↑ (bei 7/15 AZ-Patienten)	→	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	n. u.	EV, bioch. und zytol. Spermienparameter: BG, KG →

Abk.: Aku: Akupunktur; AsZ: Asthenozoospermie; AZ: Azoospermie; BG: Behandlungsgruppe; bioch.: biochemisch; n = Fallzahl; n. u.: nicht untersucht; OZ: Oligozoospermie; KG: Kontrollgruppe; KKS: kontrollierte Kohortenstudie; KS: Kohortenstudie; Moxa: Moxibustion; n. u.: nicht untersucht; OZ: Oligozoospermie; RCT: *randomized controlled trial* (dt.: randomisiert kontrollierte Studie); SD: Studiendesign; TZ: Teratozoospermie; u/o: und/oder; W: Wochen; zytol.: zytologisch; ↑: signifikanter Anstieg; ↓: signifikanter Abfall; →: kein signifikanter Unterschied

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Studiendesign

In dieser randomisiert kontrollierten Studie (Hauptstudie) wurde die Wirksamkeit einer Akupunkturbehandlung auf Spermienqualität und Libido genomisch geprüfter Jungbullen untersucht. Ort der Studie (Intervention und Datenerhebung) war die Besamungsstation „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ (Ölkofer Straße 41, 88518 Herbertingen, Deutschland). Die Probandenrekrutierung erfolgte im Zeitraum vom 28.06.2016 bis zum 19.10.2018. Die Erhebung der Daten endete am 08.02.2019.

Zuchtbullen der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“, die über einen Zeitraum von acht Wochen (Screening-Phase) eine mangelhafte progressive Spermienmotilität und/oder eine mangelhafte intakte Spermienmorphologie (Definition siehe Kap. III.2.1.) aufwiesen, wurden der Studie zugeführt. Mittels einer Randomisierungs-Software wurden die Tiere zwei Gruppen zugeordnet, der Behandlungs- (BG) oder der Kontrollgruppe (KG) (Verhältnis 1:1). Tiere der BG erhielten zehn Akupunkturbehandlungen über einen Zeitraum von fünf Wochen. Tiere der KG erhielten keine therapeutische Maßnahme, wurden allerdings ebenfalls zehnmal – dem zeitlichen Behandlungsintervall der BG entsprechend – in die Behandlungsstände geführt. Nach der fünfwöchigen Interventionsphase schloss sich eine elfwöchige Periode der Nachbeobachtung (Datenerhebung ohne Intervention) an, woraus sich ein Gesamtbeobachtungszeitraum von 24 Wochen pro Tier ergab (siehe Abbildung 3). Die Wahl des Gesamtbeobachtungszeitraums und seiner einzelnen Abschnitte begründet sich in der Spermatogenesedauer des Rindes von acht Wochen (Screening-Phase $\hat{=}$ einem Spermatogenesezyklus, Interventions- und Nachbeobachtungsphase $\hat{=}$ zwei Spermatogenesezyklen). Den Hauptzielparameter stellte der Anteil der Jungbullen dar, der im Gegensatz zur Screening-Phase (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) eine physiologische progressive Spermienmotilität und eine physiologische intakte Spermienmorphologie (Definition siehe Kap. III.5.1.) aufwies. Als Nebenzielparameter wurden während des Gesamtbeobachtungszeitraums verschiedene andere Spermieigenschaften aus den Überkategorien der Spermienquantität, -motilität und -morphologie erhoben sowie die Libido der Tiere bewertet. Die Spermeproben wurden im Rahmen des Routinebetriebs der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ gewonnen und mithilfe eines CASA-Systems nativ analysiert. Die Bewertung der Libido erfolgte über einen Dokumentationsbogen (siehe Kap. IX.1).

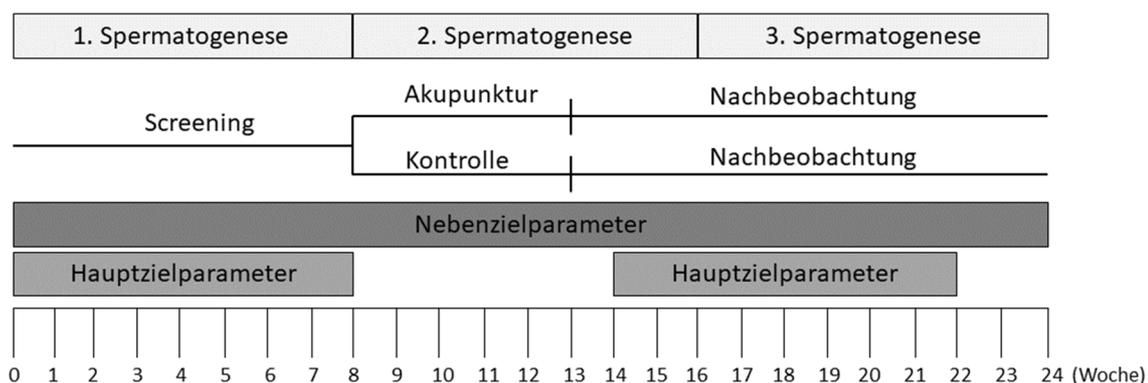


Abbildung 3: Studiendesign der randomisiert kontrollierten Studie

Einer achtwöchigen Screening-Phase schloss sich eine fünfwöchige Interventionsperiode (Akupunktur oder Kontrolle) an, worauf elf Wochen Nachbeobachtung folgten. Der Hauptzielparameter wurde während Woche 1–8 sowie während Woche 15–22 erhoben, die Nebenzielparameter wurden kontinuierlich erfasst.

Um Effekte der Akupunkturbehandlung auch bei Tieren mit guter Spermienqualität zu erfassen, wurde zudem eine Kohortenstudie durchgeführt. Dieser wurden Bullen zugeordnet, die über einen Zeitraum von acht Wochen (Screening-Phase) eine gute progressive Spermienmotilität und eine gute intakte Spermienmorphologie (Definition siehe Kap. III.2.1.) aufwiesen („gute Kohorte“). Analog zum Versuchsaufbau der randomisiert kontrollierten Studie wurden die Tiere zehnmal über einen Zeitraum von fünf Wochen akupunktiert und anschließend elf Wochen lang nachbeobachtet. Die Untersuchung erfolgte explorativ; es wurde nicht zwischen Haupt- und Nebenzielparameter unterschieden.

2. Probandenkollektiv

Für die Untersuchung wurden Jungbullen – unabhängig ihrer Rasse (Holstein, Fleckvieh, Braunvieh) – im Alter von mindestens zwölf Monaten aus dem Bestand der Besamungsstation „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ herangezogen. Ungefähr 90 % der Bestandstiere stammen aus einer zugehörigen Aufzuchtstation aus Baden-Württemberg (Aufzuchtstation Horb, Berg, Deutschland), 10 % werden aus anderen Bundesländern hinzugekauft. Die Rekrutierung der Studientiere fand kontinuierlich im Zeitraum vom 28.06.2016 bis zum 19.10.2018 statt. Hierfür wurden wöchentlich die Spermienqualitätsdaten der vorhergehenden acht Wochen (Screening-Phase) von allen sich zu diesem Zeitpunkt im Bestand befindenden Tieren analysiert. Die Datensätze waren auf dem an der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ zur Spermienqualitätsanalyse verwendeten CASA-System gespeichert und wurden als „tab.-Datei“ exportiert. Zur fehlerfreien Auswahl der Tiere erfolgte die Analyse dieser Datei mithilfe eines in der Statistiksoftware „R“

programmierten Skripts, das den Datensatz automatisch einlas und die in Betracht kommenden Tiere ausgab. Die bei diesem Prozess berücksichtigten Ein- und Ausschlusskriterien sind im Folgenden dargestellt.

2.1. Einschlusskriterien

Bullen der „Rinderunion-Baden-Württemberg e. V.“, die über einen Zeitraum von acht Wochen (Screening-Phase) eine mangelhafte progressive Spermienmotilität und/oder eine mangelhafte intakte Spermienmorphologie aufwiesen, wurden in die randomisiert kontrollierte Studie eingeschlossen. Eine mangelhafte progressive Spermienmotilität lag vor bei einem Anteil progressiv beweglicher Spermien von weniger als 58 % in 70 % der gewonnenen Nativspermaproben. Eine mangelhafte intakte Spermienmorphologie lag vor bei einem Anteil morphologisch intakter Spermien von weniger als 90 % in 70 % der gewonnenen Nativspermaproben. Die Zahl der gewonnenen Nativspermaproben innerhalb der Screening-Phase pro Bulle betrug im Mittel 16 (durchschnittlich zwei Samenentnahmen pro Woche; siehe Kap. IV.1.2. und IV.2.1.). Die gewählten prozentualen Grenzen entsprechen den Qualitätsstandards der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“, die sich an den von der Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter (ADR) herausgegebenen Mindestanforderungen für Zuchtbullen orientieren (ARBEITSGEMEINSCHAFT DEUTSCHER RINDERZÜCHTER E. V., 2006). Die ADR-Richtlinien definieren ein Ejakulat als mangelhaft, wenn der Anteil progressiv beweglicher Spermien weniger als 70 % und/oder der Anteil morphologisch intakter Spermien weniger als 80 % beträgt. Diese Empfehlungen basieren allerdings auf einer manuell-mikroskopischen Spermienanalyse. Richtlinien für mittels CASA-System erhobene Spermaproben beim Bullen existieren bis dato nicht, worin sich die eigenständige Festlegung der Grenzwerte der „Rinderunion-Baden-Württemberg e. V.“ begründet.

Bullen der „Rinderunion-Baden-Württemberg e. V.“, die über einen Zeitraum von acht Wochen (Screening-Phase) eine gute progressive Spermienmotilität und eine gute intakte Spermienmorphologie aufwiesen, wurden der Kohortenstudie zugeführt. Eine gute progressive Spermienmotilität lag vor bei einem Anteil progressiv beweglicher Spermien von 63–68 % in 70 % der Nativspermaproben. Eine gute intakte Spermienmorphologie lag vor bei einem Anteil morphologisch intakter Spermien von mehr als 90 % in 70 % der Nativspermaproben. Die gewählten prozentualen Grenzen entsprechen den Kriterien der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ für eine gute Spermienqualität. Tiere im Grenzbereich zwischen guter und mangelhafter Spermienqualität (progressive Spermienmotilität

58–62 %) wurden nicht in die Studie einbezogen. Genauso wenig wurden Tiere mit sehr guter Spermienqualität (progressive Spermienmotilität > 68 %) berücksichtigt, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch „Regression zur Mitte“ (BARNETT et al., 2004) zu vermeiden.

2.2. Ausschlusskriterien

Bullen, die nach Einschätzung der tierärztlichen Leitung sowie des Geschäftsführers der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ voraussichtlich nicht bis zum Ende des elfwöchigen Nachbeobachtungszeitraums im Bestand verblieben wären (z. B. geplante Schlachtung, Umstallung auf eine andere Besamungsstation oder Verkauf), wurden aus der Studie ausgeschlossen. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Bullen mit Erkrankungen, welche die Spermagewinnung beeinträchtigen können (v. a. Verletzungen am Bewegungsapparat (PARKINSON, 2009)) und Tiere mit einer vorliegenden klinisch apparenten Allgemeinerkrankung (v. a. Atemwegsinfektionen).

3. Randomisierung

Die Randomisierung erfolgte unabhängig durch das Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München. Verwendet wurde die Software „*RANDOULETTE*“, die eine zentrale Randomisierung eines Tieres über das Internet ermöglicht und GCP-konform¹² arbeitet. Für die gleichmäßige Verteilung der Bullen auf BG und KG (Verhältnis 1:1) wurden die eindeutige Identifikation und das Geburtsjahr der Tiere in „*RANDOULETTE*“ erfasst und gespeichert (Stratifizierungsinformationen). Die Randomisierung erfolgte nicht verblindet, dem randomisierenden Benutzer wurde das Ergebnis offen angezeigt.

4. Intervention

4.1. Akupunkturbehandlung

Die Akupunkturbehandlungen erfolgten nach dem Konzept der Traditionell Chinesischen Medizin¹³. Die Intervention erfolgte zweimal pro Woche über einen Zeitraum von fünf Wochen in den Stallungen der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“. Aus Sicherheitsgründen wurden die Bullen hierfür von mindestens einem Tierpfleger in einen Kastenstand

¹² GCP: *Good Clinical Practice* (Gute Klinische Praxis); beinhaltet internationale ethische und wissenschaftliche Standards für die Planung, Durchführung, Dokumentation und Berichterstattung von klinischen Studien am Menschen (ICH-STEERING-COMMITTEE, 1996).

¹³ Im Folgenden werden die Begriffe der Traditionell Chinesischen Medizin (TCM) und der Traditionell Chinesischen Veterinärmedizin (TCVM) synonym verwendet.

geführt. Der Kopf wurde zur Ruhigstellung mithilfe eines Halfters fixiert. Die Therapie wurde von in Akupunktur ausgebildeten¹⁴ Tierärztinnen durchgeführt (Frau Theresa Stübinger; Frau Dr. Anne-Rose Fischer¹⁵). Die Aufteilungen der Behandlungen auf die Akupunkturinnen war dabei wie folgt: Randomisiert kontrollierte Studie: Frau Dr. Anne-Rose Fischer: 3/5 $\hat{=}$ 132 von 210 Behandlungen; Frau Theresa Stübinger: 2/5 $\hat{=}$ 78 von 210 Behandlungen; Kohortenstudie: Frau Dr. Anne-Rose Fischer: 2/3 $\hat{=}$ 58 von 90 Behandlungen; Frau Theresa Stübinger: 1/3 $\hat{=}$ 32 von 90 Behandlungen. Als Akupunkturschema kam folgende, von Herrn Prof. Dr. Dominik Irnich¹⁶ empfohlene, Punktkombination zum Einsatz: Körperakupunktur: Bl 23, Lg 3 (jeweils beidseits); Ohrakupunktur: Ovar, ACTH, TSH (jeweils am linken Ohr). Die Auswahl der Akupunkturpunkte begründet sich in ihrer Potenz, Urogenital-Organen im Sinne der TCM zu stärken (Körperpunkte) sowie regulierend auf hormonelle Kreisläufe einzuwirken (Ohrpunkte). Weitere, ebenfalls wirksame Punkte konnten beim Bullen aus Gründen der Sicherheit nicht gewählt werden (z. B. Punkte der Nierenleitbahn an den Hintergliedmaßen). Die einzelnen Punkte einschließlich Indikation und Lokalisation sind in Tabelle 6 aufgeführt (LANGE, 1985; AMBRONN et al., 2001; SCHOEN, 2008; STUX et al., 2008; MÜLLER, 2011; ANGERMAIER, 2018).

Bei der Akupunkturbehandlung wurden sterile Einmal-Akupunkturnadeln (Wandrey, Berlin, Deutschland) der Stärke 0,20 x 15 mm (Ohrakupunktur) sowie 0,70 x 50 mm (Körperakupunktur) verwendet. Die Nadeltiefe betrug – abhängig von Körpergewicht und Bemuskulung – am Ohr ca. 3 mm und am Körper ca. 1,5–2 cm. An den Körperakupunkturpunkten erfolgte nach dem Einstich eine kurze Stimulation durch Rotation der Nadeln; die Ohrakupunkturpunkte wurden nicht stimuliert. Die gesetzten Nadeln wurden für ca. 25 Minuten im Tier belassen und nach erneuter mechanischer Stimulation der Körperakupunkturpunkte wieder entfernt.

¹⁴ 200-stündige Ausbildung bei der Deutschen Gesellschaft für Akupunktur mit Abschluss durch „A-Diplom“.

¹⁵ Tierärztliche Leitung der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“.

¹⁶ Leitung der Interdisziplinären Schmerzambulanz, Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum der LMU.

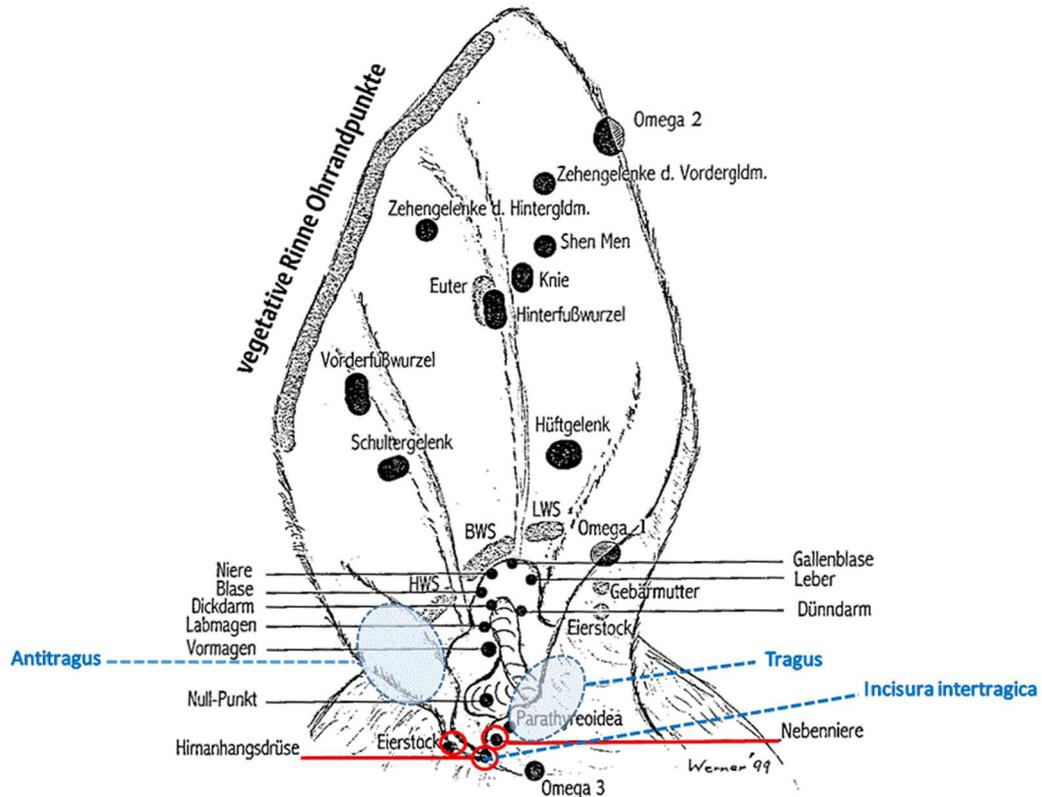
Tabelle 6: Akupunkturpunkte der Studie

Überblick über die in der Studie verwendeten Akupunkturpunkte einschließlich ihrer Indikation und Lokalisation. Die beschriebenen anatomischen Strukturen des Ohres sind in Abbildung 4a eingezeichnet.

Punkt	Relevante Indikation	Weitere Indikationen	Lokalisation
B1 23	Urogenitale Funktionsstörungen	Nierenerkrankungen, Rückenschmerzen, vertebrale Spondylosen, Pathologien der Bandscheiben, Beschwerden der Hüfte und der Hintergliedmaße	Zwischen den Querfortsätzen des zweiten und dritten Lendenwirbels, zwei bis drei Finger lateral der Wirbelsäule
Lg 3	Urogenitale Funktionsstörungen und sexuelle Beeinträchtigungen	vertebrale Spondylosen, Lumboischialgie, Beschwerden der Hüfte und der Hintergliedmaße	Zwischen den Dornfortsätzen des fünften und sechsten Lendenwirbels*
Ovar	hormonell bedingte Erkrankungen, urogenitale Funktionsstörungen, sexuelle Beeinträchtigungen	-	Am Übergang der <i>Incisura intertragica</i> zum <i>Antitragus</i>
ACTH	hormonell bedingte Erkrankungen	Immunschwäche, Autoimmunerkrankungen, Allergien	Am Übergang der <i>Incisura intertragica</i> zum <i>Tragus</i>
TSH	hormonell bedingte Erkrankungen	Schilddrüsenerkrankungen	am Grund der <i>Incisura intertragica</i>

*Aufgrund der unterschiedlichen Lendenwirbelzahl von Mensch und Tier und der damit einhergehenden Problematik hinsichtlich der Transposition der Punkte (siehe Kap. II.2.2.) wird die Lokalisation des Punktes in verschiedenen Quellen unterschiedlich angegeben (zwischen den Dornfortsätzen des vierten und fünften, fünften und sechsten sowie des sechsten und siebten Lendenwirbels). Die Variabilität der Punktlokalisierung ist von der IVAS (*International Veterinary Acupuncture Society*) anerkannt (MÜLLER, 2011). In dieser Studie wurde o. g. Lokalisation gewählt, da sie, der Lage beim Menschen entsprechend, die zwei letzten Lendenwirbel einbezieht.
Abk.: ACTH: Adrenocorticotropes Hormon; B1 23: Blase 23; Lg 3: Lenkergesäß 3; TSH: Thyreoidea stimulierendes Hormon

a)



b)

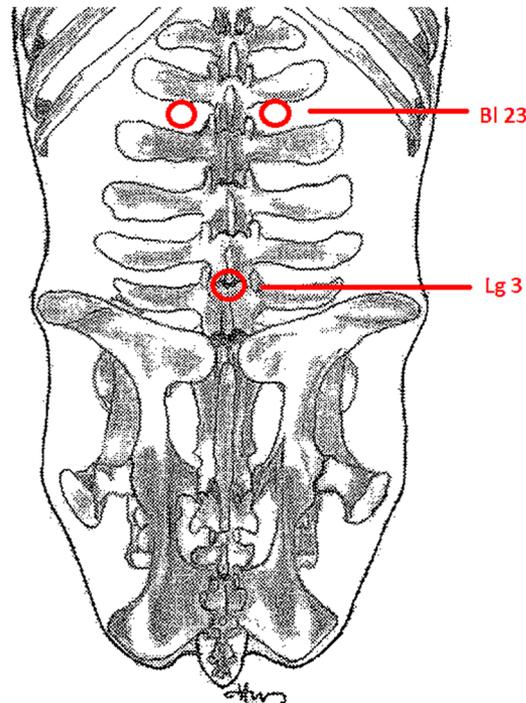


Abbildung 4 a und b: Akupunkturpunkte der Studie (mod. nach AMBRONN, 2001 (a) und SCHOEN, 2008 (b))

a) Ohrpunkte am rechten Rinderohr (rot): Ovar (Eierstock), ACTH (Nebenniere), TSH (Hirnanhangsdrüse); die beteiligten anatomischen Strukturen sind blau dargestellt.

Abk.: BWS: Brustwirbelsäule; HWS: Halswirbelsäule; LWS: Lendenwirbelsäule

b) Körperpunkte: Bl 23 (Blase 23) und Lg 3 (Lenkergesäß 3); siehe auch Tabelle 6

4.2. Kontrollverfahren

Tiere der KG erfuhren keine therapeutischen Maßnahmen, wurden allerdings denselben äußeren Reizen (z. B. Umstallung und Fixierung, Zuwendung durch Therapeuten und/oder Tierpfleger) – mit Ausnahme der Akupunktur an sich – ausgesetzt wie die Tiere der BG. Demnach wurden die Bullen der KG – dem zeitlichen Behandlungsintervall der BG entsprechend – zweimal wöchentlich über einen Zeitraum von fünf Wochen von einem Tierpfleger in einen Kastenstand geführt. Dort erfolgte ebenfalls eine Fixierung am Kopf mithilfe eines Halfters für ca. 25 Minuten.

5. Zielparameter

Die für die randomisiert kontrollierte Studie festgelegten Haupt- und Nebenzielparameter sind im Folgenden aufgeführt. Die Observierung der „guten Kohorte“ erfolgte explorativ; es wurde nicht zwischen Haupt- und Nebenzielparameter unterschieden.

5.1. Hauptzielparameter

Den Hauptzielparameter stellte der Anteil der Jungbullen dar, der im Gegensatz zur Screening-Phase (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) nach Intervention (15.–22. Woche nach Intervention) eine physiologische progressive Spermienmotilität und eine physiologische intakte Spermienmorphologie aufwies. Eine physiologische Spermienmotilität lag vor bei einem Anteil progressiv beweglicher Spermien von mehr als 58 % in 70 % der Nativspermaproben. Eine physiologische intakte Spermienmorphologie lag vor bei einem Anteil morphologisch intakter Spermien von mehr als 90 % in 70 % der Nativspermaproben. Die Zahl der gewonnenen Nativspermaproben während dieses Zeitraums betrug im Mittel 16 (durchschnittlich zwei Samenentnahmen pro Woche, siehe Kap. IV.1.2. und V.2.1.). Motilität und Morphologie der Spermien wurden mithilfe eines CASA-Systems bestimmt (siehe Kap. III.6.2.).

5.2. Nebenzielparameter

Als Nebenzielparameter wurden während des Gesamtbeobachtungszeitraums Spermienmerkmale aus den Überkategorien der Spermienquantität, -motilität und -morphologie, für die ein Zusammenhang mit der Fertilität angenommen wird (LARSEN et al., 2000; HIRANO et al., 2001; NAGY et al., 2015), mittels CASA-System an Nativspermaproben erhoben. Die einzelnen Zielparameter sowie deren Interpretation und/oder CASA-Definition sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die teilweise für die Berechnung einzelner Parameter notwendigen Zusatzgrößen werden in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Zur

Identifizierung der CASA-Parameter erforderliche Setup-Einstellungen, die den Messungen des CASA-Systems zugrunde liegen (Standard-Klassifizierung der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“), sind in Kap. IX.2. gelistet.

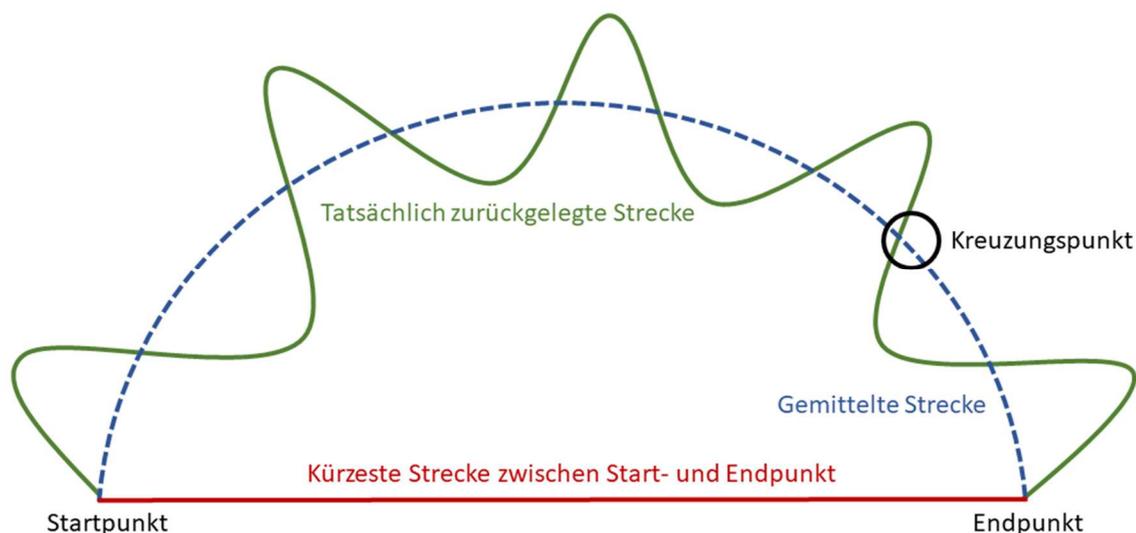


Abbildung 5: Spermienmotilitätsanalyse: Schematische Darstellung der tatsächlich zurückgelegten, der gemittelten und der kürzesten Strecke eines Spermiums zwischen Start- und Endpunkt (mod. nach AMANN & WABERSKI, 2014).

Die daraus resultierenden Geschwindigkeitsparameter ($\mu\text{m}/\text{Sek}$) dienen als Grundlage zur Berechnung der Motilitätsparameter: VSL: *straight line velocity* (dt.: Lineare Geschwindigkeit, kürzeste Strecke zwischen Start- und Endpunkt pro Zeiteinheit); VCL: *curvilinear velocity* (dt.: Kurvilineare Geschwindigkeit, tatsächlich zurückgelegte Strecke pro Zeiteinheit); VAP: *average path velocity* (dt.: Mittlere Geschwindigkeit, gemittelte Strecke pro Zeiteinheit). Die Anzahl der Kreuzungspunkte der gemittelten Strecke mit der tatsächlich zurückgelegten Strecke pro Sekunde stellt die Kopfschlagfrequenz dar (siehe Tabelle 7).

Bis dato existieren keine Normwerte für mittels CASA-System erhobene Spermaproben beim Bullen. Daher kann im Rahmen der Datenauswertung keine Kategorisierung der Nebenzielparameter hinsichtlich einer mangelhaften oder physiologischen Qualität stattfinden. Betrachtet wird demnach nur die Verbesserung oder Verschlechterung der Parameter im Zusammenhang mit der Intervention. Lediglich bezüglich des Anteils der progressiv beweglichen Spermien sowie des Anteils der Spermien mit intakter Morphologie (\cong Einschlusskriterien) ist eine dahingehende Einstufung, basierend auf den Grenzwerten der „Rinderunion-Baden-Württemberg e. V.“ (siehe Kap. III.2.1.), möglich.

Des Weiteren wurde die Libido der Tiere – als Basis für einen reibungslosen Ablauf der Spermagewinnung – anhand eines Dokumentationsbogens bewertet. Diese Untersuchung stellt keinen Teil des Routinebetriebs der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ dar und wurde daher nur bei Tieren durchgeführt, die bereits in die Studie eingeschlossen worden

sind. Daten aus der Screening-Phase liegen demnach nicht vor, was eine Beobachtung der Akupunkturwirkung nur während der Interventions- und der Nachbeobachtungsphase erlaubte.

Die Libido im Allgemeinen ist definiert als die Bereitschaft eines Bullen, auf einen Sprungpartner aufzuspringen und diesen zu begatten (CHENOWETH, 1983), und wird anhand der Reaktionszeit (Zeit zwischen der ersten Kontaktaufnahme mit dem Sprungpartner und dem Aufsprung) und der Annahme der Sprungpartner bemessen (BUSCH, 2001). Die Kategorisierung des Dokumentationsbogens entspricht derjenigen aus Busch (2001) und Jackson & Cockcroft (2008) (siehe Kap. III.6.3. sowie Tabelle 7).

Tabelle 7: Zielparameter der Studie

Messgröße	Interpretation/CASA-Definition (HT CASA II, Software Manual, 2017)
Spermienquantität*	Gesamtzahl der Spermien (Mio.) [Spermienkonzentration x Ejakulatvolumen]
Spermienqualität*	
Spermienmotilität	
- Bewegliche Spermien (%)	Fortbewegung > Spermien-Kopflänge
- Progressiv bewegliche Spermien (%)	Fortbewegung mit STR > STR ^{progressiv} ‡ und VAP > VAP ^{progressiv} ‡
- Statische Spermien (%)	Nicht bewegliche Spermien: Fortbewegung mit VAP < VAP ^{statisch} ‡ oder VSL < VSL ^{statisch} ‡
- Langsame Spermien (%)	Fortbewegung mit VSL < VSL ^{langsam} ‡ oder VAP < VAP ^{langsam} ‡
- Kopf-Schlagfrequenz (Hz)	Durchschnittliche Anzahl der Kreuzungspunkte der tatsächlich zurückgelegten Strecke mit der gemittelten Strecke pro Sekunde
- Linearität (Skala von 0–1)	Verhältnis der tatsächlich zurückgelegten Strecke zur kürzesten Strecke zwischen Start- und Endpunkt: [VSL/VCL]
- Geradlinigkeit (Skala von 0–1)	Verhältnis der gemittelten Strecke zur kürzesten Strecke zwischen Start- und Endpunkt: [VSL/VAP]
Spermienmorphologie	
- Morphologisch intakte Spermien (%)	[100 - Summe der Spermien mit morphologischen Auffälligkeiten] (siehe folgende)
- Spermien mit geknicktem Schwanz (%)	Schwanzkrümmungsrate > Minimale Schwanzkrümmungsrate‡
- Spermien mit Schleifenform (%)	Schwanzkrümmung > Minimale Schwanzkrümmung‡
- Spermien mit proximalem Zytoplasmatropfen (%)	Spermien mit persistierendem Zytoplasmaarest nach Spermatogenese an Kopfbasis
- Spermien mit distalem Zytoplasmatropfen (%)	Spermien mit persistierendem Zytoplasmaarest nach Spermatogenese in Mittelstückregion
- Spermien mit distalem-Mittelstück Reflex (%)	Spermien mit geknicktem Schwanz in distaler Mittelstückregion mit eingeschlossenem Zytoplasmatropfen
Libido†	
Reaktionszeit eines Bullen bis zum Aufsprung (min.)	0–0,5 min.: sehr gute Libido; 0,5–5 min.: gute Libido; 5–10 min.: ausreichende Libido; 10–30 min.: Libidoschwäche (BUSCH, 2001; JACKSON & COCKCROFT, 2008)
Annahme der Sprungpartner	Bulle beachtet alle ihm vorgestellten Sprungpartner: ungestörte Libido Bulle beachtet nur bestimmte, aber nicht alle ihm vorgestellten Sprungpartner: Libidoschwäche (BUSCH, 2001; JACKSON & COCKCROFT, 2008)

*Mittels CASA-System erhoben; †mittels Dokumentationsbogen erhoben; ‡in den Setups des CASA-Systems festgesetzter Wert (siehe Kap. IX.2.)
 Abk.: CASA: *computer assisted/aided sperm analysis-system* (dt.: computer-assistierte Spermienanalyse); Hz: Hertz; min.: Minuten; Mio.: Millionen; VAP: *average path velocity* (dt.: Mittlere Geschwindigkeit, µm/Sek); VCL: *curvilinear velocity* (dt.: Kurvilineare Geschwindigkeit, µm/Sek); VSL: *straight line velocity* (dt.: Lineare Geschwindigkeit, µm/Sek)

6. Erhebung der Zielparameter

6.1. Spermagewinnung

Die Spermagewinnung erfolgte im Rahmen des Routinebetriebs der Besamungsstation „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ während des gesamten Studienzeitraums (06/2016–02/2019) und fand in der Regel zweimal pro Woche pro Bulle statt (in Feiertagswochen mitunter nur einmal pro Woche). Bullen mit hohem Zuchtwert wurden teilweise häufiger abgesamt. Pro Bulle wurden demnach im Durchschnitt 48 Proben über einen Zeitraum von 24 Wochen (acht Wochen Screening, fünf Wochen Intervention, elf Wochen Nachbeobachtung) gewonnen (exakte Zahlen siehe Kap. IV.1.2. und IV.2.1.). Der standardisierte Ablauf wurde wie folgt durchgeführt: Nach einer mehrminütigen Phase der Vorstimulation (gleichzeitiges Führen mehrerer Bullen im Kreis durch Tierpfleger) im sog. Sprungraum erfolgten ein bis zwei Blindsprünge (Aufsprung ohne Ejakulation) an einem Phantom (Spezialanfertigung der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“, Duffner Landtechnik GmbH & Co. KG, Hohentengen, Deutschland) oder – bei Nichtannahme – an einem anderen Bullen („Unterstellbullen“). Beim darauffolgenden Sprung wurde die Spermaentnahme von einem dafür ausgebildeten Tierarzt durchgeführt. Das Ejakulat wurde mithilfe einer auf 39 °C temperierten künstlichen Vagina (Modell Hannover, Ludwig Bertram GmbH, Isernhagen, Deutschland) gewonnen, in einem daran befestigten 12 ml-Tulpenglas (Müller, Nürnberg, Deutschland) aufgefangen und an das angrenzende hauseigene Labor weitergereicht. Bis zur Beurteilung wurde die Probe in einem auf 30 °C erwärmten Heizblock (QDB2 Dry Block Heater, Grant, Cambridgeshire, Großbritannien) zwischengelagert.

6.2. Beurteilung der Spermienqualität

Die gewonnenen Ejakulate wurden nativ analysiert. Zur Beurteilung der Spermienqualität wurde das CASA-System „*IVOS II Clinical*“ (*Hamilton-Thorne Biosciences*, Beverly, USA) aus dem Besitz der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ herangezogen, das aus einem in sich geschlossenen Analysegerät sowie einem Bildschirm besteht (siehe Abbildung 6) und folgende Elemente integriert (HAMILTON-THORNE, 2016):

- Mikroskop mit motorisiertem Heiz-Objektisch (37 °C)
- Stroboskop-LED-Quelle (Frequenz: 1.000 Hz)
- Hochauflösende CCD-Kamera (Auflösung 782x582 Pixel) mit 60 Bildeinheiten pro Sekunde (JAI CM-040-GE)

- PC mit Intel i7 Quad Prozessor (3,0 GHz, 8 GB SDRAM, 1 TB-Festplatte, 24 Zoll Flachbildschirm)
- Softwareprogramm HT CASA II

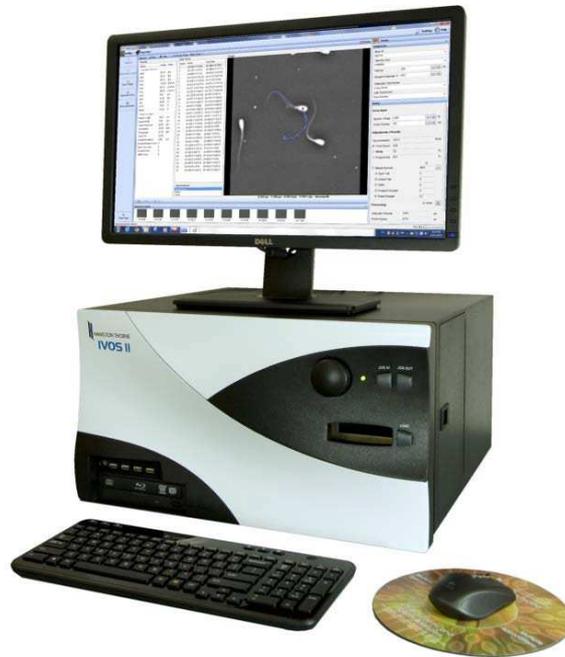


Abbildung 6: CASA-System (HAMILTON-THORNE, 2016)

Analysegerät und Bildschirm des „*IVOS II Clinical*“ der Firma *Hamilton-Thorne Biosciences*

Vorbereitend zur Analyse wurde das Ejakulat direkt nach der Gewinnung im Verhältnis 1:100 verdünnt. Hierfür wurden mithilfe einer Pipette (SL-Pette XE, Südlabor, Gauting, Deutschland) 10 μl des Ejakulats mit 1.000 μl Sterofundin (Braun, Melsungen, Deutschland) in ein Reaktionsgefäß gegeben, das in einem auf 37 °C temperierten Trockenbad (*Accu Block Digital Dry Bath, Labnet International, Edison, USA*) gelagert wurde. Anschließend wurden 3,5 μl dieser durch Schwenken homogenisierten Spermisuspension in eine Makler-Zählkammer (Leja, *Nieuw Vennep*, Niederlande) pipettiert. Inhomogene Füllungen durch Lufteinschlüsse wurden verworfen. Die Zählkammer wurde daraufhin in das dafür am Analysegerät vorgesehene Fach gegeben, woraufhin das mikroskopische Bild am Monitor dargestellt wurde. Nach manueller Scharfstellung des Bildes durch ein Fokussierungsrad und Eingabe der Tierdaten sowie des Ejakulatvolumens über die Tastatur wurde die Messung per Knopfdruck gestartet.

Pro Messung wurden zehn Messfelder ausgewertet. Die Analyse der Messfelder erfolgte vollautomatisiert bei 37 °C durch folgende Prozesse: Nach Erzeugung einer

mikroskopischen Bildserie (30 Bilder je Messfeld) durch die Hochauflösungskamera mit einer Rate von 60 Bilder pro Sekunde und negativem Phasenkontrast wurden die Bilder digitalisiert und auf dem Monitor dargestellt (helle Spermien auf dunklem Untergrund, siehe Abbildung 7). Anhand ihrer Graustufung wurden die Bilder durch das Softwareprogramm ausgewertet. Die Ergebnisse (Mittelwerte der Daten der einzelnen Messfelder) wurden auf dem Monitor angezeigt und automatisch auf der „HAT CASA II“-Datenbank gespeichert. Im Anschluss an die Analyse wurden die Daten in „Microsoft Excel“ exportiert und auf dem Server der Interdisziplinären Schmerzambulanz, Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum der LMU, gespeichert.

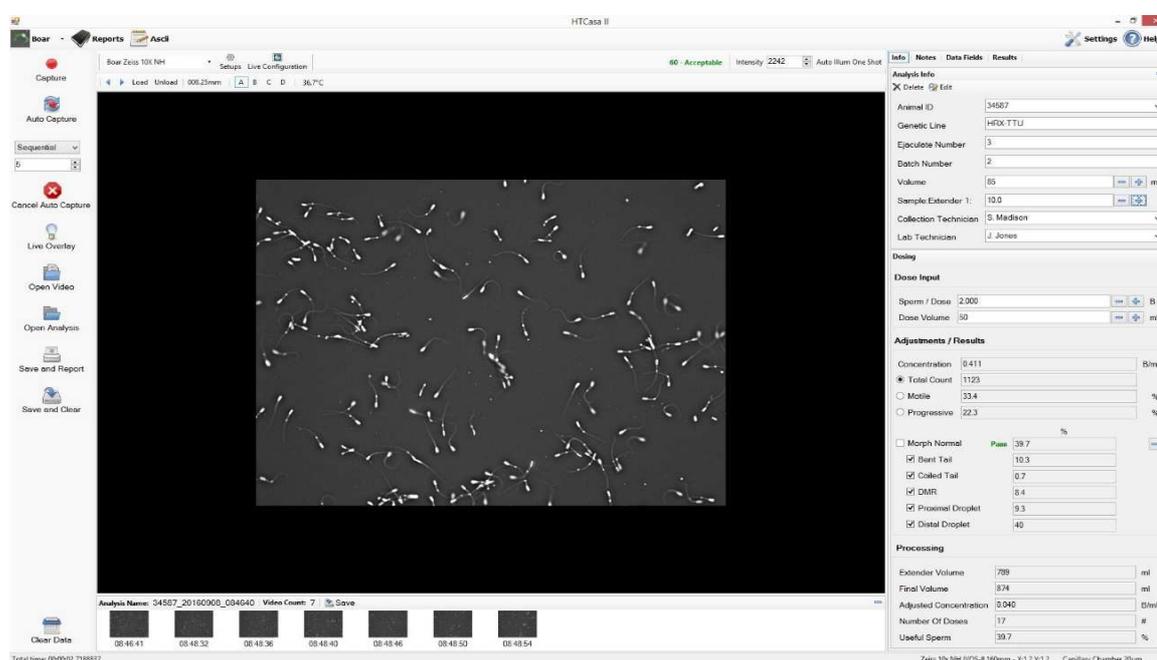


Abbildung 7: Beispiel eines Monitorbilds nach Probenanalyse (HAMILTON-THORNE, 2016)

Links: visualisierte Darstellung der Spermien; rechts: Anzeige der Messergebnisse

6.3. Beurteilung der Libido

Nach Rekrutierung eines Bullen und Informationsweitergabe an den für die Spermagewinnung zuständigen Tierarzt beurteilte dieser von diesem Zeitpunkt an die Libido des Tieres während der Routine-Absamungen anhand eines Dokumentationsbogens (siehe Kap. IX.1). Auf diesem notierte er die Reaktionszeit eines Bullen bis zum Aufsprung (0–0,5 min.: sehr gute Libido; 0,5–5 min.: gute Libido, 5–10 min.: ausreichende Libido, 10–30 min.: Libidoschwäche) sowie die Annahme bestimmter Sprungpartner (Bulle beachtet alle ihm vorgestellten Sprungpartner: ungestörte Libido; Bulle beachtet nur bestimmte, aber nicht alle ihm vorgestellten Sprungpartner: Libidoschwäche) (siehe auch Tabelle 7).

7. Statistische Auswertung: Fallzahlschätzung und Datenanalyse

Eine biometrische Fallzahlschätzung konnte aufgrund eines Mangels an entsprechenden Kennzahlen, z. B. aus vorangegangenen Studien, nicht erfolgen. Eine Anzahl von 20 Tieren pro Studiengruppe erschien jedoch, auf Basis eines Vergleichs mit Fallzahlen aus humanmedizinischen Studien mit ähnlichem Forschungsgegenstand (SITERMAN et al., 2000; GURFINKEL et al., 2003; PEI et al., 2005; DIETERLE et al., 2009; KUCUK et al., 2016), als ausreichend, um klinisch relevante Effekte zu detektieren.

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte anhand der Statistiksoftwares „IBM® SPSS“ (*Statistical Package for Social Sciences*, Version 25.0 (IBM® CORP. RELEASED, 2017)) und „G*Power“, Version 3.0 (FAUL et al., 2007).

Die Beurteilung des Hauptzielparameters (dichotome Variable), der den Anteil der Bullen definiert, der im Gegensatz zur Screening-Phase (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) nach Intervention (15–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) eine physiologische Spermienmotilität und -morphologie aufwies, erfolgte mittels *Fisher-Test*. Diesem wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zugrunde gelegt. Zur Beschreibung der Effektstärke des Einflusses der Intervention (Akupunktur- bzw. Kontrollbehandlung) auf Spermienmotilität und -morphologie wurde die *Odds-Ratio* berechnet. Auf Basis der gewonnenen Daten wurde eine Fallzahlschätzung durchgeführt, um die Mindestanzahl an Tieren zu errechnen, die für einen Nachweis des Effekts in der beobachteten Größe nötig wären. Die Berechnung erfolgte mittels *Fisher-Test* mit einem angesetzten Alphafehlerniveau von 5 % und einer „Power“ von 80 %.

Der Einfluss der Intervention auf den Zeitverlauf der einzelnen Nebenzielparameter (metrische Variablen) wurde anhand von GEE (*Generalized Estimating Equations*)-Modellen bestimmt. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Sonderform der Linearen Regression, die auch für nicht-normalverteilte Daten eine Analyse des Zeitverlaufs konstanter und zeitveränderlicher Kovariaten erlaubt. Somit konnten die Daten des gesamten Beobachtungszeitraums analysiert werden. Dabei wurde neben der Studiengruppe auch das Alter der Bullen als Kovariate berücksichtigt. Die Modelle setzten sich somit aus den Haupteffekten für Zeit [w = Wochen], der Gruppenzugehörigkeit [$BG = 1$, $KG = 0$] und dem Bullenalter [m = Monate] sowie den Interaktionseffekten Zeit * Gruppe und Zeit * Bullenalter gemäß der folgenden Formel zusammen:

$$y = \beta_0 + (\beta_{Gruppe} * Gruppe) + (\beta_{Zeit} * Zeit) + (\beta_{Alter} * Alter) + (\beta_{Zeit * Gruppe} * Zeit * Gruppe) + (\beta_{Zeit * Alter} * Zeit * Alter)$$

Im Gegensatz zu Klassisch Linearen Regressionsmodellen wird bei diesem Modell der Zusammenhang zwischen Kovariate und Zielgröße (y) nicht linear unterstellt, sondern ist über eine Funktion herzustellen (Linkfunktion). Für die Zielgröße ist außerdem eine Verteilungsannahme zu modellieren. Dementsprechend wurde die passende Link-Funktion anhand des *Quasi-Likelihood*-Koeffizienten ausgewählt, der angibt, wie stark die realen Messwerte der Zielgröße von den berechneten Werten abweichen. Die Verteilungsannahmen der Zielgrößen wurden anhand graphischer Auftragung geschätzt. Verteilungsannahmen und Linkfunktionen für die jeweiligen Zielgrößen der Studie sind Tabelle 8 zu entnehmen. Es ist zu beachten, dass die Regressionskoeffizienten (β) aufgrund der unterschiedlichen Verteilungsmuster der Spermieingütemerkmale und der unterschiedlich gewählten Linkfunktionen zur optimalen Datenmodellierung nicht direkt linear zu interpretieren sind.

Tabelle 8: Verteilungsannahmen und Linkfunktionen der Nebenzielparameter

Nebenzielparameter	Verteilungsannahme	Linkfunktion
Spermiengesamtzahl	Gammaverteilung	Identity
Bewegliche Spermien	Gammaverteilung	Identity
Progressiv bewegliche Spermien	Gammaverteilung	Identity
Statische Spermien	Gammaverteilung	Log
Langsame Spermien	Gammaverteilung	Identity
Kopf-Schlagfrequenz	Gammaverteilung	Identity
Linearität	Normalverteilung	Identity
Geradlinigkeit	Normalverteilung	Identity
Morphologisch intakte Spermien	Gammaverteilung	Log
Spermien mit geknicktem Schwanz	Gammaverteilung	Log
Spermien mit Schleifenform	Normalverteilung	Identity
Spermien mit PZT	Gammaverteilung	Log
Spermien mit DZT	Gammaverteilung	Identity
Spermien mit DMR	Gammaverteilung	Identity

Abk.: DMR: distaler-Mittelstückreflex; DZT: distaler Zytoplasmotropfen; PZT: proximaler Zytoplasmotropfen

Von den spermatologischen Nebenzielparametern wurde außerdem eine deskriptive Statistik zur Beschreibung der Stichprobe zu den Zeiträumen vor und nach der Intervention (1.–8. bzw. 15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) angefertigt (Median und Interquartilsabstand (*interquartile range*, IQR: Intervall zwischen dem 25 %- und dem 75 %-Quantil)). Da es aufgrund verschiedener Einflüsse generell zu starken einzelnen Ausreißern in der Spermienqualität kommen kann, wurde hierfür pro Studiengruppe der

Medianwert aller Einzeltiermediane berechnet. Die Einzeltiermediane wurden aus allen pro Tier und Studienphase (1.–8. bzw. 15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) gewonnenen Spermaproben ermittelt. Zum Vergleich der Gruppen zu den beiden Untersuchungszeiträumen sowie der prä- und postinterventionellen Werte innerhalb einer Gruppe wurden nichtparametrische Tests herangezogen, denen ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zugrunde gelegt wurde. Der Vergleich der beiden Studiengruppen (ungepaarte Stichprobe) erfolgte mittels *Mann-Whitney-U-Test*, der Vorher/Nachher-Vergleich innerhalb einer Gruppe (gepaarte Stichprobe) mittels *Wilcoxon-Test*. Zur Beschreibung der Entwicklung der einzelnen Spermienparameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum (24 Wochen) wurde ebenfalls eine deskriptive Statistik erstellt (Median, IQR). Auch hier wurde, aus oben genanntem Grund, der Medianwert aller Einzeltiermediane verwendet. Die Einzeltiermediane wurden aus allen pro Tier und Studienwoche gewonnenen Spermaproben ermittelt, woraus sich eine longitudinale Datenstruktur mit 24 Messzeitpunkten ergab.

8. Ethik

Tierschutzbeauftragte der Studie war Frau Dr. Anna-Caroline Wöhr (Tierärztliche Fakultät der LMU, Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung). Ihrer Einschätzung zufolge war das Studienvorhaben nicht als ein bei der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) anzeige- oder genehmigungspflichtiger Tierversuch im Sinne des Tierschutzgesetzes, sondern als sog. „schmerzloser Versuch“¹⁷ einzustufen. Die Studie wurde demnach am 26.04.2016 zur Genehmigung bei der Ethikkommission des Zentrums für klinische Tiermedizin (Veterinärstraße 13, 80539 München, Deutschland) eingereicht. Diese bestätigte das Versuchsvorhaben am 12.06.2016 unter folgender Protokoll-Nummer: 67-17-05-2016.

¹⁷ Verwendung von lebenden Tieren zu Versuchszwecken ohne Schmerzen, Leiden oder Schäden, vgl. § 1 und § 7 Tierschutzgesetz.

IV. ERGEBNISSE

1. Randomisiert kontrollierte Studie

1.1. Charakteristika des Probandenkollektivs

Innerhalb des Rekrutierungszeitraums (28.06.2016–19.10.2018) wurden – aus einem wechselnden Tierbestand von insgesamt 241 Tieren – 42 Jungbullen mit mangelhafter Spermienqualität in die randomisiert kontrollierte Studie eingeschlossen. Die Tiere wurden durch Randomisierung gleichmäßig der BG und der KG zugeordnet. Aufgrund des Bekanntwerdens der Nichterfüllung der Einschlusskriterien (Verfügbarkeit während des gesamten Beobachtungszeitraums) zweier Tiere direkt nach Randomisierung, wurden diese – vor Interventionsstart – aus der Studie ausgeschlossen. Infolgedessen betrug die Verteilung der Tiere auf BG und KG 21:19, wie im CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*)-Flussdiagramm (siehe Abbildung 8) schematisch dargestellt. Alle Bullen der BG beendeten das Studiendesign prüfplankonform. Zwei Tiere der KG schieden aufgrund von Schlachtung (sieben Wochen vor Ende des Gesamtbeobachtungszeitraums) bzw. beeinträchtigter Spermagewinnung durch Schmerzen im Bewegungsapparat vorzeitig aus der Studie aus. Damit standen in der BG 21 und in der KG 17 Tiere für die Analyse zur Verfügung. Die Datenerfassung endete am 06.02.2019.

Das mediane Alter der 38 Bullen betrug bei Studieneinschluss 15 Monate (Min: 12, Max: 34), wobei kein signifikanter Unterschied zwischen Tieren der BG und der KG festzustellen war (Median (Min, Max) 15 (12, 34) vs. 15 (13, 34); $p = 0,836$; *Mann-Whitney-U-Test*). Eine Kategorisierung nach Altersgruppen, dargestellt in Tabelle 9, zeigte deskriptiv ebenfalls eine ähnliche Häufigkeitsverteilung in beiden Studiengruppen.

Tabelle 9: Kategorisierung der Bullen nach Altersgruppen

	BG (n = 21)	KG (n = 17)	Gesamt (n = 38)
< 15 Monate	8	6	14
15–19 Monate	7	8	15
≥ 20 Monate	6	3	9
Gesamt	21	17	38

Abk.: BG: Behandlungsgruppe; KG: Kontrollgruppe; n: Fallzahl

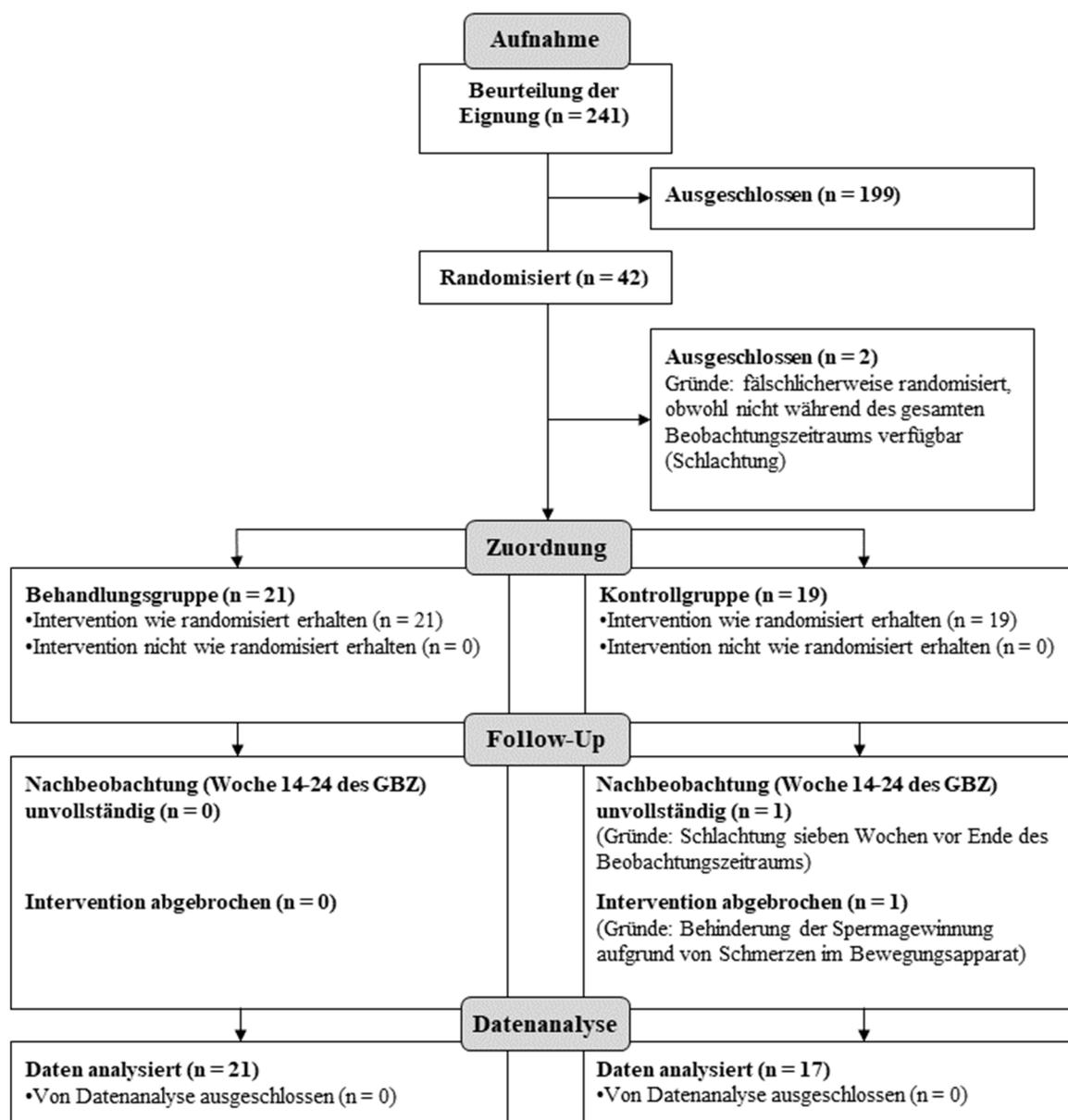


Abbildung 8: CONSORT-Flussdiagramm (SCHULZ et al., 2010)

Abk.: GBZ: Gesamtbeobachtungszeitraum

1.2. Datenerhebung

Die Intervention erfolgte prüfplankonform zweimal pro Woche pro Bulle über einen Zeitraum von fünf Wochen (Min: 29 Tage, Max: 32 Tage). Der Abstand zwischen zwei Behandlungen betrug im Durchschnitt 3,4 Tage (Min: 1, Max: 7). Aufgrund von starken Abwehrbewegungen des Kopfes während der ersten Behandlung war das Setzen der Nadeln am Ohr bei einem Bullen nicht möglich. Die folgenden neun Therapiesitzungen konnten komplikationslos durchgeführt werden. Anderweitige Schwierigkeiten im Rahmen der Intervention traten nicht auf.

Die Spermagewinnung erfolgte pro Bulle durchschnittlich zweimal pro Woche (siehe Kap. III.6.1.). Pro Tier wurden während des Gesamtbeobachtungszeitraums von 24 Wochen im Mittel 48 Proben gewonnen. Tabelle 10 liefert – die Studiengruppen berücksichtigend – eine differenzierte Darstellung der durchschnittlichen, minimalen und maximalen Probenzahl pro Bulle pro Studienphase. Hieraus ist zu entnehmen, dass in beiden Studiengruppen innerhalb jeder Studienphase eine vergleichbare Anzahl von Proben für die spermatologische Untersuchung zur Verfügung stand.

Tabelle 10: Anzahl der für die Datenanalyse verfügbaren Spermaproben pro Tier pro Studienphase

	BG (n = 21)			KG (n = 17)			Gesamt (n = 38)		
	M	Min	Max	M	Min	Max	M	Min	Max
Screening-Phase	15	14	17	16	14	19	14	14	19
Interventions-Phase	9	7	9	9	6	11	9	6	11
Nachbeobachtungs-Phase	23	19	26	24	20	31	26	19	31
Gesamtbeobachtungszeitraum	47	43	50	49	43	59	49	43	59

Abk.: BG: Behandlungsgruppe; KG: Kontrollgruppe, M: Mittelwert; Max: Maximum; Min: Minimum; n: Fallzahl

1.3. Hauptzielparameter

Hauptzielparameter war der Anteil der Jungbullen, der im Gegensatz zur Screening-Phase vor Intervention (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) eine physiologische Spermienmotilität sowie eine physiologische Spermienmorphologie aufwies (Definition siehe Kap. III.5.1.). Dieser Anteil betrug in der BG 6/21 (29 %) und in der KG 3/17 (18 %). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war dabei nicht auszumachen ($p = 0,476$; *Fisher-Test*). Die relative Chance, nach Behandlung physiologische Werte bezüglich Spermienmotilität und -morphologie zu erlangen, war bei Bullen der BG ca. doppelt so hoch wie bei Bullen der KG (*Odds-Ratio*: 1,9). Das 95 %-Konfidenzintervall (95 %-KI) [0,40; 9,09] macht jedoch die Unschärfe dieser Schätzung deutlich und zeigt, dass sich die beiden Studiengruppen hinsichtlich des Hauptzielparameters statistisch nicht voneinander abgrenzen lassen. Um einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachzuweisen, müsste, auf Basis einer Fallzahlschätzung mittels *Fisher-Test*, eine Studie mit mindestens 485 Tieren durchgeführt werden.

Tabelle 11 berücksichtigt – neben dem Anteil der Tiere mit physiologischer Morphologie und Motilität (Hauptzielparameter (in der Tabelle bezeichnet als Kategorie 4)) – auch die

drei anderen möglichen Kombinationen dieser Parameter (mangelhafte Morphologie und Motilität (Kategorie 1); physiologische Morphologie und mangelhafte Motilität (Kategorie 2); mangelhafte Morphologie und physiologische Motilität (Kategorie 3)) und die Verteilung der Bullen auf diese vor und nach Intervention. Während Verschiebungen innerhalb der zweiten und dritten Kategorie von geringer klinischer Relevanz sind (einer von zwei Parametern jeweils im mangelhaften Bereich), ist vor allem die Veränderung in Kategorie 1 bedeutsam. Hier verringerte sich in der BG der Anteil der Tiere, der eine schlechte Ausprägung beider Merkmale aufwies, um 19 % (4/10). Eine Verbesserung trat jedoch auch bei Tieren der KG auf (um 35,3 %; 6/9).

Tabelle 11: Verteilung der Tiere mit mangelhafter bzw. physiologischer Spermienmotilität und -morphologie vor und nach Intervention

		Kat. 1: Morph ↓ Mot ↓	Kat. 2: Morph ↑ Mot ↓	Kat 3: Morph ↓ Mot ↑	Kat. 4: Morph ↑ Mot ↑	Gesamt
BG	Pre	10	11	0	0	21
	Post	6	9	0	6*	21
KG	Pre	9	8	0	0	17
	Post	3	10	1	3*	17

*Hauptzielparameter

Abk.: BG: Behandlungsgruppe; Kat: Kategorie; KG: Kontrollgruppe; Morph: Morphologie; Mot: Motilität; Post: nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums); Pre: vor Intervention (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums; Screening-Phase); ↑: physiologisch; ↓: mangelhaft

Die Kategorien aus Tabelle 11 aufgreifend, stellt Abbildung 9 zusätzlich zum alleinigen Anteil der Tiere pro Kategorie die differenzierte Entwicklung jedes Bullen hinsichtlich Spermienmorphologie und -motilität in Abhängigkeit von der Intervention dar. In der BG war nach Akupunkturbehandlung eine Verbesserung eines oder beider Parameter bei sieben Bullen zu verzeichnen. Zwölf Tiere zeigten keinerlei Veränderung, zwei Tiere erfuhren eine Verschlechterung. In der KG trat nach Kontrollbehandlung eine Verbesserung bei sechs Bullen auf, elf Tiere zeigten eine gleichbleibende Qualität der Parameter. Eine Verschlechterung war bei keinem Tier festzustellen. Eine Überlegenheit der Akupunktur gegenüber der Kontrollbehandlung war – diese Parameterkombination betrachtend – demnach nicht zu erkennen.

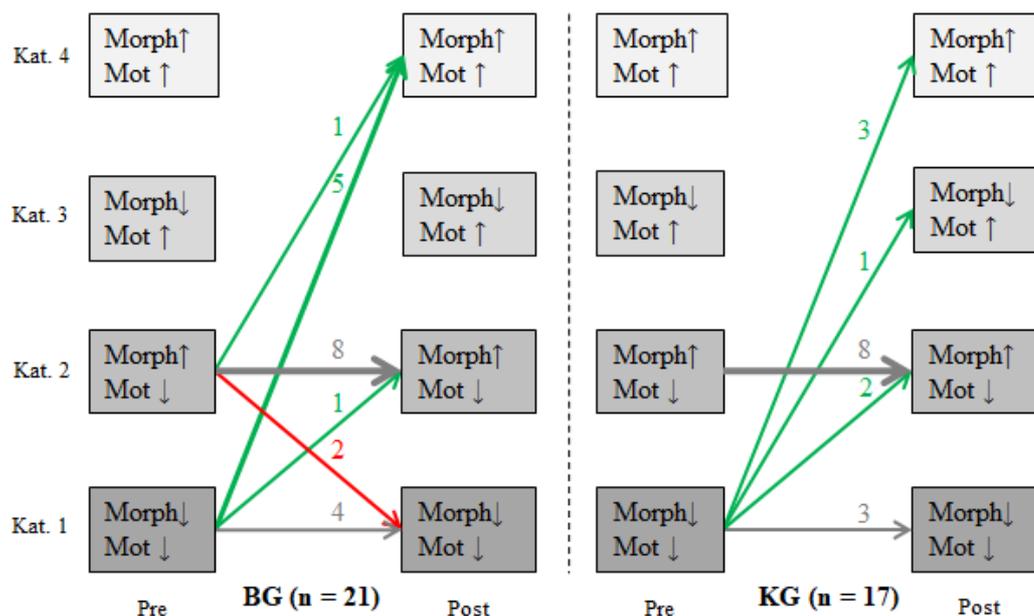


Abbildung 9: Einzeltierentwicklung bezüglich mangelhafter bzw. physiologischer Spermienmotilität und -morphologie

Die farbige Pfeilmarkierung kennzeichnet die Entwicklung einzelner Tiere hinsichtlich der Spermieigenschaften Morphologie und Motilität (Vergleich: vor und nach Intervention): Grüne Pfeile = Verbesserung; graue Pfeile = Gleichbleiben; rote Pfeile = Verschlechterung eines oder beider Parameter. Die Zahlen stellen die jeweilige Anzahl von Tieren dar, die dieselbe Entwicklung erfahren, was außerdem durch die Pfeildicke verdeutlicht wird (je größer die Tierzahl, desto dicker die Pfeillinie).

Abk.: BG: Behandlungsgruppe; Kat: Kategorie; KG: Kontrollgruppe; Morph: Morphologie; Mot: Motilität; Post: nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums); Pre: vor Intervention (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums; Screening-Phase); ↓: mangelhaft; ↑: physiologisch

1.4. Nebenzielparameter

1.4.1. Spermienqualität

1.4.1.1. Zeitreihenanalyse

Mittels einer Zeitreihenanalyse (über 24 Wochen \triangleq Gesamtbeobachtungszeitraum) wurde der Einfluss der Haupteffekte Gruppe, Zeit und Bullenalter und der beiden Interaktionseffekte Zeit * Gruppe sowie Zeit * Bullenalter auf die 14 spermatologischen Nebenzielparameter getestet. Statistische Grundlage hierfür war das GEE (*Generalized Estimating Equations*)-Modell. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 in Form der Regressionskoeffizienten und der dazugehörigen p-Werte dargelegt (Interpretation der Regressionskoeffizienten siehe Tabellenunterschrift). Überdies findet sich im Folgenden eine deskriptive, graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der einzelnen Nebenzielparameter (siehe Abbildung 10 a–n). Die in den Abbildungen aufgeführten Markierungspunkte entsprechen jeweils den Medianwerten aller Einzeltiermediane pro

Studiengruppe und Woche. Die Einzeltiermediane wurden aus allen pro Tier und Woche gewonnenen Spermaproben ermittelt. Die Streuung der Daten, die sich aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in den Graphen wiederfindet, ist in Kap. IX.3 und IX.4 in Form des dem Median zugehörigen Interquartilsabstands berücksichtigt.

Dass sich die beiden Studiengruppen zu Beginn der Intervention in keinem der Spermien-gütemerkmale unterschieden, wird durch die durchgehend nicht-signifikanten Haupteffekte der Gruppe deutlich. Bis auf zwei Ausnahmen erfuhr auch der Zeitverlauf keines der Merkmale einen signifikanten Einfluss durch die Intervention (Interaktion Zeit * Gruppe). Lediglich bezüglich des Prozentsatzes der Spermien mit Schleifenform und distalem Zytoplasmatropfen konnte eine signifikant unterschiedliche Entwicklung über die Zeit zwischen beiden Studiengruppen ausgemacht werden. So war bei Tieren der BG ab dem Zeitpunkt der Intervention eine signifikant geringere Abnahme des Prozentsatzes der Spermien mit Schleifenform (positiver Regressionskoeffizient) sowie eine signifikant stärkere Abnahme des Prozentsatzes der Spermien mit distalem Zytoplasmatropfen (negativer Regressionskoeffizient) über die Zeit nachzuweisen als bei Bullen der KG.

Unabhängig von der Intervention zeigte sich bis auf drei Ausnahmen ein durchweg signifikanter positiver Einfluss durch die Zeit. So verbesserten sich, ausgenommen den Prozentsatz der langsamen Spermien, der Spermien mit Schleifenform sowie der Spermien mit proximalem Zytoplasmatropfen, alle Parameter signifikant über den Gesamtbeobachtungszeitraum. Diese Entwicklung über 24 Wochen ist deskriptiv (anhand der Medianwerte, s. o.) in Abbildung 10 a–n dargestellt. Auch die graphische Auftragung lässt eine Verbesserung der Parameter – unabhängig von der Intervention – über die Zeit erkennen. Auffallend sind zudem insbesondere die starken wöchentlichen Schwankungen, die in beiden Studiengruppen den Verlauf über die Zeit markierten.

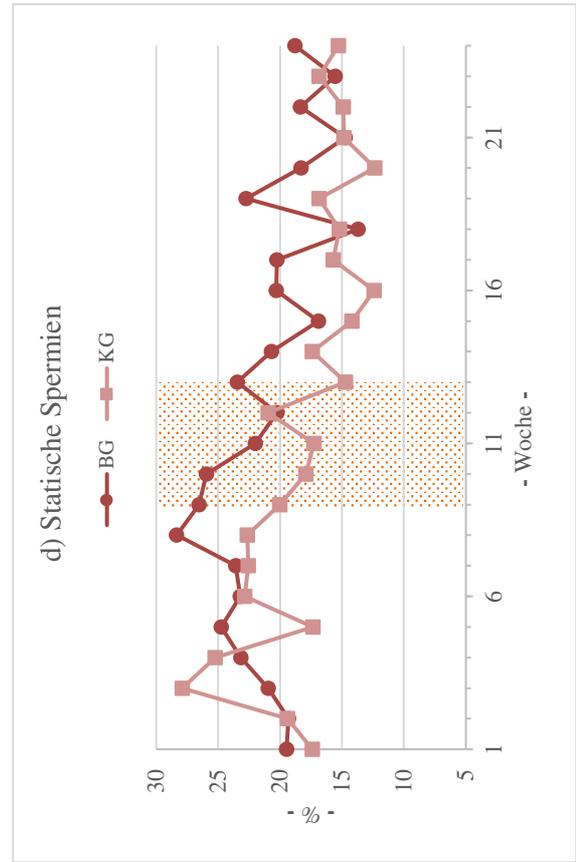
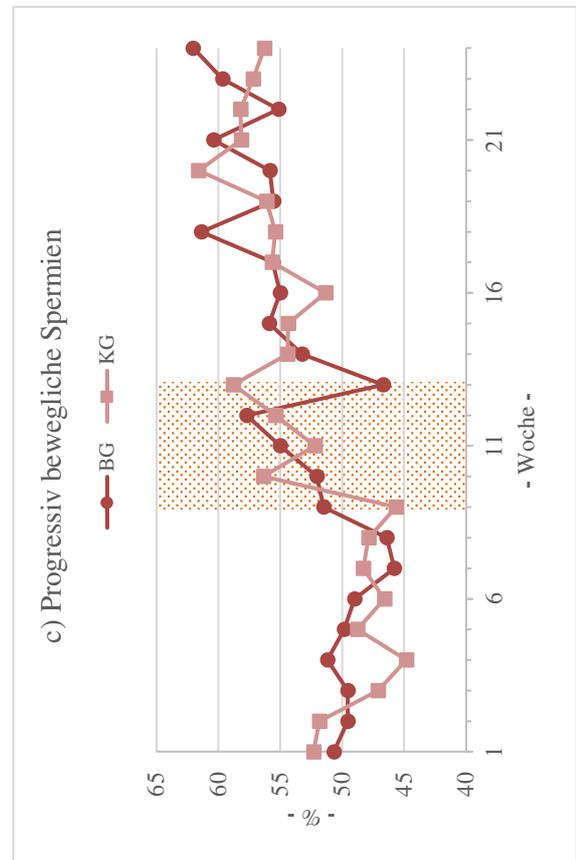
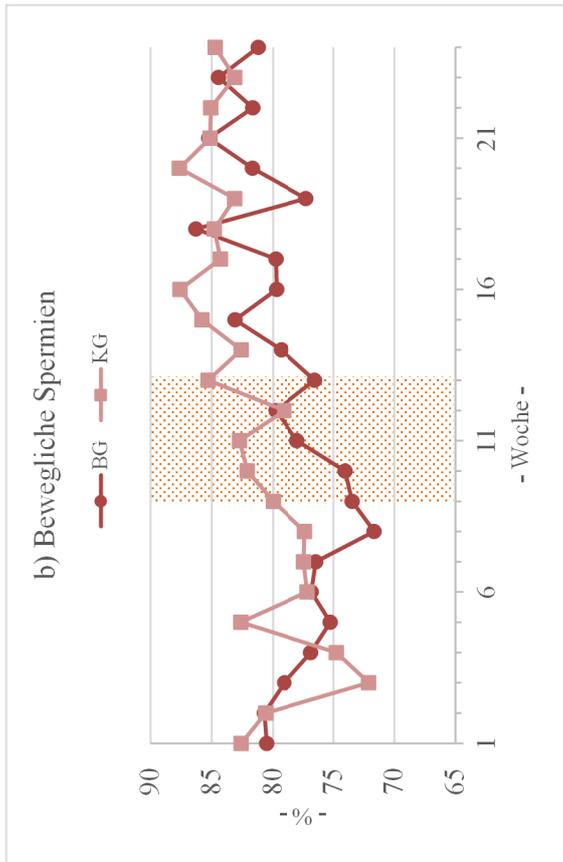
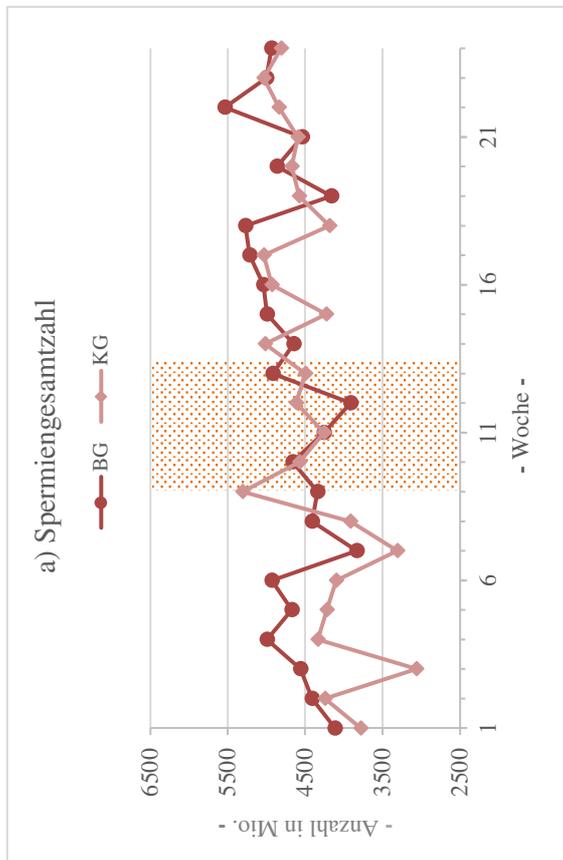
Darüber hinaus wurde für nahezu alle Spermien-gütemerkmale ein signifikanter Einfluss durch das Bullenalter deutlich. Die signifikanten Haupteffekte des Bullenalters zeigen, dass ein höheres Alter mit einer besseren Spermienqualität einhergeht. Bis auf den Anteil der langsamen Spermien, die Kopf-Schlagfrequenz, die Linearität und die Geradlinigkeit war dies bei allen Parametern festzustellen. Allerdings war bei älteren Bullen für einige Spermienparameter ein flacherer Anstieg über die Zeit zu erkennen (*Plateau*-Effekt). Dieses geringere Verbesserungspotential wurde sowohl für die Spermien-gesamtzahl und fünf der sieben Motilitätsparameter (Anteil der beweglichen und der progressiv beweglichen Spermien, Kopf-Schlagfrequenz, Linearität, Geradlinigkeit) deutlich.

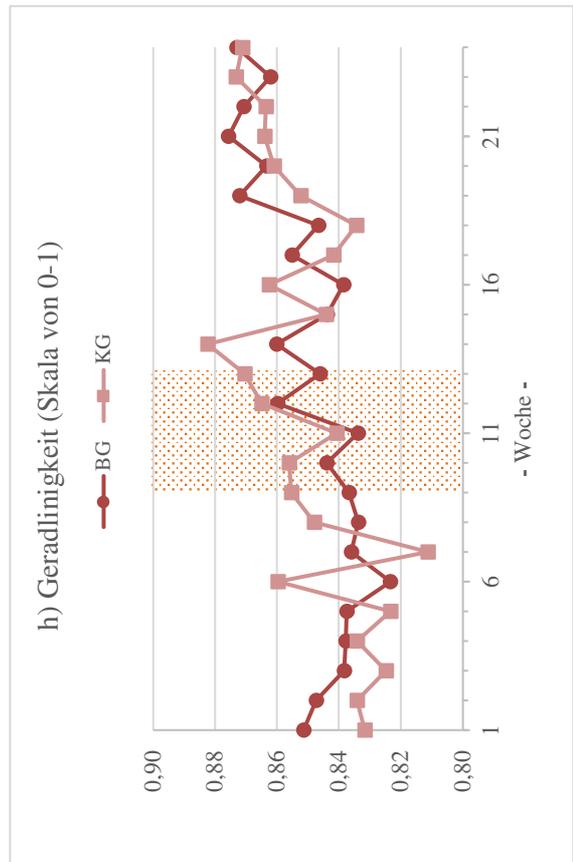
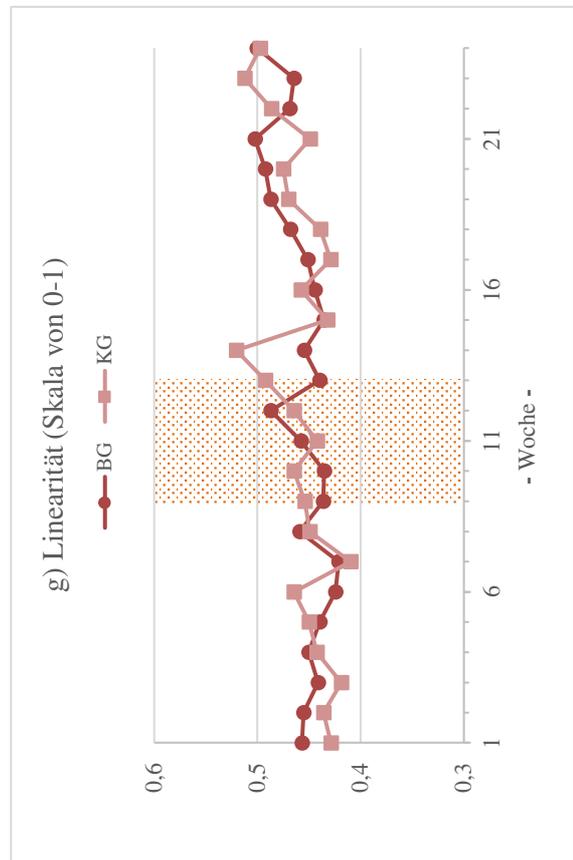
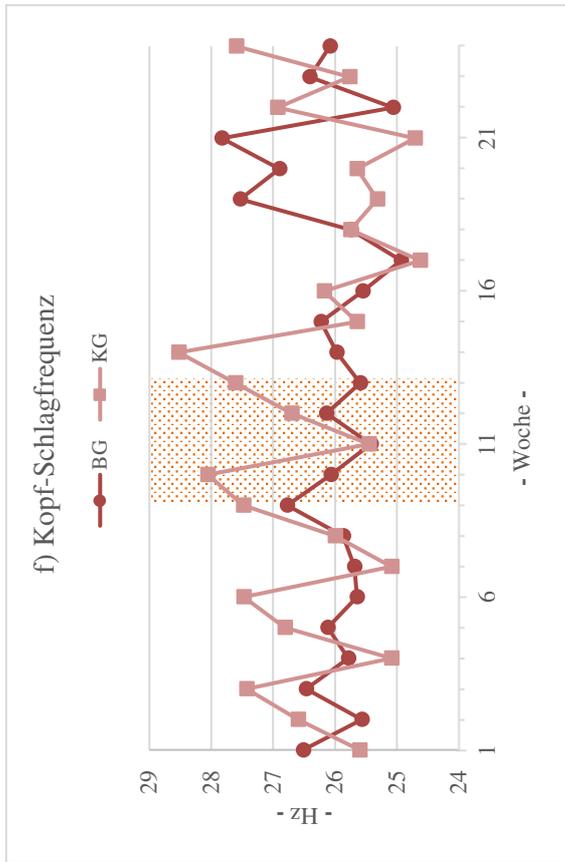
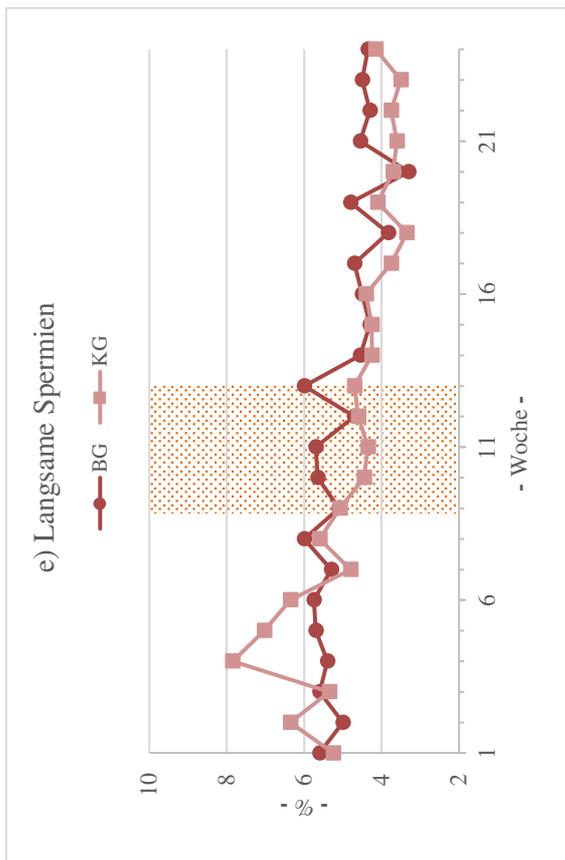
Tabelle 12: Zeitreihenanalyse zur Darstellung des Einflusses der Faktoren Gruppe, Zeit und Bullenalter auf die Nebenzielparame-ter

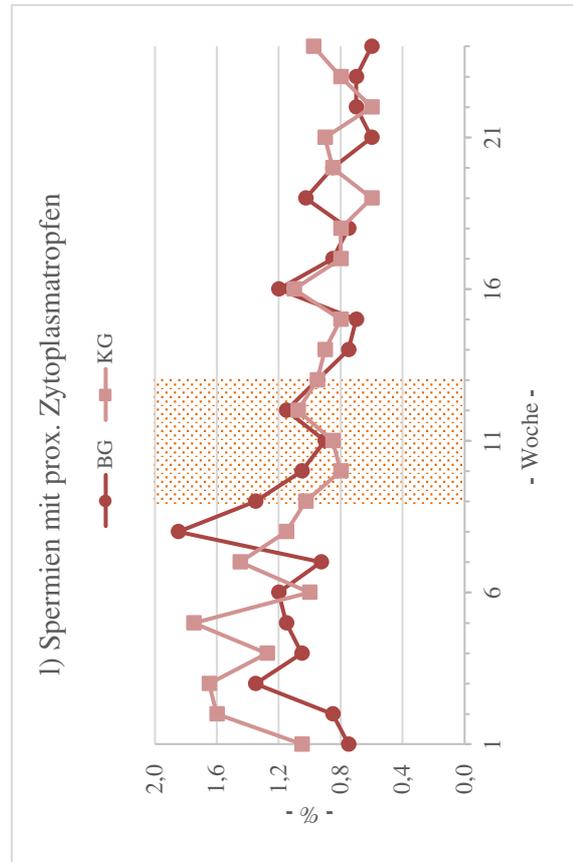
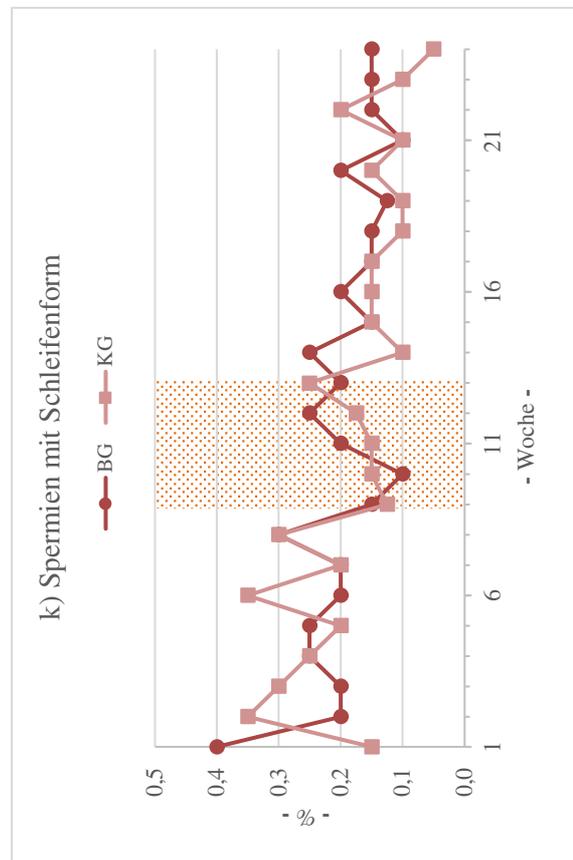
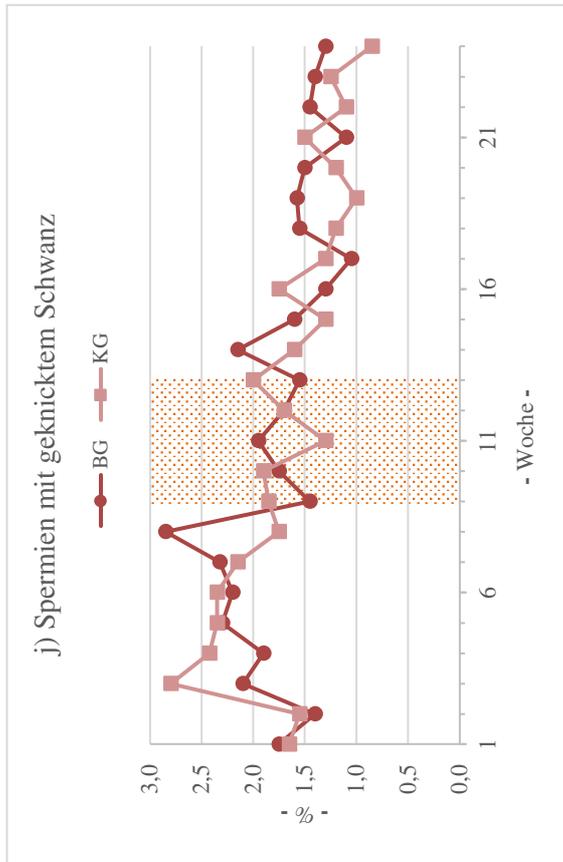
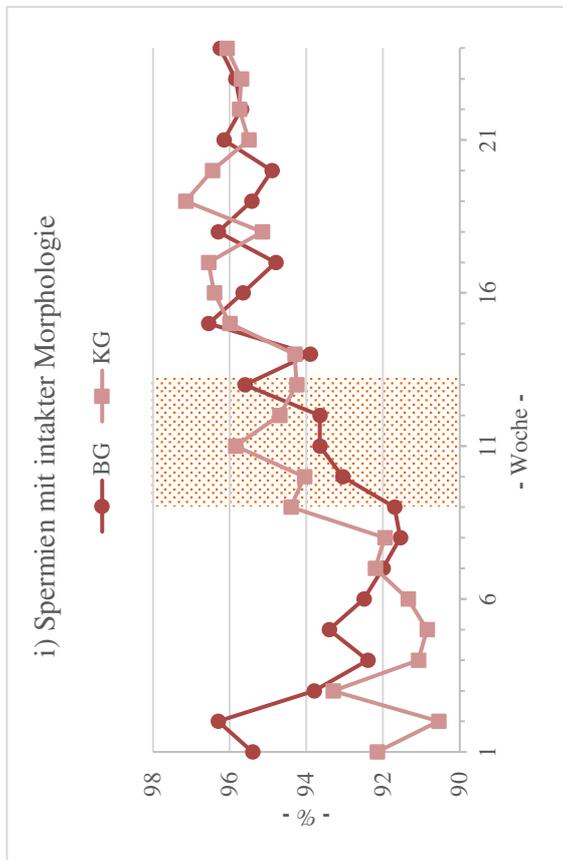
Spermi- parameter	Intercept		Gruppe		Zeit		Bullenalter		Zeit * Gruppe		Zeit * Bullenalter	
	β [95 %-KI]	p-Wert	β [95 %-KI]	p-Wert	β [95 %-KI]	p-Wert	β [95 %-KI]	p-Wert	β [95 %-KI]	p-Wert	β [95 %-KI]	p-Wert
Spermiengesamtzahl (Mio.)	-1111,19 [-3409,26; 1186,88]	0,343	-325,33 [-1068,01; 417,35]	0,391	259,57 [139,35; 379,78]	<0,001**	290,74 [152,07; 429,41]	<0,001**	22,00 [-46,81; 90,81]	0,531	-10,85 [-17,27; -4,43]	0,001**
Bewegliche Spermien (%)	59,74 [49,95; 69,54]	<0,001**	2,29 [-3,44; 8,02]	0,433	0,99 [0,26; 1,73]	0,008**	1,00 [0,36; 1,64]	0,002**	0,08 [-0,65; 0,50]	0,796	-0,05 [-0,09; -6e-3]	0,027*
Progressiv bewegliche Spermien (%)	39,72 [33,36; 46,08]	<0,001**	1,98 [-2,39; 6,35]	0,374	1,32 [0,66; 1,98]	<0,001**	0,53 [0,24; 0,83]	<0,001**	-0,12 [-0,64; 0,40]	0,652	-0,06 [-0,10; 0,01]	0,010**
Statische Spermien (%)	3,80 [3,40; 4,20]	<0,001**	-0,03 [-0,30; 0,24]	0,832	-0,04 [-0,07; -0,01]	0,012*	-0,04 [-0,07; -0,01]	0,016*	-6e-4 [-0,03; 0,03]	0,966	2e-3 [6e-5; 4e-3]	0,058
Langsame Spermien (%)	6,37 [4,03; 8,70]	<0,001**	-0,15 [-1,06; 0,76]	0,750	-0,07 [-0,15; 0,01]	0,096	0,01 [-0,14; 0,16]	0,902	0,03 [-0,04; 0,10]	0,438	-1e-3 [-7e-3; 4e-3]	0,646
Kopf-Schlagfrequenz (Hz)	29,41 [25,06; 33,77]	<0,001**	-0,22 [-1,86; 1,42]	0,792	0,26 [0,03; 0,49]	0,028*	-0,14 [-0,31; 0,04]	0,123	0,02 [-0,16; 0,19]	0,860	-0,01 [-0,02; -3e-3]	0,012*
Linearität (Skala von 0-1)	0,49 [0,41; 0,57]	<0,001**	-0,024 [-0,06; 0,01]	0,172	0,01 [4e-3; 0,01]	<0,001**	-3e-3 [-6e-3; 9e-3]	0,051	2e-3 [-2e-3; 5e-3]	0,371	-3e-4 [-5e-4; -10e-5]	0,003**
Geradlinigkeit (Skala von 0-1)	0,85 [0,81; 0,89]	<0,001**	-4e-3 [-0,02; 0,01]	0,686	3e-3 [1e-3; 6e-3]	0,001**	7e-4 [-2e-3; 2e-3]	0,433	8e-5 [-2e-3; 2e-3]	0,931	-2e-4 [-3e-4; -3e-5]	0,015*
Spermien mit intakter Morphologie (%)	4,41 [4,33; 4,50]	<0,001**	2e-3 [-0,03; 0,02]	0,853	4e-3 [6e-5; 0,01]	0,047*	0,01 [1e-3; 9e-3]	0,011*	-4e-4 [-2e-3; 3e-3]	0,772	-1e-4 [4e-4; 9e-5]	0,248
Spermien mit geknicktem Schwanz (%)	1,49 [1,01; 1,96]	<0,001**	-0,04 [-0,46; 0,37]	0,836	-0,05 [-0,08; -0,01]	0,023*	-0,03 [-0,07; -2e-3]	0,048*	-3e-3 [-0,03; 0,04]	0,895	2e-3 [-1e-3; 4e-3]	0,241
Spermien mit Schleifenform (%)	0,66 [0,33; 1,00]	<0,001**	-0,11 [-0,24; 0,02]	0,105	-0,02 [-0,04; 1e-3]	0,066	-0,02 [-0,04; -2e-3]	0,030*	0,01 [3e-3; 0,02]	0,011*	7e-4 [-2e-4; 2e-3]	0,125
Spermien mit proximalem Zytoplasmotropfen (%)	2,76 [1,56; 4,07]	<0,001**	-0,05 [-0,45; 0,36]	0,829	-0,02 [-0,11; 0,07]	0,624	-0,10 [-0,16; -0,04]	0,001**	0,02 [-0,04; 0,7]	0,554	-4e-5 [-4e-3; 3e-3]	0,984
Spermien mit distalem Zytoplasmotropfen (%)	3,22 [2,44; 4,00]	<0,001**	0,45 [0,03; 0,87]	0,035	-0,08 [-0,13; -0,04]	<0,001**	-0,05 [-0,09; -0,02]	0,006**	-0,04 [-0,07; -2e-3]	0,040*	2e-3 [-1e-3; 4e-3]	0,181
Spermien mit distalem- Mittelstückreflex (%)	4,10 [3,02; 5,19]	<0,001**	0,68 [-0,31; 1,67]	0,179	-0,17 [-0,27; -0,08]	<0,001**	-0,07 [-0,12; -0,03]	0,003**	-0,09 [-0,20; 0,02]	0,115	6e-3 [-1e-3; 0,01]	0,082

*statistisch signifikant auf einem α-Niveau von 5 %; **statistisch signifikant auf einem α-Niveau von 1 %

Dem GEE-Modell liegt folgende Codierung der Gruppenzugehörigkeit zugrunde: BG = 1; KG = 0. Interpretation der β-Regressionskoeffizienten: Intercept: Schnittpunkt mit x-Achse; Gruppe: positive Orientierung (+); höhere Ausgangswerte der BG gegenüber KG zu Interventionsbeginn, negative Orientierung (-); umgekehrt; Zeit: Anstieg (+) bzw. Abfall (-) über die Zeit; Bullenalter: höhere (+) bzw. niedrigere (-) Ausgangswerte älterer Bullen (pro Monat Altersdifferenz) gegenüber jüngeren; Zeit * Gruppe: Anstieg (+) bzw. Abfall (-) über die Zeit der BG gegenüber KG; Zeit * Bullenalter: Anstieg (+) bzw. Abfall (-) über die Zeit bei älteren Bullen (pro Monat Altersdifferenz) gegenüber jüngeren. Abk.: Hz: Hertz; Mio.: Millionen; β: Regressionskoeffizient; 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall; Abkürzungsformel kleiner Zahlen: XeY = X*10^Y







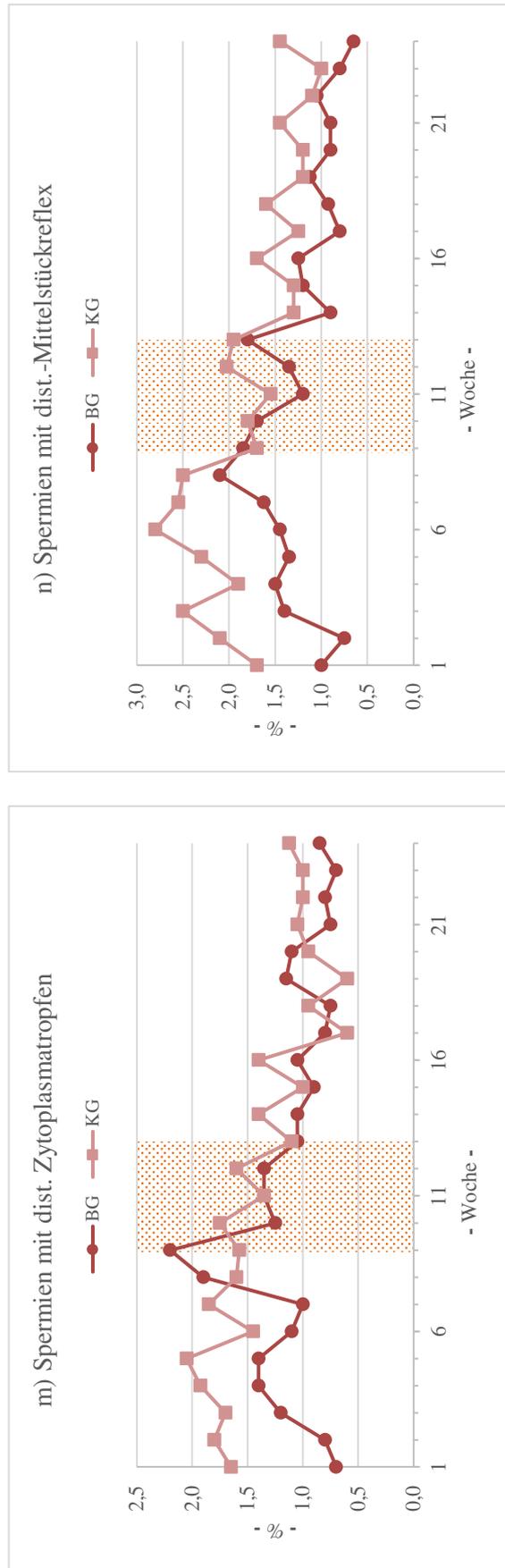


Abbildung 10 a–n: Entwicklung der Spermienparameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum

Die Markierungspunkte entsprechen der Summe aller Einzeltiermediane pro Studiengruppe und Woche. Die Einzeltiermediane wurden aus allen pro Tier und Woche gewonnenen Spermproben ermittelt. Woche 1–8: Screening-Phase; Woche 9: Studieneinschluss; Woche 9–13: Interventionsphase (farbig hinterlegt); Woche 14–24: Nachbeobachtungsphase

Abk.: BG: Behandlungsgruppe; dist.: distal; KG: Kontrollgruppe; prox.: proximal

1.4.1.2. Inter- und Intragruppen-Vergleich vor und nach Intervention

Die über die Screening- (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) und die Nachbeobachtungsphase (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) gemittelten 14 spermatologischen Nebenzielparameter wurden zwischen beiden Studiengruppen verglichen (*Mann-Whitney-U-Test*). Zusätzlich wurde ein Vorher/Nachher-Vergleich innerhalb der Gruppen durchgeführt (*Wilcoxon-Test*) (siehe Tabelle 13).

Im Intergruppenvergleich wurden für keines der Spermengütemerkmale, weder über die Screening- noch über die Nachbeobachtungsphase, Gruppenunterschiede festgestellt.

Im Vorher/Nachher-Vergleich zeigten sich in beiden Studiengruppen ein signifikanter Anstieg des Anteils der progressiv beweglichen Spermien und eine Abnahme des Prozentsatzes der langsamen Spermien sowie der Spermien mit Schleifenform. Zwei Parameter wiesen nur in der BG, nicht aber in der KG eine signifikante Verbesserung auf: So sanken der Anteil der Spermien mit geknicktem Schwanz und der Anteil der Spermien mit distalem Zytoplasmotropfen in der BG; letzteres findet sich ebenfalls in der Zeitreihenanalyse bestätigt. Drei Parameter ließen eine signifikante Verbesserung nur in der KG, nicht aber in der BG erkennen: Spermigesamtzahl (Anstieg), Geradlinigkeit (Anstieg) und Spermien mit proximalem Zytoplasmotropfen (Abnahme). Sechs Parameter wiesen in keiner der beiden Studiengruppen eine signifikante Veränderung auf: Prozentsatz der beweglichen und der statischen Spermien, Kopf-Schlagfrequenz, Linearität, Prozentsatz der morphologisch intakten Spermien und der Spermien mit distalem-Mittelstückreflex.

Tabelle 13: Inter- und intragruppen-Vergleich vor und nach Intervention; Angabe der Werte: Median (IQR)

Die Tabellenwerte entsprechen dem Medianwert aller Einzeltiermediane einer Studiengruppe. Die Einzeltiermediane wurden aus allen Sprüngen eines Tieres pro Studienphase (Pre und Post) ermittelt.

Spermienparameter	V	Pre		Post		Pre/Post p-Wert BG	Pre/Post p-Wert KG
		BG (n = 21)	KG (n = 17)	BG (n = 21)	KG (n = 17)		
Spermienparameter							
Spermiengesamtzahl (Mio.)	↑	4369,56 (2860,53–6387,92)	4056,38 (2284,09–4504,84)	4408,06 (3726,01–6039,84)	4539,93 (3680,04–6091,82)	0,140	0,006*
Bewegliche Spermien (%)	↑	76,80 (67,10–88,05)	80,70 (65,98–87,40)	81,45 (73,98–90,68)	86,25 (72,35–90,80)	0,092	0,227
Progressiv bewegliche Spermien (%)	↑	49,75 (45,63–51,98) [†]	52,10 (40,85–54,38) [†]	54,80 (48,80–63,05) [†]	56,90 (50,18–63,90) [†]	0,008**	0,026*
Statische Spermien (%)	↓	23,20 (11,95–32,90)	19,30 (12,60–34,03)	18,55 (9,33–26,03)	13,75 (9,20–27,65)	0,092	0,227
Langsame Spermien (%)	↓	5,35 (4,65–6,25)	6,55 (4,28–7,53)	4,05 (3,28–5,40)	3,80 (3,10–4,50)	0,001**	0,001**
Kopf-Schlagfrequenz (Hz)	↑	25,83 (23,59–30,20)	25,13 (24,43–29,96)	25,91 (24,36–31,97)	25,32 (23,44–33,80)	0,590	0,831
Linearität (Skala von 0–1)	↑	0,43 (0,40–0,51)	0,42 (0,41–0,52)	0,46 (0,42–0,56)	0,44 (0,40–0,56)	0,339	0,136
Geradlinigkeit (Skala von 0–1)	↑	0,84 (0,80–0,88)	0,83 (0,81–0,87)	0,86 (0,82–0,89)	0,84 (0,83–0,90)	0,217	0,035*
Morphologisch intakte Spermien (%)	↑	94,50 (87,98–97,38) [‡]	91,05 (87,00–96,25) [‡]	96,10 (91,55–97,75) [‡]	96,05 (92,55–97,50) [‡]	0,130	0,136
Spermien mit geknicktem Schwanz (%)	↓	2,20 (1,15–3,05)	1,90 (0,95–3,35)	1,50 (0,75–2,25)	1,15 (0,70–1,85)	0,009**	0,118
Spermien mit Schleifenform (%)	↓	0,25 (0,20–0,33)	0,30 (0,15–0,40)	0,20 (0,03–0,30)	0,10 (0,00–0,20)	0,037*	0,013*
Spermien mit PZT (%)	↓	1,05 (0,65–3,48)	1,20 (0,75–3,88)	0,85 (0,40–2,03)	0,85 (0,45–2,10)	0,064	0,033*
Spermien mit DZT (%)	↓	1,20 (0,73–1,75)	1,60 (0,90–2,30)	0,95 (0,45–1,60)	0,90 (0,58–1,95)	0,016*	0,205
Spermien mit DMR (%)	↓	1,20 (0,70–3,55)	2,10 (1,05–3,28)	0,70 (0,60–2,05)	1,30 (0,73–1,85)	0,068	0,381

*statistisch signifikant auf einem α -Niveau von 5 %; **statistisch signifikant auf einem α -Niveau von 1 %; †mangelhaft gemäß den Grenzwerten der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“; ‡physiologisch gemäß den Grenzwerten der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“

Abk.: BG: Behandlungsgruppe; DRM: distaler-Mittelstückreflex; DZT: distaler Zyttoplasmatrophen; Hz: Hertz; IQR: *interquartile range* (dt.: Interquartilsabstand); KG: Kontrollgruppe; Mio.: Millionen; n: Fallzahl; Post: nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums); Pre: vor Intervention (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums); PZT: proximaler Zyttoplasmatrophen; V: Verbesserung des Parameters; ↑: bei Wertzunahme; ↓: bei Wertabnahme

1.4.2. Libido

Als weitere Nebenzielparameter wurden die Reaktionszeit der Bullen bis zum Aufsprung sowie die Annahme der Sprungpartner im Rahmen der Spermagewinnung deskriptiv sowie mittels Zeitreihenanalyse (vgl. Kap. IV.1.4.1.1) über einen Zeitraum von 16 Wochen (\cong Interventions- und Nachbeobachtungsphase) untersucht.

1.4.2.1. Reaktionszeit

Tabelle 14 liefert eine deskriptive Darstellung der Gesamtzahl von Sprüngen (im Rahmen der Spermagewinnung) und deren unterschiedliche Reaktionszeiten innerhalb der Gruppen während (9.–13. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) sowie nach der Interventionsphase (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums). Der Übersicht ist zu entnehmen, dass in beiden Untersuchungszeiträumen der Hauptteil der Sprünge in beiden Studiengruppen (83,6–95,7 %) mit einer Reaktionszeit von weniger als 0,5 Minuten (sehr gute Libido) erfolgte. Bei einer geringen Anzahl an Sprüngen (3,3–15,8 %) betrug die Reaktionszeit 0,5–5 Minuten (gute Libido). Die Reaktionszeit von 5–10 Minuten (ausreichende Libido) trat kaum (0,3–1,5 %), die Reaktionszeit von 10–30 Minuten (Libidoschwäche) nie auf. Weder während noch nach der Interventionsphase war ein relevanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen zu erkennen.

Tabelle 14: Reaktionszeit im Rahmen der Spermagewinnung im Zeitraum während und nach der Intervention

Dargestellt ist die Anzahl der Sprünge (absolut und in %) sowie die Anzahl der betroffenen Tiere [absolut und in %] pro Studiengruppe und Studienphase mit entsprechender Reaktionszeit.

Reaktionszeit	Interv		Post		Gesamt (n = 38)
	BG (n = 21)	KG (n = 17)	BG (n = 21)	KG (n = 17)	
0–0,5 min.	161 (89,9 %) [21 (100 %)]	127 (83,6 %) [17 (100 %)]	311 (95,7 %) [21 (100 %)]	261 (95,2 %) [17 (100 %)]	860 (92,5 %) [38 (100 %)]
0,5–5 min.	17 (9,5 %) [5 (23,8 %)]	24 (15,8 %) [6 (35,3 %)]	13 (4 %) [6 (28,6 %)]	9 (3,3 %) [4 (23,6 %)]	63(6,8 %) [16 (42,1 %)]
5–10 min.	1 (0,6 %) [1 (4,8 %)]	1 (0,6 %) [1 (5,9 %)]	1 (0,3 %) [1 (4,8 %)]	4 (1,5 %) [3 (17,6 %)]	7 (0,7 %) [6 (15,9 %)]
10–30 min.	0 (0 %) [0 (0 %)]				
Gesamt	179 (100 %) [21 (100 %)]	152 (100 %) [17 (100 %)]	325 (100 %) [21 (100 %)]	274 (100 %) [17 (100 %)]	930 (100 %) [38 (100 %)]

Abk.: BG: Behandlungsgruppe; Interv: während Intervention (9.–13. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums); KG: Kontrollgruppe; min.: Minuten; n: Fallzahl; Post: nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums)

Diese deskriptiven Ergebnisse spiegeln sich auch in denen der Zeitreihenanalyse wider: Gemessen ab Beginn der Erhebung der Libido (9. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) war kein signifikanter Unterschied der Dauer der Reaktionszeit zwischen der BG und der KG festzustellen (Gruppe: β [95 %-KI] = -1,23 [-4,2; 1,7]; $p = 0,411$). Auch zeigte sich zwischen den beiden Gruppen keine signifikant unterschiedliche Entwicklung der Reaktionszeit über die Zeit (Interaktionseffekt Gruppe * Zeit: β [95 %-KI] = -0,07 [-0,1; 0,3]; $p = 0,466$). Ebenfalls ließ sich kein signifikanter Einfluss der Zeit und des Bullenalters auf die Reaktionszeit ermitteln: Zeit: β [95 %-KI] = -0,16 [-0,5; 0,2]; $p = 0,413$; Bullenalter: β [95 %-KI] = 0,03 [-0,2; 0,3]; $p = 0,810$; Interaktionseffekt Bullenalter * Zeit: β [95 %-KI] = 0,01 [-0,008; 0,020]; $p = 0,395$.

1.4.2.2. Annahme der Sprungpartner

Die den Bullen im Rahmen der Spermagewinnung angebotenen Sprungpartner wurden in beiden Untersuchungszeiträumen von allen Tieren uneingeschränkt angenommen. Sowohl die Bullen der BG als auch der KG wiesen dahingehend zu jedem Messzeitpunkt eine ungestörte Libido auf.

2. Kohortenstudie

2.1. Charakteristika des Probandenkollektivs und Datenerhebung

Neben der randomisiert kontrollierten Studie (Hauptstudie) wurde überdies eine Kohortenstudie zur Untersuchung von Akupunkturergebnissen bei Tieren mit guter Spermienqualität (Definition siehe Kap. III.2.1.) durchgeführt. Die im Studienprotokoll ursprünglich festgesetzte Anzahl von zehn Tieren wurde im Verlauf der Studie anlässlich des Ausschlusses eines Tieres (Erkrankung während der Interventionsphase; Pneumonie) um ein Tier erhöht, sodass innerhalb des Rekrutierungszeitraums (05.12.2016–15.05.2017) elf Jungbullen in die Studie eingeschlossen wurden. Aufgrund eines weiteren Ausschlusses (Schlachtung fünf Wochen vor Ende des Gesamtbeobachtungszeitraums aufgrund von Zuchtwertverschlechterung (unabhängig von der Spermienqualität)) wurden letztendlich neun Bullen in die Datenanalyse einbezogen, von denen ein Tier ebenfalls aufgrund von Zuchtwertverschlechterung vorzeitig geschlachtet, aber in der Analyse berücksichtigt wurde (*lost to follow-up* drei Wochen vor Ende des Gesamtbeobachtungszeitraums).

Das mediane Alter der Bullen betrug bei Studieneinschluss (zum Zeitpunkt der Tierausswahl) 16 Monate (Min: 13, Max: 23). Eine Kategorisierung nach Altersgruppen ergibt folgende Verteilung: < 15 Monate: drei Tiere; 15–19 Monate: fünf Tiere; ≥ 20 Monate: ein

Tier.

Die Akupunkturbehandlung erfolgte prüfplankonform zweimal pro Woche pro Bulle über einen Zeitraum von fünf Wochen (Min: 30 Tage, Max: 31 Tage). Der Abstand zwischen zwei Behandlungen betrug im Durchschnitt 3,4 Tage (Min: 1, Max: 7). Die Spermagewinnung erfolgte, wie auch in der randomisiert kontrollierten Studie, durchschnittlich zweimal pro Woche. Pro Tier wurden im Mittel während der Screening-Phase 15 Proben (Min: 12, Max: 17), während der Interventions-Phase neun Proben (Min: 8, Max: 10) und während der Nachbeobachtungs-Phase 22 Proben (Min: 16, Max: 24) gewonnen. Im Gesamtbeobachtungszeitraum von 24 Wochen entspricht dies einer durchschnittlichen Probenanzahl von 46 Proben (Min: 41, Max: 49).

2.2. Spermienqualität

2.2.1. Zeitreihenanalyse

Die Entwicklung der Spermienparameter über die Zeit der „guten Kohorte“ wurde mittels Zeitreihenanalyse (über 24 Wochen \triangleq Gesamtbeobachtungszeitraum) getestet, wobei auch der Einfluss des Bullenalters berücksichtigt wurde. Die geringe Fallzahl erlaubte keine komplexen Modelle. Daher konnte neben dem Einfluss der Zeit nur der Haupteffekt des Bullenalters, nicht aber die Interaktion zwischen Alter und Zeit berücksichtigt werden. Der Haupteffekt des Bullenalters kann als mittlerer Einfluss des Alters über den gesamten Untersuchungszeitraum interpretiert werden. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabelle 15 dargelegt. Außerdem findet sich in Abbildung 11 a–n eine deskriptive, graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der einzelnen Parameter. Wie auch in Abbildung 10 a–n entsprechen die aufgeführten Markierungspunkte jeweils den Medianwerten aller Einzeltiermediane pro Studiengruppe und Woche. Die Streuung der Daten, die sich aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in den Graphen wiederfindet, ist in Kap. IX.5 in Form des dem Median zugehörigen Interquartilsabstands berücksichtigt.

Bis auf den Prozentsatz der Spermien mit Schleifenform zeigten alle Parameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum von 24 Wochen hinweg eine signifikante Verbesserung über die Zeit. Ein signifikanter Einfluss durch das Bullenalter zeigte sich lediglich für den Prozentsatz der Spermien mit Schleifenform, wobei ältere Bullen bessere Werte aufwiesen als jüngere Tiere. Auch die graphische Auftragung lässt eine Verbesserung der Parameter über die Zeit erkennen. Auffallend sind zudem insbesondere die starken wöchentlichen Schwankungen, die den Verlauf über die Zeit markierten.

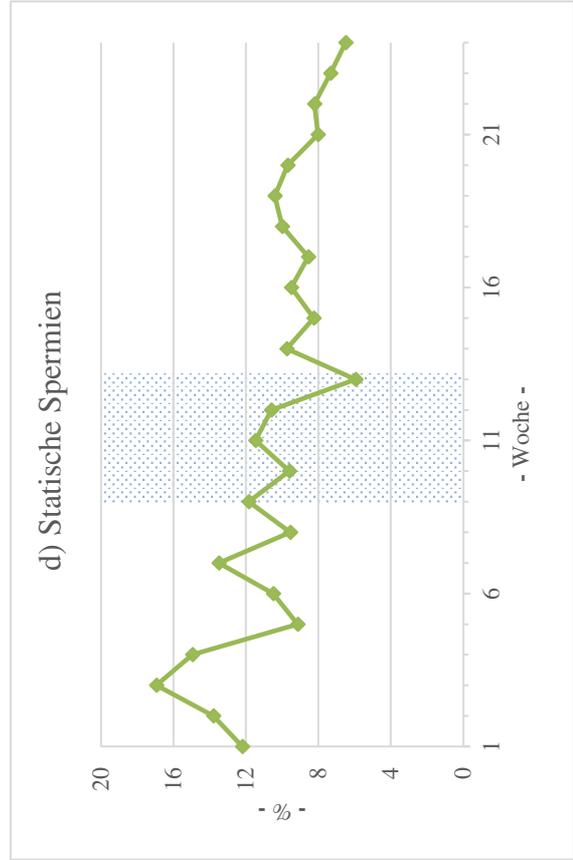
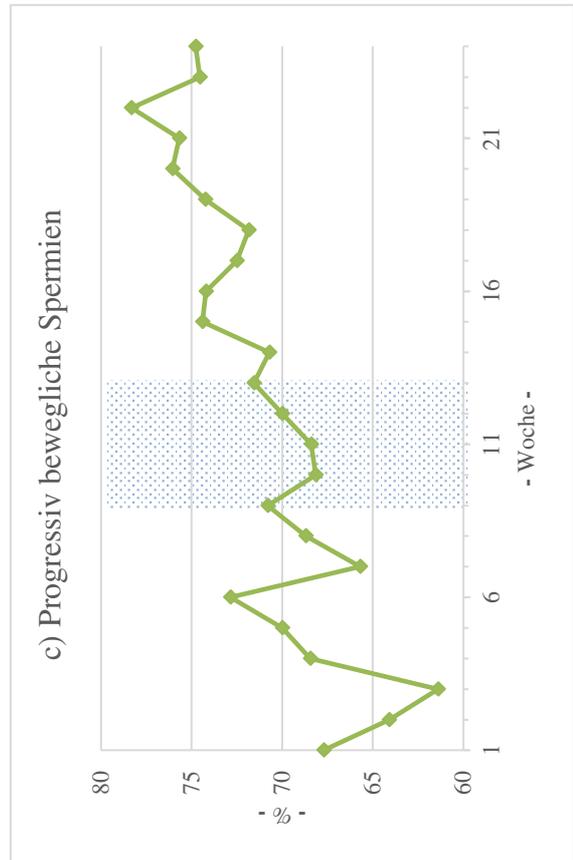
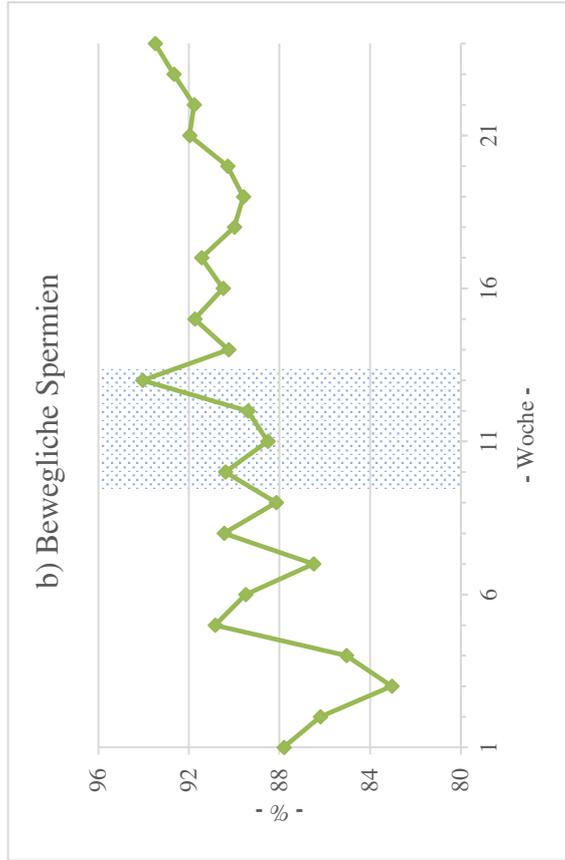
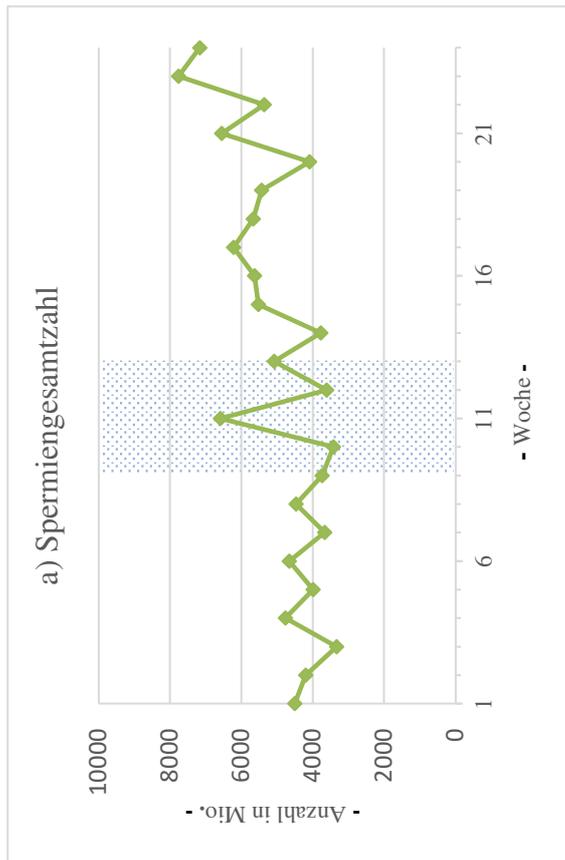
Tabelle 15: Zeitreihenanalyse zur Darstellung des Einflusses der Faktoren Zeit und Bullenalter – gute Kohorte

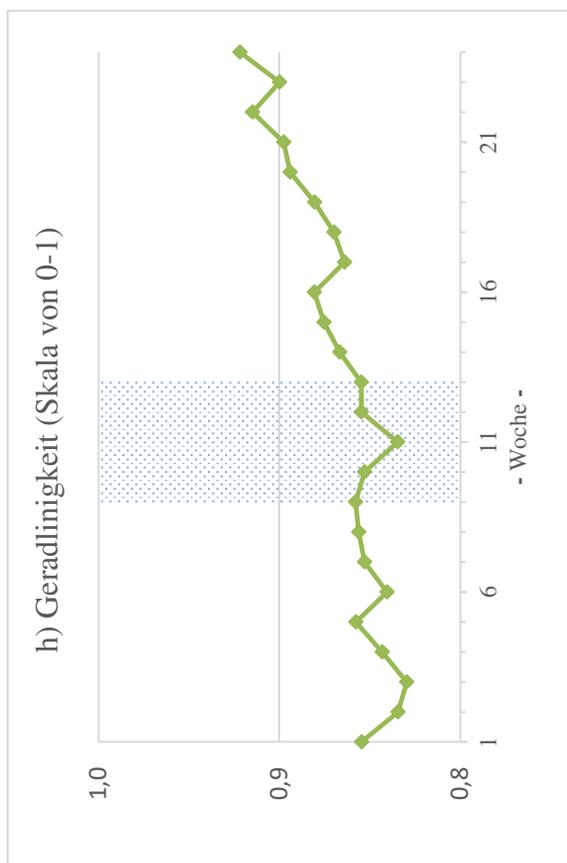
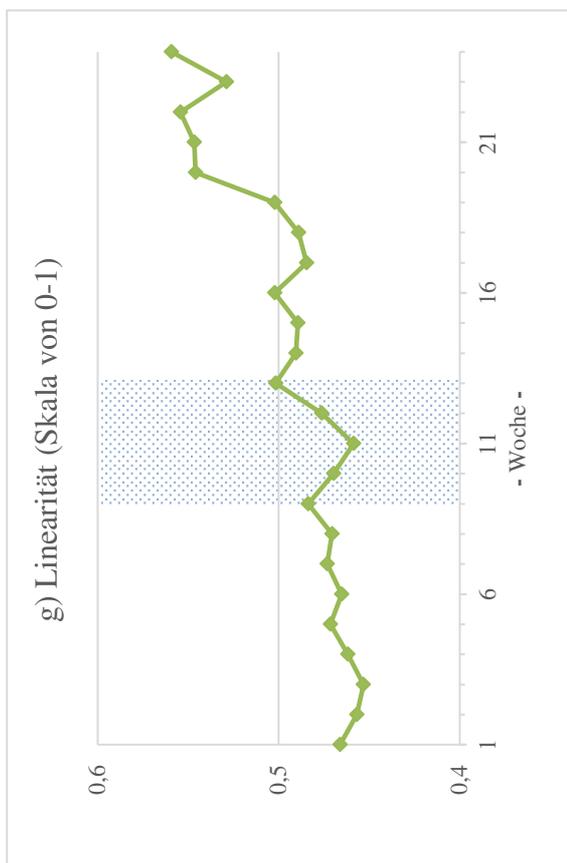
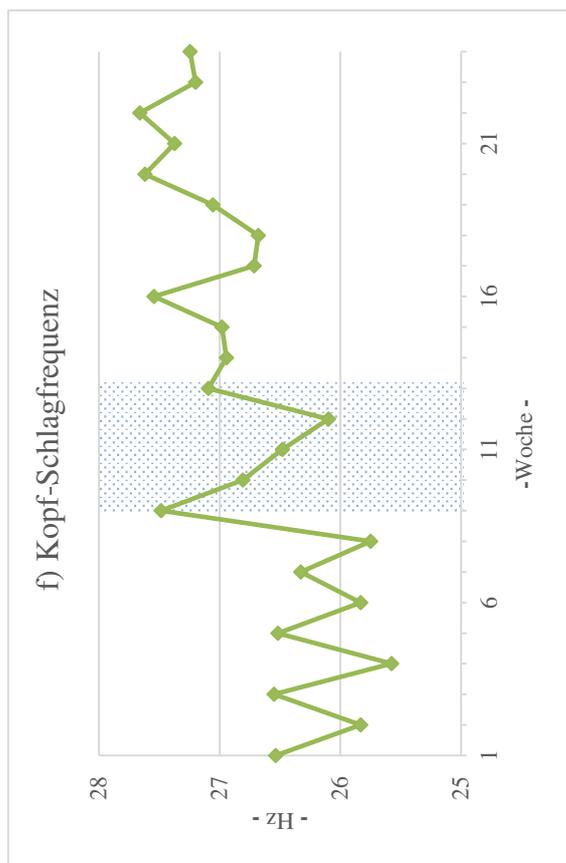
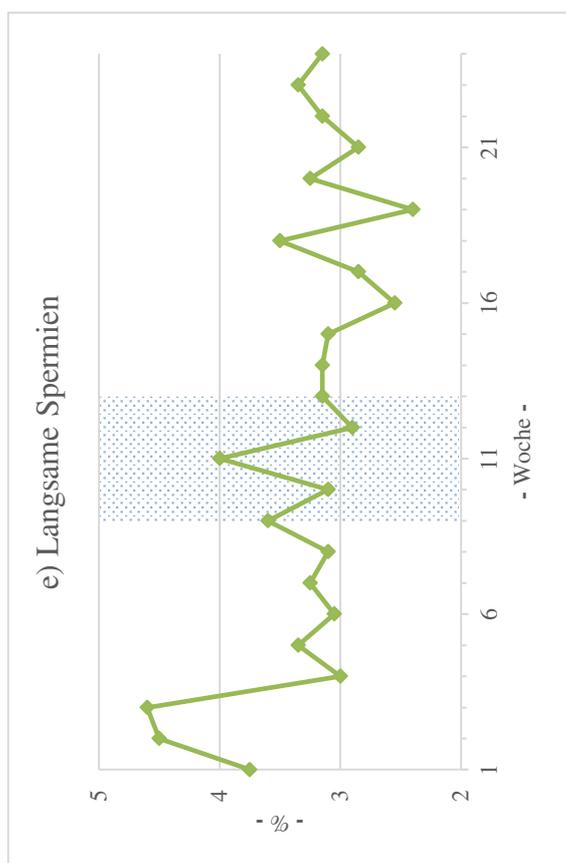
Spermiensparameter	Intercept		Zeit		Bullenalter	
	β [95 %-KI]	p-Wert	β [95 %-KI]	p-Wert	β [95 %-KI]	p-Wert
Spermiengesamtzahl (Mio.)	387,95 [-5355,84; 6131,73]	0,895	87,66 [34,65; 140,67]	0,001**	238,70 [-119,37; 596,78]	0,191
Bewegliche Spermien (%)	88,08 [80,25; 95,91]	< 0,001**	0,22 [0,07; 0,37]	0,003**	-0,09 [-0,49; 0,30]	0,649
Progressiv bewegliche Spermien (%)	63,77 [58,17; 69,37]	< 0,001**	0,44 [0,32; 0,56]	< 0,001**	0,08 [-0,25; 0,42]	0,618
Statische Spermien (%)	2,51 [1,82; 3,19]	< 0,001**	-0,02 [-0,03; -6e-3]	0,005**	6e-3 [-0,03; 0,04]	0,743
Langsame Spermien (%)	4,47 [3,15; 5,79]	< 0,001**	-0,05 [-0,08; -0,01]	0,007**	-0,03 [-0,15; 0,05]	0,450
Kopf-Schlagfrequenz (Hz)	25,09 [19,88; 30,31]	< 0,001**	0,08 0,02; 0,14	0,014*	0,08 [-0,20; 0,36]	0,590
Linearität (Skala von 0–1)	0,50 [0,37; 0,62]	< 0,001**	4e-3 [2e-3; 6e-3]	< 0,001**	-2e-3 [-9e-3; 5e-3]	0,539
Geradlinigkeit (Skala von 0–1)	0,87 [0,81; 0,93]	< 0,001**	2e-3 [1e-3; 3e-3]	< 0,001**	-1e-3 [-4e-3; 3e-3]	0,716
Spermien mit intakter Morphologie (%)	4,55 [4,53; 4,58]	< 0,001**	1e-3 [4e-4; 1e-3]	< 0,001**	9e-4 [-2e-4; 2e-3]	0,105
Spermien mit geknicktem Schwanz (%)	0,60 [-0,14; 1,35]	0,111	-0,03 [-0,04; -7e-3]	0,006**	-0,03 [-0,06; 2e-3]	0,067
Spermien mit Schleifenform (%)	0,49 [0,19; 0,79]	0,001**	-3e-3 [-0,01; 4e-3]	0,345	-0,02 [-0,03; -5e-3]	0,006**
Spermien mit PZT (%)	-0,03 [-0,63; 0,56]	0,913	-0,03 [-0,04; -0,02]	< 0,001**	-0,03 [-0,06; 3e-3]	0,079
Spermien mit DZT (%)	1,57 [0,60; 2,55]	0,002**	-0,03 [-0,05; -2e-3]	0,038*	-0,03 [-0,06; 1e-3]	0,059
Spermien mit DMR (%)	1,27 [0,49; 2,05]	0,001**	-0,02 [-0,04; -6e-3]	0,006**	-0,02 [-0,06; 0,02]	0,327

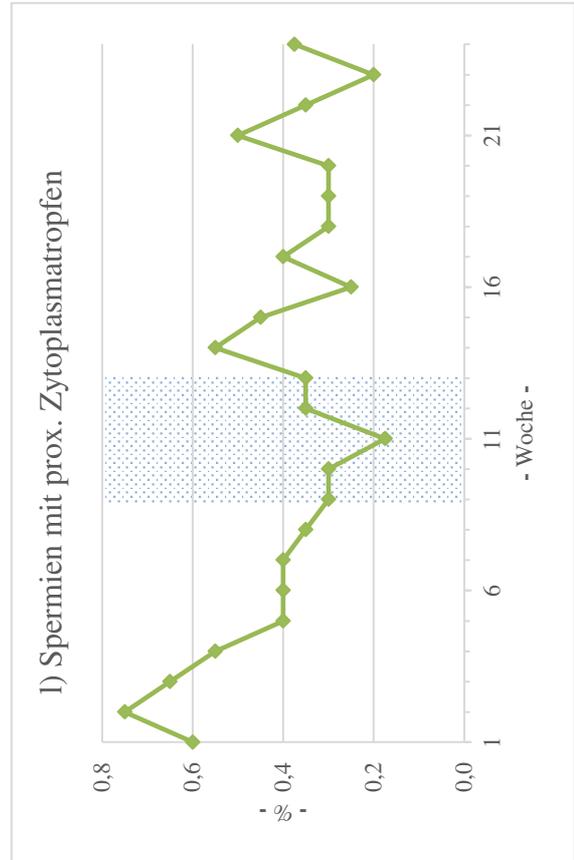
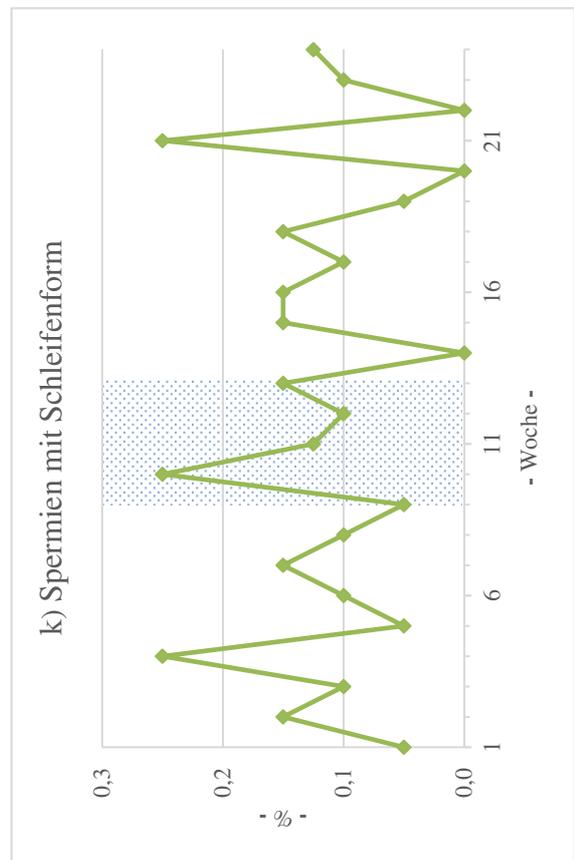
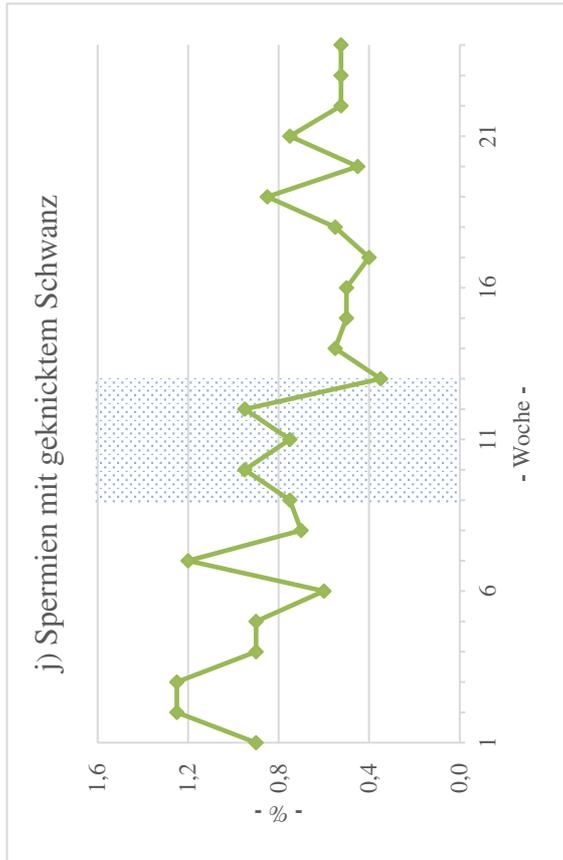
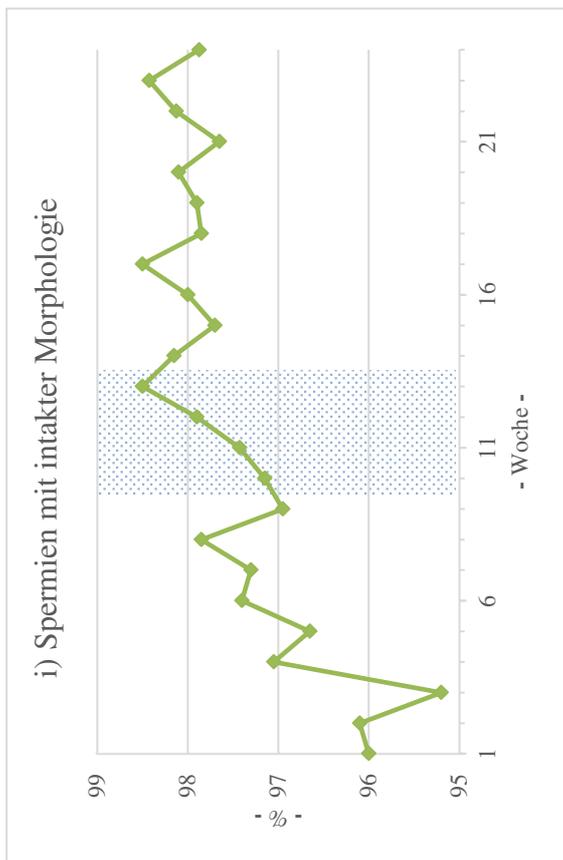
*statistisch signifikant auf einem α -Niveau von 5 %; **statistisch signifikant auf einem α -Niveau von 1 %

Interpretation der β -Regressionskoeffizienten: Intercept: Schnittpunkt mit x-Achse; Zeit: positive Orientierung (+); Anstieg über die Zeit, negative Orientierung (-); Abfall über die Zeit; Bullenalter: höhere (+) bzw. niedrigere (-) Ausgangswerte älterer Bullen (pro Monat Altersdifferenz) gegenüber jüngeren

Abk.: DMR: distaler Mittelstückreflex; DZT: distaler Zytoplasmotropfen; Hz: Hertz; Mio.: Millionen; PZT: proximaler Zytoplasmotropfen; β : Regressionskoeffizient; 95 %-KI: 95 %-Konfidenzintervall; Abkürzungsformel kleiner Zahlen: XeY = X*10^Y







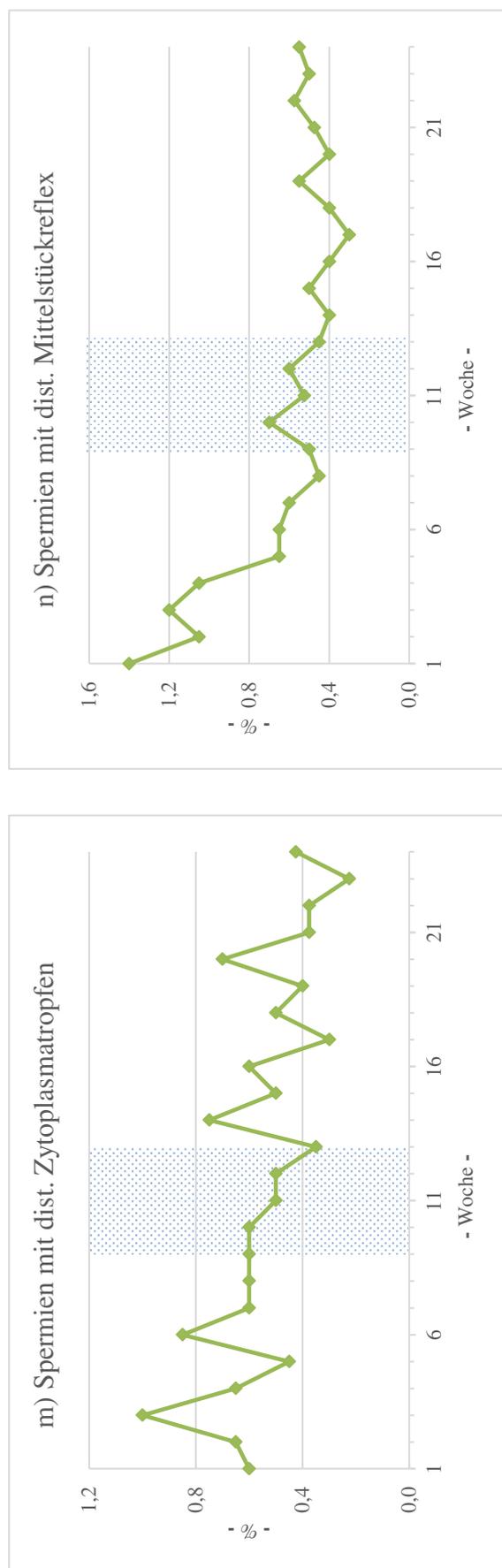


Abbildung 11 a–n: Entwicklung der Spermienparameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum – gute Kohorte

Die Markierungspunkte entsprechen der Summe aller Einzeltiermediane pro Studiengruppe und Woche. Die Einzeltiermediane wurden aus allen pro Tier und Woche gewonnenen Spermproben ermittelt. Woche 1–8: Screening-Phase; Woche 9: Studieneinschluss; Woche 9–13: Interventionsphase (farbig hinterlegt); Woche 14–24: Nachbeobachtungsphase

Abk.: prox: proximal; dist: distal

2.2.2. Vergleich vor und nach der Intervention

Die 14 Spermieparameter wurden zwischen den Zeiträumen vor (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) und nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) verglichen (*Wilcoxon-Test*) (siehe Tabelle 16).

Bis auf zwei Ausnahmen (Kopf-Schlagfrequenz und Prozentsatz der Spermien mit Schleifenform) war im Mittel für alle Merkmale im Nachbeobachtungszeitraum eine signifikante Verbesserung der Werte im Vergleich zur Screening-Phase zu erkennen.

Tabelle 16: Vergleich der Spermienparameter zwischen den Zeiträumen vor und nach Intervention; Angabe der Werte: Median (IQR) – gute Kohorte

Die Tabellenwerte entsprechen dem Medianwert aus allen Einzeltiermedianen. Die Einzeltiermediane wurden aus allen Sprüngen eines Tieres pro Studienphase (Pre und Post) ermittelt.

Spermienparameter	V	Pre (n = 9)	Post (n = 9)	p-Wert
Spermiengesamtzahl (Mio.)	↑	3964,31 (2835,51–6190,01)	5795,47 (3571,90–6719,76)	0,011*
Bewegliche Spermien (%)	↑	87,40 (85,23–90,78)	92,10 (88,85–93,65)	0,008*
Progressiv bewegliche Spermien (%)	↑	67,65 (66,43–67,90) [†]	75,00 (69,58–77,35) [†]	0,011*
Statische Spermien (%)	↓	12,60 (9,23–14,78)	7,90 (6,35–11,18)	0,008*
Langsame Spermien (%)	↓	3,25 (3,05–4,73)	2,90 (2,50–3,45)	0,042*
Kopf-Schlagfrequenz (Hz)	↑	26,36 (24,71–27,99)	27,31 (26,05–29,04)	0,374
Linearität (Skala von 0–1)	↑	0,47 (0,47–0,49)	0,49 (0,48–0,59)	0,028*
Geradlinigkeit (Skala von 0–1)	↑	0,87 (0,85–0,88)	0,88 (0,87–0,92)	0,008*
Morphologisch intakte Spermien (%)	↑	96,90 (95,83–98,23) [†]	97,80 (97,65–98,70) [†]	0,008*
Spermien mit geknicktem Schwanz (%)	↓	0,85 (0,58–1,18)	0,65 (0,28–0,70)	0,017*
Spermien mit Schleifenform (%)	↓	0,10 (0,00–0,25)	0,00 (0,00–0,08)	0,080
Spermien mit PZT (%)	↓	0,50 (0,38–0,68)	0,30 (0,30–0,35)	0,011*
Spermien mit DZT (%)	↓	0,70 (0,40–1,00)	0,35 (0,28–0,55)	0,012*
Spermien mit DMR (%)	↓	0,80 (0,43–1,13)	0,50 (0,25–0,70)	0,010*

*statistisch signifikant auf einem α -Niveau von 5 %; [†]physiologisch gemäß den Grenzwerten der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“

Abk.: DRM: distaler-Mittelstückreflex; DZT: distaler Zytoplasmotropfen; Hz: Hertz; IQR: *interquartile range* (dt.: Interquartilsabstand); Mio.: Millionen; n: Fallzahl; Post: nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums); Pre: vor Intervention (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums); PZT: proximaler Zytoplasmotropfen; V: Verbesserung des Parameters; ↑: bei Wertzunahme; ↓: bei Wertabnahme

2.3. Libido

Die Reaktionszeit der Bullen bis zum Aufsprung sowie die Annahme der Sprungpartner im Rahmen der Spermagewinnung wurden deskriptiv sowie mittels Zeitreihenanalyse (vgl. Kap. IV.1.4.1.1) über einen Zeitraum von 16 Wochen (\cong Interventions- und Nachbeobachtungsphase) untersucht.

2.3.1. Reaktionszeit

Tabelle 17 liefert eine deskriptive Darstellung der Gesamtzahl von Sprüngen im Rahmen der Spermagewinnung und deren unterschiedliche Reaktionszeiten während (9.–13. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) sowie nach der Interventionsphase (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums). Der Tabelle ist zu entnehmen, dass in beiden Untersuchungszeiträumen beinahe alle Sprünge (98,5–98,7 %) mit einer Reaktionszeit von weniger als 0,5 Minuten (sehr gute Libido) erfolgten. Nur bei einem marginalen Anteil der Sprünge (1,3–1,5 %) betrug die Reaktionszeit 0,5–5 Minuten (gute Libido). Die Reaktionszeiten von 5–10 Minuten (ausreichende Libido) und 10–30 Minuten (Libidoschwäche) traten nie auf. Deskriptiv war somit kein Unterschied der Reaktionszeit zwischen den zwei Studienphasen zu erkennen.

Tabelle 17: Reaktionszeit im Rahmen der Spermagewinnung im Zeitraum während und nach der Intervention – gute Kohorte

Dargestellt ist die Anzahl der Sprünge (absolut und in %) sowie die Anzahl der betroffenen Tiere [absolut und in %] pro Studienphase mit entsprechender Reaktionszeit.

Reaktionszeit	Interv (n = 9)	Post (n = 9)	Gesamt (n = 9)
0–0,5 min.	77 (98,7 %) [9 (100 %)]	133 (98,5 %) [9 (100 %)]	210 (98,6 %) [9 (100 %)]
0,5–5 min.	1 (1,3 %) [1 (11,1 %)]	2 (1,5 %) [2 (22,2 %)]	3 (1,4 %) [3 (33,3 %)]
5–10 min.	0 (0 %) [0 (0 %)]	0 (0 %) [0 (0 %)]	0 (0 %) [0 (0 %)]
10–30 min.	0 (0 %) [0 (0 %)]	0 (0 %) [0 (0 %)]	0 (0 %) [0 (0 %)]
Gesamt	78 (100 %) [9 (100 %)]	135 (100 %) [9 (100 %)]	213 (100 %) [9 (100 %)]

Abk.: Interv: während Intervention (9.–13. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums); min.: Minuten; n: Fallzahl; Post: nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums)

Diese deskriptiven Ergebnisse spiegeln sich auch in denen der Zeitreihenanalyse wider: Gemessen ab dem Beginn der Erhebung der Libido (Studieneinschluss in 9. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) war keine signifikante Änderung der Reaktionszeit über die 16 Wochen hinweg zu verzeichnen (β [95 %-KI] = 0,46 [-0,2; 1,2]; $p = 0,200$). Ein signifikanter Einfluss des Bullenalters auf die Reaktionszeit war ebenfalls nicht nachzuweisen: Bullenalter: β [95 %-KI] = 0,24 [-0,4; 0,9]; $p = 0,470$; Interaktionseffekt Bullenalter * Zeit: β [95 %-KI] = -0,02 [-0,1; 0,0]; $p = 0,288$.

2.3.2. Annahme der Sprungpartner

Die den Bullen im Rahmen der Spermagewinnung angebotenen Sprungpartner wurden in beiden Untersuchungszeiträumen von allen Tieren uneingeschränkt angenommen. Die Tiere wiesen also dahingehend zu jedem Messzeitpunkt eine ungestörte Libido auf.

V. DISKUSSION

Seit der Einführung der genomischen Selektion werden – durch die frühzeitige Verfügbarkeit von Zuchtwerten – vermehrt Jungbullen im Besamungsbetrieb eingesetzt. Aufgrund der Tatsache, dass diese teilweise nicht den Anforderungen an die Spermienqualität genügen (AMANN & DEJARNETTE, 2012; OSMERS & HERRMANN, 2017), sind Besamungsbetriebe daran interessiert, Therapiemöglichkeiten zur Verbesserung der Spermienqualität von Jungbullen zu implementieren. In der Humanmedizin wurden gut konzipierte Studien durchgeführt, die eine positive Wirkung von Akupunktur auf die Spermienqualität nachweisen (GURFINKEL et al., 2003; PEI et al., 2005; KUCUK et al., 2016). Die Tiermedizin kann derartige Analysen bislang nicht vorzeigen, sodass es sich die vorliegende Forschungsarbeit zum Ziel gesetzt hat, die Wirkung von Akupunktur auf Spermienqualität und Libido genomisch geprüfter Jungbullen zu untersuchen.

Die Studie wurde randomisiert kontrolliert durchgeführt, was den „Goldstandard“ für experimentelle Untersuchungen darstellt (SCHULZ et al., 2011). Die Berichterstattung erfolgte transparent nach den CONSORT (*Consolidated Standards Of Reporting Trials*)-Kriterien (SCHULZ et al., 2010), die einen Leitlinienkatalog für die Veröffentlichung randomisierter Therapiestudien aus der Humanmedizin darstellen und hohe Qualitätsstandards garantieren sollen. Ebenso trug die Einhaltung der speziell für Akupunkturstudien entwickelten STRICTA (*STandards for Reporting Interventions in Controlled Trials of Acupuncture*)-Richtlinien (MACPHERSON et al., 2002) zur Qualitätssicherung bei. Damit hebt sich diese Studie von bisher zu dieser Fragestellung beim Bullen veröffentlichten Einzelfallberichten oder Analysen mit sehr geringer Fallzahl ($n = 3-6$) ab (KOTHBAUER & MENG, 1983; HOLZMANN, 1986; ARLT et al., 2006; ARLT & HEUWIESER, 2009). Generell existieren bislang nur wenige randomisiert kontrollierte Studien, welche die Wirkung von Akupunktur beim Tier (unabhängig von der Indikation) qualitativ hochwertig untersuchen (ROSE et al., 2017).

1. Diskussion der Ergebnisse

1.1. Hauptzielparameter

Der Anteil der Jungbullen, der im Gegensatz zur Screening-Phase (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) eine physiologische Spermienqualität aufwies (Definition siehe Kap. III.5.1.),

unterschied sich nicht signifikant zwischen der BG (6/21; 29 %) und der KG (3/17; 18 %). Die primäre Studienhypothese wurde somit nicht bestätigt. Folglich kann eine Empfehlung der Therapieform – zumindest mit dem in dieser Studie angewendeten Akupunkturschema – für den Praxisgebrauch nicht ausgesprochen werden.

Ein Vergleich zu anderen Studienergebnissen ist an dieser Stelle nicht möglich, da Zielparameter in dieser oder ähnlicher Form in bisherigen Untersuchungen nicht erhoben wurden. Die Entscheidung, diesen Hauptzielparameter für die gegenständliche Analyse auszuwählen, beruht auf dessen klinischer Relevanz für Besamungsstationen. Schließlich stellen für Besamungsunternehmen, die das CASA-System als Routinegerät für die spermatologische Untersuchung heranziehen, die in den Hauptzielparameter integrierten Merkmale progressiv bewegliche Spermien sowie Spermien mit intakter Morphologie die Kriterien dar, anhand derer eine Einstufung der Spermienqualität eines Bullen erfolgt.

1.2. Nebenzielparameter

1.2.1. Spermienqualität

Die sekundäre Studienhypothese, dass Bullen mit mangelhafter Spermienqualität nach Akupunkturbehandlung bessere Werte hinsichtlich der Spermie güte merkmale aus den Überkategorien der Spermienquantität, -motilität und -morphologie sowie der Libido aufwiesen als Tiere nach keiner Behandlung, konnte ebenfalls nicht bestätigt werden. Zwar zeigte sich in der Zeitreihenanalyse ein positiver Effekt der Akupunktur auf einen der untersuchten Parameter (Anteil der Spermien mit distalem Zytoplasmatropfen: signifikant stärkere Abnahme/Verbesserung über die Zeit bei Tieren der BG im Gegensatz zu Bullen der KG). Diesem Ergebnis sollte jedoch keine praktische Relevanz zugesprochen werden. Zum einen ist nicht auszuschließen, dass dieses Einzelresultat allein auf die Menge der in dieser Studie untersuchten Parameter zurückzuführen ist, da die Wahrscheinlichkeit, ein signifikant positives Ergebnis zu erhalten, mit Erhöhung der Anzahl der Zielparameter stetig steigt (Problematik des „multiplen Testens“). Zum anderen zeigten sich gar Negativwirkungen der Akupunktur auf einen der analysierten Parameter (Anteil der Spermien mit Schleifenform: geringere Abnahme/Verbesserung über die Zeit bei Tieren der BG im Gegensatz zu Bullen der KG). Überdies ist der detektierte Gruppenunterschied – trotz Signifikanz – äußerst gering ($\beta = -0,04$: Abfall/Verbesserung des Parameters nach Akupunkturbehandlung pro Studienwoche um 0,04 %), sodass selbst bei Ausklammerung der beiden genannten Faktoren eine Bedeutung für den Besamungsbetrieb nicht gegeben wäre.

1.2.1.1. Vergleich zu Tierstudien

Untersuchungen an Bullen, die ebenfalls die Wirkung von Akupunktur auf die Spermienqualität analysierten, finden sich nur in Form von drei Fallberichten/Fallserien (KOTHBAUER & MENG, 1983; HOLZMANN, 1986; ARLT et al., 2006). Deren Resultate kritisch mit denen der gegenständlichen Studie in Beziehung zu setzen, ist im Fall von Kothbauer & Meng (1983) (n = 1) sowie Holzmann (1986) (n = 3) allerdings wenig ergiebig. Zum einen zogen die Autoren – im Gegensatz zur vorliegenden Untersuchung – jeweils unterschiedliche spermatologische Parameter zur Analyse heran, sodass es an einer tauglichen Vergleichsgrundlage fehlt. Zum anderen weisen die Untersuchungen gravierende Mängel bezüglich der Methodik und/oder der Berichterstattung auf, die die ohnehin schon geringe Aussagekraft von Fallberichten/-serien (Evidenzklasse 4) (OXFORD CENTRE FOR EVIDENCE-BASED MEDICINE, 2009) noch weiter einschränken. So fehlen beispielsweise Angaben zum andrologischen Krankheitsbild oder zu den untersuchten Zielgrößen. Zwar kommen beide Analysen zu dem Ergebnis, dass Akupunktur einen positiven Einfluss auf die Spermienqualität haben kann (Kothbauer & Meng (1983): „brauchbare Ejakulate“ nach Akupunkturbehandlung; Holzmann (1986): signifikante Verbesserung des Prozentsatzes der progressiv beweglichen und der toten Spermien sowie der Transmigrationsrate¹⁸ nach Akupunkturbehandlung). Allerdings kann – angesichts der oben genannten methodischen Defizite – der Diskrepanz zu den Resultaten der vorliegenden Studie eine nur sehr eingeschränkte Bedeutung beigemessen werden.

Anders verhält es sich bei Arlt et al. (2006). Wengleich auch diese Analyse eine geringe Fallzahl aufweist (n = 6), überzeugt sie durch eine qualitativ hochwertigere Methodik. Außerdem liefert sie eine adäquatere Vergleichsgrundlage, da sie jedenfalls zwei Parameter erhebt, die mit der vorliegenden Studie übereinstimmen (Spermiengesamtzahl/Dichte und bewegliche Spermien). In ihrer Untersuchung wiesen Arlt et al. (2006) keine positiven Effekte der Akupunkturbehandlung auf die untersuchten Spermieeigenschaften nach und bestätigen somit – hinsichtlich der beiden übereinstimmenden Parameter – die Ergebnisse dieser Studie.

1.2.1.2. Vergleich zu humanexperimentellen Studien

Im Gegensatz zur Tiermedizin liefert die Humanmedizin Analysen mit deutlich höherer Fallzahl (n = 12–57) und Qualität, darunter auch einige mit Kontrollintervention. Eine

¹⁸ Anteil der progressiv beweglichen Spermien, die sich aktiv gegen eine Strömung bewegen können.

Einordnung der gewonnenen Studienergebnisse in deren wissenschaftlichen Kontext ist demnach – trotz des unterschiedlichen Probandenkollektivs – geeigneter. Gleichwohl ergibt sich auch hier die Problematik der unterschiedlichen Zielgrößen. Aufgrund der Tatsache, dass die spermatologische Untersuchung in keiner der Studien mittels CASA-System erfolgte, beschränkt sich der Vergleich der Resultate lediglich auf die Standardparameter Spermiengesamtzahl/Dichte, Motilität und Morphologie mit Außerachtlassung der CASA-spezifischen Subparameter.

Während sich bezüglich der Spermiengesamtzahl/Dichte kein kongruentes Ergebnisbild der Studien abbilden lässt, ist bei der Mehrheit der Untersuchungen ein positiver Akupunktoreffekt auf die Spermienmotilität (FISCHL et al., 1984; GERHARD et al., 1992; SITERMAN et al., 1997; MINGMIN et al., 2002; MING-HUA, 2005; PEI et al., 2005; ZHEN-BEI, 2005; DIETERLE et al., 2009; HE et al., 2011; KUCUK et al., 2016) sowie die Spermienmorphologie (GERHARD et al., 1992; SITERMAN et al., 1997; MINGMIN et al., 2002; GURFINKEL et al., 2003; PEI et al., 2005; HE et al., 2011) zu erkennen (siehe auch Kap. II.3.2., Tabelle 4 und 5). Damit stehen diese Ergebnisse konträr zu denen der vorliegenden Studie.

Dies kann zum einen in einer unterschiedlichen Durchführung der Akupunkturbehandlung begründet sein. So war die Anzahl der Akupunktursitzungen in den humanmedizinischen Studien mit einem Durchschnittswert von 17 deutlich höher als in dieser Untersuchung (zehn), wodurch potentiell eine stärkere Akupunkturwirkung erzielt werden konnte. Gleiches gilt für die Anzahl der Akupunkturpunkte (durchschnittlich zehn gegenüber fünf). Weiterhin wurden Akupunkturpunkte ausgewählt, die für diese Indikation in der Literatur als hochwirksam beschrieben werden und vorwiegend am Rücken, am Bauch und an den Beinen lokalisiert waren (Lg, Kg, Bl, Ma, MP, Ni, Le). Teilweise wurden sie zudem, zusätzlich zur manuellen Nadelakupunktur, durch Moxibustion stimuliert (GERHARD et al., 1992; GURFINKEL et al., 2003; MING-HUA, 2005; ZHEN-BEI, 2005; HE et al., 2011). Aus Gründen der Sicherheit wurde in der gegenständlichen Studie sowohl auf Punkte am Bauch und an den Hintergliedmaßen, wie auch auf eine Moxibustionsbehandlung verzichtet, was möglicherweise Einbußen bei der Akupunkturwirkung zur Folge hatte (siehe auch Kap. V.2.2.).

Zum anderen kann die Diskrepanz der Ergebnisse auch auf eine beim Menschen zu Tage tretende psychische Beeinflussung zurückzuführen sein, die durch sog. akupunktur-unspezifische Faktoren hervorgerufen wird. Darunter ist beispielsweise der intensive

Therapeutenkontakt, das Erscheinungsbild des Behandlungszimmers, eine positive Erwartungshaltung gegenüber der Therapie, eine negative Erwartungshaltung gegenüber der Schulmedizin sowie das Erleben einer invasiven Technik zu verstehen (BIRCH et al., 2002; ENDRES et al., 2007). Beim Menschen sind diese kognitiven emotionalen Effekte nicht von der spezifischen sensorischen Wirkung der Akupunktur zu trennen (LIU & YU, 2011). Beim Tier spielen sie jedoch – bis auf den intensiven Therapeutenkontakt – keine Rolle, worin eine mögliche Ursache für die geringere Effektivität der Akupunktur gesehen werden kann. An dieser Stelle gilt es jedoch zu betonen, dass sich Akupunktur im Allgemeinen selbstverständlich nicht nur auf unspezifische Effekte reduzieren lässt. Dies wird unter anderem durch die Existenz von Tierstudien deutlich, die positive Resultate nach Akupunkturbehandlungen (unabhängig von der Indikation) erzielten (HABACHER et al., 2006).

Abgesehen von den beschriebenen Faktoren existieren weitere Ursachen, die für das Versagen der Akupunkturwirkung als Therapieform zur Verbesserung der Spermienqualität in dieser Studie verantwortlich sein können. Diese sind, da sie nicht in Zusammenhang zu den humanmedizinischen Studien zu sehen sind, als eigenständige Punkte in Kap. V.2. (Diskussion der Methodik) aufgeführt.

1.2.1.3. Einfluss des Bullenalters auf die Spermienqualität

Abgesehen von der Akupunkturwirkung wurde in dieser Studie auch der Einfluss der Zeit auf die Nebenzielparameter untersucht. Die Analyse ergab, dass sich der Großteil der Spermieingütemerkmale – unabhängig von der Intervention – über den Gesamtbeobachtungszeitraum hinweg signifikant verbesserte. Überdies wurde nachgewiesen, dass ein höheres Alter mit einer besseren Spermienqualität einhergeht, woraus zu schließen ist, dass die Verbesserung über die Zeit hauptsächlich auf das steigende Alter der noch relativ jungen Tiere zurückzuführen war. Diese positive Korrelation findet sich in zahlreichen Studien bestätigt (ALMQUIST et al., 1976; STALHAMMAR et al., 1989; MATHEVON et al., 1998; PALDUSOVA et al., 2014; ARGIRIS et al., 2018), wobei anzumerken ist, dass die Untersuchungen nur die Standard- und nicht die CASA-spezifischen Parameter integrieren. Die Ergebnisse dieser sowie der angebrachten Studien lassen resümieren, dass ledigliches Zuwarten die Spermienqualität von Jungbullen verbessert. Selbstverständlich handelt es sich hierbei um ein naturgemäß langwieriges Geschehen, das den ökonomischen Interessen der Besamungsindustrie entgegensteht. Aufgrund der Tatsache, dass bislang keine Therapieform – einschließlich der Akupunktur – existiert, welche die Spermienqualität von Jungbullen positiv zu beeinflussen vermag, scheint dies, ungeachtet der eingangs

erwähnten Optimierung des Haltungs- und Absamungsmanagements, allerdings derzeit die einzige Option, Bullen mit besseren Parameterwerten zu erhalten und ist zwangsläufig als Folge der genomischen Selektion zu akzeptieren.

1.2.2. Libido

Hinsichtlich der Dauer der Reaktionszeit war während der untersuchten Zeiträume kein signifikanter Unterschied zwischen der BG und der KG festzustellen. Dies ist zweifelsohne damit zu begründen, dass nahezu alle Bullen schon bei Studieneinschluss eine sehr gute Libido (Reaktionszeit: 0–0,5 min. – beste Kategorie) aufwiesen. Eine Optimierung der Reaktionszeit durch Akupunktur war insofern von vornherein nicht zu erreichen. Ebenso lässt sich durch das durchgehend hohe Libido-Niveau der Tiere erklären, warum sich – im Gegensatz zu den spermatologischen Nebenzielparametern – kein Einfluss der Zeit oder des Bullenalters auf die Dauer der Reaktionszeit nachweisen lies.

Gleiches gilt für die Annahme der Sprungpartner. Aufgrund der Tatsache, dass die den Bullen im Rahmen der Spermagewinnung angebotenen Sprungpartner von allen Tieren zu jeder Zeit uneingeschränkt angenommen wurden, konnte weder ein Effekt der Intervention, noch ein Einfluss der Zeit oder des Alters bewertet werden. Insgesamt bleibt demnach zu untersuchen, inwiefern sich Akupunktur bei Tieren mit einem nachgewiesenen Libidomangel auswirkt. Dazu ist anzumerken, dass bereits – wenn auch nur laut eines Fallberichts – Hinweise existieren, die gegen eine positive Wirkung von Akupunktur auf die Libido von Bullen sprechen (ARLT & HEUWIESER, 2009).

1.3. Effekte der Akupunktur bei Bullen mit guter Spermienqualität

Sowohl in der Zeitreihenanalyse als auch im Vorher/Nachher-Vergleich zeigte sich bei der Mehrheit der Spermienparameter eine signifikante Verbesserung über die Zeit. Zwar konnte – im Gegensatz zur randomisiert kontrollierten Studie – ein Effekt des Alters aufgrund der geringen Varianz des Alters der eingeschlossenen Bullen (Alter in Monaten: Median (Min, Max): 16 (13, 23)) statistisch nicht nachgewiesen werden. Nichtsdestotrotz liegt die Vermutung nahe, dass die Verbesserung der Spermieigenschaften über die Zeit auch bei diesem Probandenkollektiv auf das Älterwerden der Tiere zurückzuführen war. Bezüglich der Libido war – wie im Fall der Bullen mit mangelhafter Spermienqualität – keine signifikante Veränderung zwischen den untersuchten Studienzeiträumen zu verzeichnen, weder die Reaktionszeit, noch die Annahme der Sprungpartner betreffend. Die Studienhypothese, dass sich Akupunktur bei Bullen mit guter Spermienqualität nicht nachteilig auf die Spermieigenschaften aus den Überkategorien der

Spermienquantität, -motilität und -morphologie sowie die Libido der Tiere auswirkt, wurde folglich bestätigt.

2. Diskussion der Methodik

2.1. Probandenkollektiv

Die Anzahl der einzuschließenden Studientiere wurde auf 40 festgesetzt (20 pro BG, 20 pro KG). Als Limitation der Studienmethodik ist zu nennen, dass eine biometrische Fallzahlschätzung mangels entsprechender Kenngrößen, z. B. aus vorangegangenen Studien, nicht durchgeführt werden konnte. Stattdessen erfolgte eine Orientierung an Fallzahlen aus humanmedizinischen Studien mit ähnlichem Forschungsgegenstand ($n = 19\text{--}57$) (SITERMAN et al., 2000; GURFINKEL et al., 2003; PEI et al., 2005; DIETERLE et al., 2009; KUCUK et al., 2016). Die eher gering bemessene Fallzahl könnte eine „Unterpowerung“ der Studie provoziert haben, sodass eventuell bestehende signifikante Gruppenunterschiede statistisch nicht detektiert wurden (ENG, 2003). Eine größere Fallzahl wäre allerdings, bei einer Grundlagenstudie mit Pilotcharakter wie dieser, aufgrund ökonomischer (personeller, zeitlicher und finanzieller Aufwand) sowie ethischer Aspekte (Belastung der Studientiere) nicht zu rechtfertigen gewesen.

In die Studie wurden ausschließlich Bullen der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ eingeschlossen. Somit unterlagen alle Tiere denselben äußeren Bedingungen. Von Relevanz sind hierbei insbesondere Umwelt- und Managementfaktoren, welche auf die Spermienqualität einwirken können. Eine derartige Beeinflussung einzelner Tiere und eine damit potentiell einhergehende Maskierung der Akupunkturwirkung war durch die Standardisierung des Stallklimas (MATHEVON et al., 1998), der Fütterung (BROWN, 1994; COULTER et al., 1997; VAN CAMP, 1997) sowie des Managements im Rahmen der Spermagewinnung (ALMQUIST, 1978; FUERST-WALTL et al., 2006; MURPHY et al., 2018c) ausgeschlossen.

Allerdings bringt die Verwendung von Studientieren aus dem Besamungsbetrieb die Limitation einer Vorselektion der Tiere mit sich. Bullen der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ entstammen einem Zuchtprogramm mit festgesetzten Mindestanforderungen für Väter und Mütter der Besamungsbullen (RINDERUNION BADEN-WÜRTTEMBERG E. V., 2019), wodurch ein Eingang von Tieren mit genetisch bedingter mangelhafter Spermienqualität auf den Betrieb bereits abgewendet wird. Des Weiteren werden Bullen mit sehr geringer Spermienqualität aus Gründen der Wirtschaftlichkeit in der Regel innerhalb weniger Wochen nach Eintreffen auf der Station eliminiert. Entsprechende Tiere standen

daher nicht für die gegenständliche Untersuchung zur Verfügung. Dies hatte zur Folge, dass in die randomisiert kontrollierte Studie vorwiegend Bullen eingeschlossen wurden, die – hinsichtlich der Einschlusskriterien – Baseline-Werte nahe der Einschlussgrenze aufwiesen (Gruppenmedian des Prozentsatzes der Spermien mit progressiver Motilität: 49,75 % (BG) bzw. 52,10 % (KG)). Ob sich Akupunktur bei Bullen mit deutlich herabgesetzter Spermienqualität anders auswirkt, als es die Ergebnisse dieser Studie zeigen, bleibt demnach ungeklärt und wäre bei Bedarf separat zu untersuchen. Eine nicht zu vernachlässigende Hürde würde dabei jedoch die Rekrutierung der Studientiere darstellen. Aufgrund der – wie oben am Beispiel der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ dargelegten – auf Besamungsstationen in der Regel stattfindenden Aussortierung von Bullen mit hochgradig reduzierter Spermienqualität (AMANN & DEJARNETTE, 2012), müsste man, um solche Tiere für die Untersuchung zu gewinnen, auf andere Betriebsformen (z. B. Mastbetriebe) ausweichen. Diese verfügen möglicherweise über eine höhere Anzahl von Tieren mit derartig mangelhafter Spermienqualität, bieten jedoch nicht die für eine spermatologische Untersuchung notwendigen Laboratorien und Fachkräfte. Die Durchführung einer Studie unter diesen Rahmenbedingungen wäre demnach mit erheblichen personellen, zeitlichen, finanziellen und logistischen Belastungen verbunden, sodass allenfalls Fallberichte ökonomisch vertretbar Untersuchungsergebnisse generieren könnten.

In die Analyse eingeschlossen wurden Bullen unabhängig von ihrer Rasse (Fleckvieh, Braunvieh, Holstein). Dies hat zur Konsequenz, dass Unterschiede hinsichtlich der Spermienqualität, die mehreren Untersuchungen zufolge zwischen Bullen verschiedener Rassen existieren (HOFLACK et al., 2006; BERAN et al., 2011; MORRELL et al., 2017), in dieser Studie nicht berücksichtigt wurden. Allerdings gewährleistet die Nicht-Selektion ein breites Patientenkollektiv, wie es meist im Zuchtbetrieb wiederzufinden ist, sodass den Ergebnissen dieser Untersuchung – die Rasse betreffend – eine Allgemeingültigkeit für den Praxisbetrieb (externe Validität) zugesprochen werden kann.

Die Studientiere waren zwischen 12 und 34 Monaten alt und zählen somit definitorisch zu den sog. Jungbullen, d. h. sie befanden sich in der Phase nach Beendigung der Pubertät (ca. 8–11 Monate) und vor Beendigung der sexuellen Reife (ca. 48 Monate) (KARABINUS et al., 1990). Die Entscheidung, Jungbullen für die Studie heranzuziehen, beruht auf der Tatsache, dass diese im Zuge der voranschreitenden genomischen Selektion vermehrt im Besamungsbetrieb eingesetzt werden, jedoch teilweise den Anforderungen an die Spermienqualität nicht entsprechen (AMANN & DEJARNETTE, 2012; OSMERS & HERRMANN, 2017). Angesichts dessen drängt sich ein erhöhtes wirtschaftliches Interesse

auf, die Spermienqualität solcher Jungbullen zu optimieren. In Anbetracht des Umstands, dass die Spermienqualität von Bullen im Allgemeinen erst im Alter von 4–6 Lebensjahren ihr Optimum erreicht hat (STALHAMMAR et al., 1989; MATHEVON et al., 1998; FUERST-WALTL et al., 2006; PALDUSOVA et al., 2014; ARGIRIS et al., 2018; MURPHY et al., 2018c), ist allerdings anzunehmen, dass die Ursache für die schlechte Spermienqualität der studiengegenständlichen Tiere auf deren sexuelle Unreife zurückzuführen war, deren Schwelle gleichaltrige Bullen mit ausreichender Spermienqualität bereits überschritten hatten. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse der Zeitreihenanalyse (Einfluss der Zeit und des Bullenalters; siehe Kap. IV.1.4.1.1.) dieser Studie gestützt. Unter Zugrundelegung dieser Schlussfolgerung wäre zu konstatieren, dass Akupunktur den Reifeprozess eines Bullen nicht zu fördern und eine zügigere Optimierung der Spermienqualität nicht zu erreichen vermag. Ob sich durch Akupunktur bei älteren Bullen, deren mangelhafte Spermienqualität auf pathologische Ursachen zurückzuführen ist (z. B. Hormonimbancen, autoimmune Prozesse, Allgemeinerkrankungen (VAN CAMP, 1997; WEITZE, 2001), andere Effekte als in dieser Studie erzielen ließen, ist als Forschungsgegenstand weiterer Untersuchungen zu betrachten.

2.2. Intervention

Die Akupunkturbehandlung wurde von zwei Tierärztinnen durchgeführt, die jeweils eine 200-stündige Ausbildung bei der Deutschen Ärztegesellschaft für Akupunktur absolvierten. Aufgrund der Tatsache, dass Bullen der BG eine Akupunkturbehandlung und Bullen der KG gar keine Therapie erhielten, konnte eine – in Tierstudien geforderte – einfache Verblindung der Therapeuten und des Pflegepersonals (VAN DER WORP et al., 2010) nicht stattfinden. Es ist also denkbar, dass eine durch potentielle subjektive Erwartungshaltungen der behandelnden und/oder betreuenden Personen verursachte bewusste oder unbewusste Verhaltensänderung die Ergebnisse verzerrte (Rosenthal-Effekt) (ROSENTHAL, 2009), indem Tiere der BG beispielsweise eine besondere Zuwendung erfuhren. Da sich in dieser Studie allerdings keine signifikanten Untersuchungsergebnisse darstellten, ist davon auszugehen, dass sich eine etwaige positive Erwartungshaltung der Behandelnden nicht in Richtung eines größeren Therapieeffektes ausgewirkt hat. Eine durch eine fehlende Verblindung bedingte Limitation der Studie kann insofern allenfalls als nachrangig eingeordnet werden.

Für die Akupunkturbehandlung wurde bei allen Bullen ein einheitliches Punktekonzepkt angewandt. Dies ermöglicht grundsätzlich eine – von randomisiert kontrollierten Studien

geforderte – Reproduzierbarkeit und Nachvollziehbarkeit der Methodik sowie eine Vergleichbarkeit und Generalisierbarkeit der Ergebnisse. Die Erfüllung dieser Qualitätskriterien korreliert jedoch potentiell negativ mit der Akupunkturwirkung. So sieht die Traditionell Chinesische Medizin prinzipiell ein Individuumkonzept mit Traditionell Chinesischer Diagnostik und speziell auf einen Patienten abgestimmtem Punkteschema vor, das gegebenenfalls auch druckempfindliche Punkte mit einbezieht (NICKEL, 2005; PATERSON & DIEPPE, 2005). Der Verzicht auf eine derartige Einzeltierbehandlung – wie in dieser Studie – stellt demnach möglicherweise einen begrenzenden Faktor für die vollständige Ausschöpfung des Therapiepotentials dar. Jedoch ist anzumerken, dass die Durchführung eines solchen auf einer ausführlichen Diagnostik basierenden Individualschemas generell mit großem zeitlichem Aufwand verbunden wäre, der pro Bulle pro Akupunkturbehandlung im Durchschnitt 45–60 Minuten betrüge. Zwar wäre ein derartiger Mehraufwand im Rahmen einer Studie ohne Weiteres zu bewältigen, die Umsetzung einer Einzeltherapie in den Praxisalltag eines wirtschaftlich orientierten Besamungsunternehmens erscheint dementgegen nur schwer umsetzbar.

Zur Anwendung kamen zwei Körper- (Bl 23, Lg 3) und drei Ohrpunkte (Ovar, ACTH, TSH), die in dieser Kombination von Herrn Prof. Dr. Dominik Irnich empfohlen wurden. Die Auswahl der Punkte begründet sich zum einen in ihrer Potenz, Urogenital-Organen im Sinne der TCM zu stärken (Körperpunkte) sowie regulierend auf hormonelle Kreisläufe einzuwirken (Ohrpunkte) (LANGE, 1985; AMBRONN et al., 2001; SCHOEN, 2008; STUX et al., 2008; MÜLLER, 2011; ANGERMAIER, 2018). Zum anderen wurde bei der Zusammenstellung die gefahrlose Zugänglichkeit der Punkte beim Bullen berücksichtigt, die jedoch gleichzeitig eine Limitation der Studie bedingt. So wurde aus Sicherheitsgründen auf Punkte an den Hintergliedmaßen sowie am Bauch verzichtet (z. B. Punkte der Nieren- und Magenleitbahn oder des Konzeptionsgefäßes), die in der Literatur allerdings als hochwirksam beschrieben und – wie in Kap. V.1.2.1.2. dargestellt – in humanmedizinischen Studien mit ähnlicher Fragestellung erfolgreich angewendet wurden (GERHARD et al., 1992; SITERMAN et al., 1997; PEI et al., 2005). Der Gebrauch dieser Punkte ginge allerdings zwingend mit einer hohen Gefahr für den Therapeuten oder einer umfangreichen Fixierung der Bullen einher, die einen erheblichen Stressfaktor für die Tiere darstellen würde. Ob unter solchen Umständen ein potentiell stärkerer Akupunkturreffekt zum Tragen käme, bleibt demzufolge offen.

Bezüglich der Anzahl der Akupunktursitzungen, der Stichtiefe, der Verweildauer sowie der Stimulation der Nadeln wurden allgemeine Richtwerte der Akupunktur (STUX et al.,

2007) eingehalten. So wurden die Bullen zehnmal über einen Zeitraum von fünf Wochen behandelt. Die Nadeltiefe betrug am Ohr ca. 3 mm und am Körper ca. 1,5–2 cm. Nach dem Einstich und vor dem Entfernen der Nadeln nach ca. 25 Minuten erfolgte eine kurze, manuelle Stimulation der Körperpunkte durch Nadelrotation zur Intensivierung der Reizstärke. Die Standardisierung dieser Faktoren zugunsten der Studienqualität vermag allerdings, wie auch die oben beschriebene Anwendung eines im Vorhinein festgelegten Punkteschemas, eine Minderung des Behandlungserfolgs hervorzurufen, da dieser entscheidend von einer individuellen Anpassung dieser Kriterien abhängen kann (LIU, 2007). So wird in der Traditionell Chinesischen Medizin beispielsweise bei konstitutionell schwachen Patienten mit chronischen Beschwerden eine hohe Anzahl von Akupunktursitzungen, eine lange Verweildauer der Nadeln sowie eine milde oder gar keine manuelle Stimulation angeraten. Umgekehrt gilt für Patienten mit starker Konstitution und akuter Erkrankung (STUX et al., 2007). Im Kontext der Stimulation sei außerdem zu nennen, dass in dieser Studie auf Moxibustion – im engeren traditionell chinesischen Sinne einer Nadeltherapie zugehörig (*Zhen Jiu* = Stechen und Brennen; siehe Kap. II.2.1.) – auf dem Stallgelände aus Brandschutzgründen verzichtet wurde. Eine dahingehend mögliche Wirkungsverstärkung war somit ausgeschlossen.

Tiere der KG erhielten keine therapeutischen Maßnahmen, wurden aber – dem zeitlichen Therapie-Intervall der BG entsprechend – ebenfalls in Kastenstände geführt und dort fixiert. Hierüber wurde sichergestellt, dass äußere – den Behandlungserfolg der Akupunktur eventuell beeinflussende – Reize (z. B. Zuwendung durch Therapeuten oder Pflegepersonal) auch Tiere der KG erreichten. Von konkreten Placebo-Akupunkturverfahren, die beim Menschen speziell für die Durchführung kontrollierter Studien entwickelt wurden (z. B. das Stechen von Nadeln an nicht-wirksamen Akupunkturpunkten (Schein-Akupunktur) oder die Verwendung sog. Placebo-Akupunktornadeln, die sich bei Berührung der Haut ohne deren Penetration ineinander verschieben (STREITBERGER & KLEINHENZ, 1998)), wurde bewusst abgesehen. Zum einen stehen diese Techniken in der Kritik, keine echten, inerten Placebo-Verfahren zu verkörpern, da sie alleine durch Hautkontakt oder -irritationen eigene lokale Wirkungen im Körper auslösen können (IRNICH, 2000). Zum anderen ist beim Tier – bei Gleichsetzung der äußeren Umstände – ein Modell mit Verzicht auf eine Placebo-Behandlung zu rechtfertigen, da im Gegensatz zum Menschen keine Erwartungshaltung gegenüber dem Therapieverfahren besteht.

2.3. Zielparameter

Die Zielparameter dieser Studie umfassen Spermengütemerkmale der Spermienquantität, -motilität und -morphologie, die mittels CASA-System erfasst werden können. Die Verwendung dieses Systems bringt – im Gegensatz zur mikroskopischen Routineuntersuchung – insbesondere den Vorteil einer objektiven Befunderhebung mit sich, indem der Einfluss des einzelnen Untersuchers verringert wird. Dies führt nachweislich zu einer Verbesserung der Fertilitätsprognose (WABERSKI & PETRUNKINA, 2007; PETRUNKINA et al., 2008; TSAKMAKIDIS, 2016). Als weiterer Vorzug dieses Verfahrens ist die simultane Erfassung einer Vielzahl von Spermienparametern zu nennen, die zum Teil durch manuelle Mikroskopie nicht detektiert werden können (VERSTEGEN et al., 2002; RIJSSELAERE et al., 2012). Insbesondere die – auch in dieser Studie analysierten – Geschwindigkeitsparameter stellen eine für das CASA-System-spezifische Besonderheit dar, deren positive Korrelation zur Fertilität am Bullen (FARRELL et al., 1998; CSEH et al., 2003; KATHIRAVAN et al., 2008; MOCÉ & GRAHAM, 2008; KUMAR et al., 2014; NAGY et al., 2015; MORRELL et al., 2017) sowie am Menschen (FETTEROLF & ROGERS, 1990; LIU et al., 1991; LARSEN et al., 2000; HIRANO et al., 2001) bereits nachgewiesen wurde.

Als problematisch ist indessen die fehlende Standardisierung der technischen Einstellungen bei der computergesteuerten Spermienanalyse anzusehen. So existieren CASA-Modelle verschiedener Firmen (z. B. „*Hamilton-Thorne Motility Analyzer*“, „*Cell Soft Automated Semen Analyzer*“, „*Cell Trak Analyzer, Hobson Sperm Tracker*“ (KRAUSE et al., 2000)), die jeweils ungleiche Software-Einstellungen empfehlen. Da diese die Messergebnisse einer Untersuchung entscheidend beeinflussen (SMITH & ENGLAND, 2001), ist die Vergleichbarkeit von Studien, die unterschiedliche CASA-Systeme zur Analyse verwenden, eingeschränkt (VERSTEGEN et al., 2002; RIJSSELAERE et al., 2003). Gleiches gilt für die Auswahl bestimmter Prozesselemente der CASA-Analyse, wie z. B. Messkammern, Verdünnermedien oder Untersuchungstemperaturen (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001; RIJSSELAERE et al., 2003; SCHÄFER-SOMI & AURICH, 2007), die von verschiedenen Laboratorien unterschiedlich gehandhabt wird. Aufgrund der dargestellten Erkenntnisse müssen also die Ergebnisse der vorliegenden Studie in Abhängigkeit von den bei der CASA-Untersuchung verwendeten Einstellungen (siehe Kap. IX.2) und Materialien betrachtet werden. Diese entsprechen den Standards der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ und beruhen auf den Herstellerempfehlungen der Firma „*Hamilton-Thorne Biosciences*“.

Die fehlende Standardisierung der CASA-Settings erschwert außerdem die Festlegung (inter-)nationaler Normwerte für die Spermiegüte (VERSTEGEN et al., 2002), sodass entsprechende CASA-Richtgrößen beim Bullen bislang fehlen (ADR-Richtlinien sind auf CASA-Settings nicht ausgerichtet; siehe Kap. III.2.1.). Für die gegenständliche Studie bedeutet dies, dass im Rahmen der Ergebnisauswertung eine Kategorisierung der Parameterwerte hinsichtlich physiologischer oder mangelhafter Qualität zu den jeweiligen Messzeitpunkten nicht erfolgen konnte. Dargestellt wurde nur die Verbesserung oder Verschlechterung der Werte im Zusammenhang mit der Intervention. Lediglich bezüglich des Anteils der progressiv beweglichen Spermien sowie des Anteils der Spermien mit intakter Morphologie ($\hat{=}$ Einschlusskriterien und Hauptzielparameter) war eine Qualitäts-Einstufung, basierend auf den von der „Rinderunion-Baden-Württemberg e. V.“ intern festgelegten Grenzwerten, möglich.

3. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser randomisiert kontrollierten Studie liefern keinen Hinweis darauf, dass Akupunktur in der gewählten Ausführung Spermienqualität und Libido von Jungbullen verbessern kann. So war hinsichtlich des Hauptzielparameters (Anteil der Jungbullen, der im Gegensatz zur Screening-Phase nach Intervention eine physiologische Spermienqualität aufwies) kein Unterschied zwischen der BG und der KG zu verzeichnen. Selbiges gilt für die Nebenzielparameter (Spermieigenschaften aus den Überkategorien der Spermienquantität, -motilität und -morphologie sowie die Libido). Der in der humanmedizinischen Literatur postulierte positive Effekt von Akupunktur auf die Spermienqualität – insbesondere die Motilität und die Morphologie – konnte folglich für Jungbullen nicht bestätigt werden.

Aus der Tatsache heraus, dass sich die Methodik der Akupunkturbehandlung der vorliegenden Analyse weitgehend von jener der humanmedizinischen Studien unterscheidet, wäre die Durchführung einer weiteren Untersuchung mit dahingehend angepasstem Akupunkturkonzept anzudenken. Jedoch ist zu betonen, dass diese Unterschiede – vorwiegend hinsichtlich Punktauswahl und -stimulation – bewusst in Kauf genommen wurden, um eine für alle Beteiligten möglichst gefahrlose Behandlung der Bullen zu gewährleisten. So wäre eine Angleichung des Therapiekonzepts an das der Humanmedizin (Verwendung von potentiell wirksameren Akupunkturpunkten am Bauch sowie an der Hintergliedmaße, zusätzliche Stimulation durch Moxibustion) zwar durchaus umsetzbar, aber durch die dafür erforderlichen Fixationsmaßnahmen sehr wahrscheinlich mit erheblichem Stress für Tier und

Therapeuten verbunden, der einem Akupunkturerfolg schlechtestenfalls sogar entgegenwirken könnte. Selbst wenn eine solche Untersuchung positive Ergebnisse erzielen würde, wäre die Umsetzung der Therapie in den Praxisalltag einer Besamungsstation mit erheblichem zeitlichem und personellem Aufwand verbunden (z. B. Mehrbedarf an Pflegepersonal, Schaffung brandsicherer Räumlichkeiten für Moxibustion), sodass wirtschaftlich gesehen eine Rentabilität der Behandlung vermutlich nicht gegeben wäre. Eine Empfehlung für die Durchführung dahingehender Studien kann in Anbetracht der aufgezeigten Kriterien daher nicht ausgesprochen werden.

Aufgrund des Faktums, dass diese Studie die bestehende Therapielücke für die Optimierung der Spermienqualität von Jungbullen nicht schließen konnte, ist die Besamungsindustrie weiterhin auf die Erforschung innovativer Konzepte angewiesen. Bis zur Etablierung etwaiger neu entwickelter Therapiemethoden muss die Problematik des – im Zuge der genomischen Selektion selbst zu verantwortenden – erhöhten Anteils an Jungbullen mit schlechter Spermienqualität im Zuchtbetrieb gezwungenermaßen akzeptiert werden. Nichtsdestotrotz bietet sich durch die in dieser und zahlreichen weiteren Studien gewonnene Erkenntnis, dass sich die Spermienqualität von Jungbullen mit Fortschreiten der sexuellen Reife von alleine verbessert, der Ausweg, durch ledigliches Zuwarten Bullen mit besseren Parameterwerten zu erhalten. Gleichwohl lässt sich diese Option, aufgrund des großen dafür anzusetzenden Zeitintervalls, nur schwer mit den wirtschaftlichen Interessen der Besamungsindustrie vereinbaren.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Einsatz von Akupunktur zur Verbesserung der Spermienqualität genomisch geprüfter Jungbullen – eine randomisiert kontrollierte Studie

Einleitung:

Im Zuge der Einführung der genomischen Selektion werden – aufgrund der frühzeitigen Verfügbarkeit von Zuchtwerten – vermehrt Jungbullen zur Spermengewinnung herangezogen. Aufgrund der Tatsache, dass diese teilweise nicht den Anforderungen an die Spermienqualität genügen, sind Besamungsbetriebe daran interessiert, Therapiemöglichkeiten zur Verbesserung der Spermienqualität zu implementieren. Abgesehen von der Möglichkeit, die Rahmenfaktoren der Bullenhaltung sowie des Spermengewinnungs- und -prozessierungsverfahrens zu perfektionieren, bestehen derzeit jedoch keine allgemein akzeptierten Optionen, die Spermienqualität aktiv zu beeinflussen. In der Humanmedizin wurden positive Effekte von Akupunktur auf die Spermienqualität des Mannes nachgewiesen. Bei dieser Therapieform, die einen Teilbereich der Traditionell Chinesischen (Veterinär-)Medizin darstellt, handelt es sich um ein jahrtausendealtes Reizverfahren, bei dem spezifische Hautpunkte mit feinen Nadeln stimuliert werden. Aufgrund des niedrigen Kostenaufwands sowie der geringen Invasivität einer Akupunkturbehandlung bietet sich diese Methode auch für den Besamungsbetrieb an. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Wirkung von Akupunktur auf Spermienqualität und Libido genomisch geprüfter Jungbullen zu untersuchen.

Material und Methoden:

Es wurden zwei Analysen durchgeführt, eine randomisiert kontrollierte Studie (Hauptstudie) sowie eine Kohortenstudie. In der randomisiert kontrollierten Studie wurden Jungbullen mit mangelhafter Spermienqualität untersucht. Bullen, die über einen Zeitraum von acht Wochen (Screening-Phase) eine progressive Spermienmotilität < 58 % und/oder eine intakte Spermienmorphologie < 90 % in 70 % der gewonnenen Nativspermaproben aufwiesen, wurden zwei Gruppen zugeordnet, der Behandlungs- oder der Kontrollgruppe. Tiere der Behandlungsgruppe erhielten zehn Akupunkturbehandlungen à 25 Minuten an den Punkten Bl 23 und Lg 3 (Körperpunkte) sowie Ovar, ACTH und TSH (Ohrpunkte) über einen Zeitraum von fünf Wochen. Diesem Behandlungsintervall zeitlich entsprechend wurden Bullen der Kontrollgruppe ohne Erhalt einer therapeutischen Maßnahme lediglich in die Behandlungsstände geführt und dort fixiert. Nach der fünfwöchigen

Interventionsphase schloss sich eine elfwöchige Periode der Nachbeobachtung an, woraus sich ein Gesamtbeobachtungszeitraum von 24 Wochen pro Tier ergab. Als Hauptzielparameter wurde der Anteil der Jungbullen erhoben, der im Gegensatz zur Screening-Phase (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) eine physiologische Spermienqualität (progressive Spermienmotilität > 58 % und intakte Spermienmorphologie > 90 % in 70 % der gewonnenen Nativspermaproben) aufwies. Die statistische Auswertung des Hauptzielparameters erfolgte mithilfe des *Fisher-Tests*. Als Nebenzielparameter wurden weitere Spermieigenschaften sowie die Libido der Tiere erfasst: Spermienquantität (Gesamtzahl der Spermien); Spermienmotilität (bewegliche Spermien, progressiv bewegliche Spermien, statische Spermien, langsame Spermien, Kopf-Schlagfrequenz, Linearität, Geradlinigkeit); Spermienmorphologie (morphologisch intakte Spermien, Spermien mit geknicktem Schwanz, Spermien mit Schleifenform, Spermien mit proximalem Zytoplasmotropfen, Spermien mit distalem Zytoplasmotropfen, Spermien mit distalem-Mittelstückreflex); Libido (Reaktionszeit eines Bullen bis zum Aufsprung, Annahme der Sprungpartner). Die Nebenzielparameter wurden mittels einer Zeitreihenanalyse über 24 Wochen ($\hat{=}$ Gesamtbeobachtungszeitraum) untersucht. Statistische Berechnungsgrundlage hierfür war das GEE (*Generalized Estimating Equations*)-Modell. Des Weiteren wurde ein Vergleich der Nebenzielparameter zwischen den Gruppen jeweils vor (1.–8. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) und nach Intervention (15.–22. Woche des Gesamtbeobachtungszeitraums) mithilfe des *Mann-Whitney-U-Tests* durchgeführt. Die Spermagewinnung erfolgte durchschnittlich zweimal pro Woche pro Bulle. Die Spermaproben wurden mithilfe eines CASA-Systems analysiert; die Libido wurde über einen Dokumentationsbogen bewertet.

In der Kohortenstudie wurden zudem Jungbullen mit guter Spermienqualität untersucht, um auszuschließen, dass Akupunktur sich nachteilig auf Spermienqualität und Libido auswirkt. Bullen, die während der Screening-Phase eine progressive Spermienmotilität von 63 %–68 % und eine intakte Spermienmorphologie von > 90 % in 70 % der gewonnenen Nativspermaproben aufwiesen, erhielten analog zum Versuchsaufbau der randomisiert kontrollierten Studie zehn Akupunkturbehandlungen. Die Untersuchung erfolgte explorativ; es wurde nicht zwischen Haupt- und Nebenzielparameter unterschieden.

Ergebnisse:

In die randomisiert kontrollierte Studie wurden 42 Jungbullen mit mangelhafter Spermienqualität eingeschlossen. Vier Tiere schieden vorzeitig aus der Studie aus, sodass die Bullen im Verhältnis von 21:17 auf Behandlungs- und Kontrollgruppe verteilt wurden.

Hinsichtlich des Hauptzielparameters war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen auszumachen. Der Anteil der Tiere mit physiologischer Spermienqualität nach Intervention betrug in der Behandlungsgruppe 6/21, in der Kontrollgruppe 3/17. Auch bezüglich der Nebenzielparameter war, bis auf zwei Ausnahmen (Spermien mit Schleifenform und distalem Zytoplasmatropfen), nach Intervention kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen festzustellen. Unabhängig davon wurde eine signifikante Verbesserung nahezu aller Nebenzielparameter über die Zeit und mit steigendem Alter der Bullen nachgewiesen.

In die Kohortenstudie wurden elf Jungbullen mit guter Spermienqualität eingeschlossen. Zwei Tiere schieden vorzeitig aus der Studie aus, sodass letztendlich neun Tiere in der Auswertung berücksichtigt wurden. Für beinahe alle Parameter wurde eine signifikante Verbesserung über die Zeit dokumentiert.

Schlussfolgerungen:

Die Ergebnisse der randomisiert kontrollierten Untersuchung liefern keinen Hinweis darauf, dass Akupunktur – mit dem in dieser Studie angewendeten Schema – Spermienqualität und Libido von Jungbullen zu verbessern vermag. Die in humanmedizinischen Studien nachgewiesene positive Wirkung von Akupunktur auf die Spermienqualität konnte demnach nicht bestätigt werden. Primär ursächlich hierfür ist möglicherweise das in der vorliegenden Analyse angewendete Akupunkturkonzept. So wurde aus Gründen der Sicherheit wohlweislich auf – in der Literatur als wirksam beschriebene und in den humanmedizinischen Studien angewendete – Punkte am Bauch sowie an den Hintergliedmaßen des Bullen verzichtet. Eine Angleichung des Therapiekonzepts an das der Humanmedizin ginge zwingend mit strengen Fixationsmaßnahmen der Bullen einher, die mit erheblichem Stress für Tier und Therapeuten verbunden wären. Eine Empfehlung für die Durchführung dahingehender Studien ist daher nicht abzugeben.

Den Ergebnissen der Kohortenstudie zufolge ist eine nachteilige Wirkung von Akupunktur auf Spermienqualität und Libido genomisch geprüfter Jungbullen mit guter Spermienqualität nicht zu belegen.

Die vorliegende Arbeit wurde durch den „Förderverein Bioökonomieforschung e. V.“, die „Dres. Jutta und Georg Bruns-Stiftung“ sowie das Unternehmen „IMV Technologies“ unterstützt.

VII. SUMMARY

The effectiveness of acupuncture in improving semen quality of genomically proven young bulls – a randomized controlled trial

Introduction:

With the introduction of genomic selection, young bulls are increasingly being used for the collection of sperm due to the early availability of breeding values. Because some of these bulls do not meet the required semen quality, insemination stations are interested in implementing therapeutic methods to improve the semen quality. However, apart from upgrading the general conditions surrounding the rearing of bulls as well as the semen collection and processing procedure, no generally accepted options exist to improve the semen quality of young bulls. In human medicine, the use of acupuncture on men has been found to have a positive impact on semen quality. As a part of Traditional Chinese (Veterinary) Medicine, this millennia old form of therapy stimulates certain points on the skin via the use of very thin needles. Due to its low costs as well as its limited invasiveness, acupuncture is well suited for use in the insemination business. The goal of this thesis was to explore the effect of acupuncture on the semen quality and libido of genomically tested young bulls.

Material and Methods:

Two studies were performed: a randomized controlled trial (main study) and a cohort study. In the randomized controlled trial, young bulls with poor semen quality were studied. Bulls, which, over a period of eight weeks (screening phase), displayed a progressive motility < 58 % and/or an intact morphology < 90 % in 70 % of sperm samples were divided into two groups, the treatment group and the control group. Over the course of five weeks, animals in the treatment group received ten 25-minute acupuncture treatments at the points Bl 23 and GV 3 (points on the body) as well as at Ovary 23, ACTH and TSH (points on the ear). Over the same time intervals, bulls in the control group were simply led into the treatment boxes and held there for 25 minutes. After the five-week intervention period, a follow-up of eleven weeks observation time brought the total observation time to 24 weeks per animal. As the primary outcome measure was given by the share of young bulls, which, after the intervention phase (15.–22. week of the total observation period), but not during the screening phase (1.–8. week of the total observation period), displayed a physiological semen quality (progressive motility > 58 % and/or an intact morphology > 90 % in 70 % of sperm samples). The statistical analysis of the primary outcome parameter was

performed by means of the Fisher test. As secondary outcome measures, further sperm parameters as well as the libido of the animals were measured. These were the sperm quantity (total sperm count), the sperm motility (motile sperms, progressive sperms, static sperms, slow sperms, beat cross frequency, linearity, straightness), the sperm morphology (sperms with intact morphology, sperms with bent tail, sperms with coiled tail, sperms with proximal droplet, sperms with distal droplet, sperms with distal midpiece reflex) and the libido (reaction time of bulls until mounting and acceptance of the mounting partner). These secondary outcome measures were studied using a time series analysis over the course of 24 weeks ($\hat{=}$ total observation period). The basis for statistical calculations was provided by the GEE (Generalized Estimating Equations) model. Furthermore, a comparison of the secondary outcome measures between groups before and after the intervention period (1.–8. week and 15.–22. week of the total observation period, respectively) was performed with the help of the Mann-Whitney-U-Test. Sperm samples were collected on average twice weekly per bull. The samples were analysed using a CASA system and the libido was recorded using a documentation form.

In the cohort study, young bulls with good sperm quality were studied to ensure that acupuncture did not negatively impact sperm quality and libido. In an identical manner to the experiment conducted for the randomized controlled study, bulls which had a progressive motility of 63 %–68 % and an intact morphology of > 90% in 70 % of sperm samples, received ten acupuncture sessions. The study was performed in an explorative fashion; no distinction was made between primary and secondary outcome measures.

Results:

The randomized controlled trial contained 42 young bulls with poor semen quality. Four of these did not qualify for the study, resulting in a distribution of 21:17 bulls between the treatment and control group respectively. With regards to the primary outcome parameters, no significant difference between the two groups was detected. The fraction of animals with a physiological sperm quality was 6/21 in the treatment group and 3/17 in the control group. With the exception of sperms with coiled tail and sperms with distal droplet, the secondary outcome parameter also showed no significant difference between both groups. Independent of these findings, a significant improvement in almost all secondary outcome parameters was observed over the time and with increasing age of the bulls.

Conclusion:

The results of the randomized control trial do not indicate that acupuncture, in the manner

performed in this trial, improves the sperm quality or libido of young bulls in any significant way. Therefore, the positive influence of acupuncture found in human medical research could not be confirmed. This could be primarily due to the acupuncture technique employed in this trial. For safety reasons, certain points on the midsection and the hind limbs of the bulls were omitted. The analogous points in humans have been documented as effective in the literature and have been employed in medical studies. An extension of therapy methods to include these points would involve restraints on the movement of the bulls, which would result in severe stress for both the animal and the therapist. Therefore, further studies to this end are not to be recommended.

The results of the cohort study indicate no adverse effect of acupuncture on the sperm quality and libido of young bulls with good sperm quality.

This thesis was supported by the “Förderverein Bioökonomieforschung e. V”, the “Dres. Jutta und Georg Bruns-Stiftung” and “IMV Technologies”.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Adeel M, Ijaz A, Aleem M, Rehman H, Yousaf M, Jabbar M. *Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (Bubalus bubalis) through supplementation of fat*. Theriogenology 2009; 71: 1220-1225.

Almquist J, Branas R, Barber K. *Postpuberal changes in semen production of Charolais bulls ejaculated at high frequency and the relation between testicular measurements and sperm output*. Journal of Animal Science 1976; 42: 670-676.

Almquist J (1978) *Bull semen collection procedures to maximize output of sperm*. Proceedings of the 7th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, 1978. Columbia, MO. 33-36.

Altman S. *Techniken und Instrumente*. In: Akupunktur in der Tiermedizin: Lehrbuch und Atlas für die Klein- und Großtierbehandlung. Schoen AM, ed. München, Jena: Urban & Fischer Verlag 2009: 87-102.

Amann R. *Endocrine Changes Associated with Onset of Spermatogenesis in Holstein Bulls*. Journal of Dairy Science 1983; 66: 2606-2622.

Amann R, DeJarnette J. *Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: a paradigm shift*. Theriogenology 2012; 77: 795-817.

Amann RP, Katz DF. *Reflections on casa after 25 years*. Journal of andrology 2004; 25: 317-325.

Amann RP, Waberski D. *Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments*. Theriogenology 2014; 81: 5-17.

Amaregouda S (2014) *Studies on the Effects of Prostaglandin F2 α , Oxytocin and Gonadotropin Releasing Hormone on Libido and Semen Characteristics of Holstein Friesian Bulls*. Thesis, Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar.

Ambronn G, Petermann U, Werner L (2001) *Ohrakupunktur in der Tiermedizin: Anwendung bei den wichtigsten Tierarten*. Sonntag Verlag, Stuttgart.

Andersson M, Hellman T, Holmström B, Jokinen L. *Computerized and subjective assessments of post-thaw motility of semen from Finnish Ayrshire AI bulls in relation to non-return rates*. Acta veterinaria scandinavica 1992; 33: 89-93.

Andrabi S. *Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa*. Reproduction in domestic animals 2009; 44: 552-569.

- Angermaier M (2018) *Leitfaden Ohrakupunktur*. Urban & Fischer Verlag, München.
- Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e. V. *ADR-Empfehlung 8.2: Anforderungen an Zuchtbullen für den Einsatz in der KB und für Deckbullen*. 2006: <https://www.rindschwein.de/services/files/adr/richtlinien-empfehlungen/ADR-Empfehlung%208.2.pdf>. Zuletzt aufgerufen am 21.02.2020.
- Argiris A, Ondho Y, Santoso S, Kurnianto E (2018) *Effect of Age and Bulls on Fresh Semen Quality and Frozen Semen Production of Holstein Bulls in Indonesia*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 1-10.
- Arlt S, Drillich M, Heuwieser W. *Einfluss der Akupunktur auf die Spermaqualität beim Bullen*. Tierärztliche Umschau 2006; 61: 239-245.
- Arlt S, Heuwieser W. *Akupunktur bei Libidomangel eines Bullen*. Zeitschrift für Ganzheitliche Tiermedizin 2009; 23: 115-119.
- Arthington J, Corah L, Hill D. *The effect of dietary zinc level and source on yearling bull growth and fertility*. The Professional Animal Scientist 2002; 18: 282-285.
- Asad L, Husain S, Rahman M, Khandoker M, Hossain M, Rahman M. *Genetic and Non-genetic Factors Affecting the Semen Quality of Bulls*. Pakistan Journal of Biological Sciences 2004; 7: 1903-1907.
- Bailey JL, Robertson L, Buhr MM. *Relationships among in vivo fertility, computer-analysed motility and in vitro Ca²⁺ flux in bovine spermatozoa*. Canadian Journal of Animal Science 1994; 74: 53-58.
- Barbas J, Mascarenhas R. *Cryopreservation of domestic animal sperm cells*. Cell Tissue Bank 2009; 10: 49-62.
- Barnett AG, Van Der Pols JC, Dobson AJ. *Regression to the mean: what it is and how to deal with it*. International journal of epidemiology 2004; 34: 215-220.
- Barth AD, Bowman PA, Bo GA, Mapletoft R. *Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle*. The Canadian Veterinary Journal 1992; 33: 31-39.
- Barth AD, Waldner CL. *Factors affecting breeding soundness classification of beef bulls examined at the Western College of Veterinary Medicine*. The Canadian Veterinary Journal 2002; 43: 274-284.
- Beran J, Stádník L, Ducháček J, Toušová R, Louda F, Štolc L. *Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen*. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis 2011; 59: 37-44.

- Berndtson W, Igboeli G. *Spermatogenesis, sperm output and seminal quality of Holstein bulls electroejaculated after administration of oxytocin*. Journal of reproduction and fertility 1988; 82: 467-475.
- Bhakat M, Mohanty T, Raina V, Gupta A, Khan H, Mahapatra R, Sarkar M. *Effect of age and season on semen quality parameters in Sahiwal bulls*. Tropical animal health and production 2011; 43: 1161-1168.
- Bidouee F, Shamsa A, Jalali M. *Effect of Acupuncture on Azoospermic Male*. Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation 2011; 22: 1039.
- Birch S, Hammerschlag R, Trinh K, Zaslowski C. *The non-specific effects of acupuncture treatment: when and how to control for them*. Clinical Acupuncture and Oriental Medicine 2002; 3: 20-25.
- Bischko J (1994) *Praxis der Akupunktur: Einführung in die Akupunktur Band. 1*. Haug Verlag, Heidelberg.
- Boujenane I, Boussaq K. *Environmental effects and repeatability estimates for sperm production and semen quality of Holstein bulls*. Archiv Tierzucht 2013; 56: 971-979.
- Brito L, Silva A, Rodrigues L, Vieira F, Deragon L, Kastelic J. *Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in Bos indicus and Bos taurus AI bulls in Brazil*. Animal Reproduction Science 2002; 70: 181-190.
- Brito LF, Silva AE, Barbosa RT, Kastelic JP. *Testicular thermoregulation in Bos indicus, crossbred and Bos taurus bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production*. Theriogenology 2004; 61: 511-528.
- Brown B. *A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams*. Reproduction Nutrition Development 1994; 34: 89-114.
- Bruno G, Fan AY, Faggert S. *Dr. Gene Bruno: The beginning of the acupuncture profession in the United States (1969-1979) - Acupuncture, medical acupuncture and animal acupuncture*. Journal of integrative medicine 2015; 13: 281-288.
- Busch W. *Andrologie beim Bullen*. In: Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Busch W, Holzmann A, eds. Stuttgart: Schattauer Verlag 2001: 119-216.
- Bustos-Obregon E, Courot M, Flechon JE, Hochereau-de-revierts MT, Holstein AF. *Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man*. Andrologia 1975; 7: 141-163.
- Chan B, Holzmann A, Rausch W-D, Bamberg E. *Auswirkungen einer Akupunkturbehandlung beim Eber auf die Samenqualität*. Reproduction in domestic animals 1990; 25: 109.

- Chander R, Bugalia NS, Karwasra S, Garg SL. *Testosterone profiles and seminal characteristics in GnRH treated cow bulls*. Indian Journal of Animal Sciences 2004; 74: 180-181.
- Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B, Woelders H. *Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports*. Theriogenology 2006; 65: 1875-1890.
- Chen H, Liu H, Tan S, Yang N, Wang J, Yang K. *Effects of supplement with letrozole on the hormone level in plasma, seminal plasma and semen quality of bulls*. Journal of Nanjing Agricultural University 2017; 40: 732-738.
- Chenoweth P. *Sexual behavior of the bull: a review*. Journal of Dairy Science 1983; 66: 173-179.
- Chenoweth P, Chase Jr C, Thatcher M, Wilcox C, Larsen R. *Breed and other effects on reproductive traits and breeding soundness categorization in young beef bulls in Florida*. Theriogenology 1996; 46: 1159-1170.
- Cheung F. *Made in China*. Nature 2011; 480: 82-83.
- Christensen P, Brockhoff P, Lehn-Jensen H. *The relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls*. Reproduction in domestic animals 1999; 34: 503-507.
- Claici D. *Acupuncture for the Treatment of Cryptozoospermia*. Medical Acupuncture 2008; 20: 277-279.
- Clément C, Kneubühler J, Urwyler A, Witschi U, Kreuzer M. *Effect of maca supplementation on bovine sperm quantity and quality followed over two spermatogenic cycles*. Theriogenology 2010; 74: 173-183.
- Clemmons-Chevis C. *A preliminary study on the transposition of meridians and acupuncture points from the canin and equine species to the Atlantic bottlenose dolphin, Tursiops truncatus*. American Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine 2007; 2: 23-32.
- Colégio Brasileiro De Reprodução Animal C (1998) *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*.
- Cooper TG, Yeung C-H. *Computer-aided evaluation of assessment of "grade a" spermatozoa by experienced technicians*. Fertility and sterility 2006; 85: 220-224.
- Coulter G, Cook R, Kastelic J. *Effects of Dietary Energy on Scrotal Surface Temperature, Seminal Quality, and Sperm Production in Young Beef Bulls*. Journal of Animal Science 1997; 75: 1048-1052.

Cseh S, Polichronopoulos T, Solti L. *12 Prediction of bull fertility by computer assisted semen analysis*. *Reproduction, Fertility and Development* 2003; 16: 128-129.

Cupic Z, Sinovec Z, Veselinovic Snezana IO, Veselinovic S, Medic D, Ivancev N, Grubac S (1998) *The effect of dietary zinc, on semen quality in holstein-friesian bulls*. 4th International Symposium on Animal Reproduction. Ohrid, Macedonia. 96.

Curry MR. *Cryopreservation of semen from domestic livestock*. *Reviews of reproduction* 2000; 5: 46-52.

de Castro SRS, Morini AC, da Silva AdSL, Neves KAL, Minervino AHH, de Moura Meneses AA, Vale WG. *Influence of Seasonality on Buffalo Semen*. *Animal and Veterinary Sciences* 2017; 5: 45-51.

de Souza M, Costa-e-Silva E, Macedo G, Soares B, Zúccari C. *The effect of individualized homeopathic treatment on the semen quality of bulls with reproductive disorders: a case series*. *Homeopathy* 2012; 101: 243-245.

Despeux C. *Aperçu historique de l'art vétérinaire en Chine*. *Revue d'Acupuncture Veterinaire* 1981; 9: 15-22.

Dieterle S, Li C, Greb R, Bartzsch F, Hatzmann W, Huang D. *A prospective randomized placebo-controlled study of the effect of acupuncture in infertile patients with severe oligoasthenozoospermia*. *Fertility and sterility* 2009; 92: 1340-1343.

Dott H, Foster G. *The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analysing computer*. *Journal of reproduction and fertility* 1979; 55: 161-166.

Draehmpaehl D, Zohmann A (2009) *Akupunktur bei Hund und Katze: Wissenschaftliche Grundlagen und Punkteatlas*. Sonntag Verlag, Stuttgart.

Eddy EM, Toshimori K (2015) *The Spermatozoon*. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Eds Plant TM, Zeleznik AJ. Elsevier Verlag, UK, USA. 99-148.

Eibl K (1959) *Lehrbuch der Rinderbesamung: Grundlagen, Technik, Organisation und züchterische Probleme der Samenübertragung beim Rind*. Paul Parey Verlag, Berlin.

Ekstedt E, Söderquist L, Plöen L. *Fine structure of spermatogenesis and Sertoli cells (Epitheliocytus sustentans) in the bull*. *Anatomia, histologia, embryologia* 1986; 15: 23-48.

Endres HG, Diener H-C, Maier C, Böwing G, Trampisch H-J, Zenz M. *Akupunktur bei chronischen Kopfschmerzen*. *Deutsches Ärzteblatt* 2007; 104: 114-122.

Eng J. *Sample size estimation: how many individuals should be studied?* *Radiology* 2003; 227: 309-313.

- Ennen B, Berndtson W, Mortimer R, Pickett B. *Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in 25-ml straws*. Journal of Animal Science 1976; 43: 651-656.
- Eul-Matern C (2014) *Taschenatlas Akupunktur bei Hund und Katze: 22 Tabellen*. Sonntag Verlag, Stuttgart.
- Everett R, Bean B. *Environmental influences on semen output*. Journal of Dairy Science 1982; 65: 1303-1310.
- Farrell P, Presicce G, Brockett C, Foote R. *Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility*. Theriogenology 1998; 49: 871-879.
- Faul F, Erfelder E, Lang A-G, Buchner A. *G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences*. Behavior Research Methods 2007; 39: 175-191.
- Fawcett DW. *A Comparative View of Sperm Ultrastructure*. Biology of reproduction 1970; 2: 90-127.
- Fetterolf PM, Rogers BJ. *Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters*. Molecular Reproduction and Development 1990; 27: 326-331.
- Fields M, Burns W, Warnick A. *Age, Season and Breed Effects on Testicular Volume and Semen Traits in Young Beef Bulls*. Journal of Animal Science 1979; 48: 1299-1304.
- Fischl F, Riegler R, Bieglmayer C, Nasr F, Neumark J. *Die Beeinflussbarkeit der Samenqualität durch Akupunktur bei subfertilen Männern*. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 1984; 44: 510-512.
- Fleming P. *Atlas der transpositionellen Pferdeakupunktur*. In: Akupunktur in der Tiermedizin: Lehrbuch und Atlas für die Klein- und Großtierbehandlung. Schoen AM, ed. München, Jena: Urban & Fischer Verlag 2009: 381-422.
- Focks C, Frühauf H, Hertzner D, Höll A, Kubny M. *Theoretische Grundlagen*. In: Leitfaden Chinesische Medizin. Focks C, ed. München, Jena: Urban & Fischer Verlag 2010: 35-140.
- Fuente L, Sanchez-Garcia L, Vallejo M. *Reproductive characters in Galician Blonds. I. Characters of semen used for artificial insemination*. Anales de la Facultad de Veterinaria de Leon 1984; 30: 119-125.
- Fuerst-Waltl B, Schwarzenbacher H, Perner C, Sölkner J. *Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls*. Animal Reproduction Science 2006; 95: 27-37.

Fujikawa T, Imamura S, Tokumaru M, Ando T, Gen Y, Hyon S-H, Kubota CJC. *Cryoprotective effect of antifreeze polyamino-acid (Carboxylated Poly-L-Lysine) on bovine sperm: A technical note*. Cryobiology 2018; 82: 159-162.

Gábor G, Mézes M, Tözsér J, Bozo S, Szücs E, Barany I. *Relationship among testosterone response to GnRH administration, testes size and sperm parameters in Holstein-Friesian bulls*. Theriogenology 1995; 43: 1317-1324.

Garner D, Thomas C, Gravance C, Marshall C, DeJarnette J, Allen C. *Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm*. Theriogenology 2001; 56: 31-40.

Gerhard I, Jung I, Postneek F. *Effects of acupuncture on semen parameters/hormone profile in infertile men*. Molecular Andrology 1992; 4: 9-25.

Gholami H, Chamani M, Towhidi A, Fazeli M. *Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls*. Theriogenology 2010; 74: 1548-1558.

Gillan L, Kroetsch T, Maxwell WM, Evans G. *Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls*. Animal Reproduction Sciences 2008; 103: 201-214.

Gleditsch JM (2002) *MAPS: MikroAkuPunktSysteme*. Hippokrates Verlag, Stuttgart.

Gockel M. *Mehr Zuchtfortschritt durch genomische Typisierung weiblicher Tiere*. Rind im Bild 2017; 1: 77-80.

Golbs S. *Beeinflussung der männlichen Fertilität durch Pharmaka, Umweltgifte und Spurenelemente*. In: Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Busch W, Holzmann A, eds. Stuttgart: Schattauer Verlag 2001: 461-484.

Graham J, Mocé E. *Fertility evaluation of frozen/thawed semen*. Theriogenology 2005; 64: 492-504.

Gropper M (2015) *Untersuchungen zum Einfluss der Fütterung von Fett auf die Spermaqualität Deutscher Fleckviehbullen*. Thesis, University of Zurich.

Gurfinkel E, Cedenho AP, Yamamura Y, Srougi M. *Effects of acupuncture and moxa treatment in patients with semen abnormalities*. Asian journal of andrology 2003; 5: 345-348.

Gürler H, Calisici O, Calisici D, Bollwein H. *Effects of feeding omega-3-fatty acids on fatty acid composition and quality of bovine sperm and on antioxidative capacity of bovine seminal plasma*. Animal Reproduction Science 2015; 160: 97-104.

Habacher G, Pittler MH, Ernst E. *Effectiveness of acupuncture in veterinary medicine: systematic review*. Journal of veterinary internal medicine 2006; 20: 480-488.

- Hafs H, Louis T, Waters R, Stellflug J, Haynes N. *Increased sperm output of rabbits and bulls treated with prostaglandin F2 α* . Prostaglandins 1974; 8: 417-422.
- Haidl G, Becker A, Henkel R. *Poor development of outer dense fibres as a major cause of tail abnormalities in the spermatozoa of asthenoteratozoospermic men*. Human Reproduction 1991; 6: 1431-1438.
- Haidl G. *Medikamentöse Therapiemöglichkeiten bei männlichen Fertilitätsstörungen*. Der Urologe, [A] 2003; 42: 1621-1630.
- Haltrecht H. *Veterinary acupuncture*. The Canadian Veterinary Journal 1999; 40: 401.
- Hamilton-Thorne (2016) *IVOS II Clinical Hardware Manual*.
- He J, Li D, He Y, Sun K, Pang Y, Wei J. *Acupuncture-moxibustion therapy for infertility due to sperm abnormality* Journal of Acupuncture and Tuina Science 2011; 9: 215-218.
- Heerde M (1999) *Pferdebehandlung mit traditioneller chinesischer Veterinärmedizin (TCVM)*. Sonntag Verlag, Stuttgart.
- Hemm D. *Physiologie und Pathologie der Fruchtbarkeit und Fortpflanzung aus Sicht der TCM*. In: Chinesische Medizin bei Fertilitätsstörungen; Erfolgreiche Behandlung bei unerfülltem Kinderwunsch. Noll A, ed. Stuttgart: Hippokrates Verlag 2008: 72-89.
- Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I. *Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 2001; 18: 213-218.
- Hirwa CDA, Kugonza DR, Amahoro E, Ingabire C, Niyiragira V, Myambi C, Manzi M, Murekezi T, Nyabinwa P, Nshimiyimana AM, Kanyandekwe C, Gahakwa D. *Influence of breed, season and age on quality bovine semen used for artificial insemination*. International Journal of Livestock Production 2017; 8: 72-78.
- Hochschulz A (2003) *Charakterisierung von Proteinen und Untersuchung des IGF-Systems im Eberseminalplasma*. Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hoflack G, Opsomer G, Van Soom A, Maes D, de Kruif A, Duchateau L. *Comparison of sperm quality of Belgian Blue and Holstein Friesian bulls*. Theriogenology 2006; 66: 1834-1846.
- Holt WV, Van Look KJ. *Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality*. Reproduction 2004; 127: 527-535.
- Holzmann A. *Die objektive Beurteilung der Spermatozoenmotilität - Entwicklung eines neuen Untersuchungsverfahrens*. Wiener Tierärztliche Monatsschrift 1986; 74: 243-250.

IBM® Corp. Released (2017) *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0*. Armonk, NY.

ICH-Steering-Committee (1996) *ICH harmonised tripartite guideline: guideline for good clinical practice E6 (R1)*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Washington, DC. 1-53.

Igna V, Moje A, Mircu C, Roman M, Ghiurca C, Casalean D, Cernescu H. *The influence of some environmental factors and age on semen production of Fleckvieh bulls*. *Lucrări Științifice Medicină Veterinară* 2010; 63: 56-63.

Iguer-Ouada M, Verstegen J. *Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis*. *Theriogenology* 2001; 55: 733-749.

Imrie RH, Ramey DW, Buell PD, Ernst E, Bassar SP. *Veterinary acupuncture and historical scholarship: claims for the antiquity of acupuncture*. *The Scientific Review of Alternative Medicine* 2001; 5: 133-139.

Irnich D. *Anforderungen, Möglichkeiten und Grenzen der Evidenz-basierten Akupunkturrevaluation*. *Deutsche Zeitschrift für Akupunktur* 2000; 43: 117-125.

Jackson P, Cockcroft P (2008) *Clinical examination of farm animals*. John Wiley & Sons, Hoboken, USA.

Jaggar D. *History and basic introduction to veterinary acupuncture*. *Problems in Veterinary Medicine* 1992; 4: 1-11.

Jaggar DH, Robinson NG. *Die Geschichte der Akupunktur in der Tiermedizin*. In: *Akupunktur in der Tiermedizin: Lehrbuch und Atlas für die Klein- und Großtierbehandlung*. Schoen AM, ed. München, Jena: Urban & Fischer Verlag 2008: 3-15.

Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Hrd M, Hrd MC, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. *Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden*. *Theriogenology* 1999; 52: 641-658.

Januškauskas A, Žilinskas H. *Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility*. *Veterinarija ir zootechnika* 2002; 17: 39.

Jin Z, Liu B, Cai J, Jing X, Zhu B, Xing G. *Experimental study for the treatment of asthenozoospermia by electroacupuncture in rats*. *Zhen ci yan jiu = Acupuncture research* 2017; 42: 114-118.

Joechle W. *Veterinary acupuncture in Europe and America: Past and Present*. *American Journal of Acupuncture* 1978; 6: 149-156.

Johnson L. *Efficiency of spermatogenesis*. Microscopy research and technique 1995; 32: 385-422.

Kampik G (1998) *Propädeutik der Akupunktur*. Hippokrates Verlag, Stuttgart.

Karabinus D, Evenson D, Jost L, Baer R, Kaproth M. *Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry*. Journal of Dairy Science 1990; 73: 2364-2371.

Kastelic J, Thundathil J. *Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility*. Reproduction in domestic animals 2008; 43: 368-373.

Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin MJ, Veerapandian C. *Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes*. Animal Reproduction Science 2008; 104: 9-17.

Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G. *Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system—a review*. Reproduction in domestic animals 2011; 46: 165-172.

Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AE, Hassan MA. *Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation*. Theriogenology 2019; 126: 121-127.

Kjaestad H, Ropstad E, Berg KA. *Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen*. Acta veterinaria scandinavica 1993; 34: 299-303.

Kleber JJ (1989) *Traditionelle chinesische Medizin: Syndromdiagnose für Akupunktur und Moxibustionstherapie*. Müller & Steinicke Verlag, München.

Klenner A, Boryczko Z. *Effect of PGF2 alpha and oxytocin on ejaculation in bulls*. Zuchthygiene 1980; 15: 21-27.

Klide AM, Kung SH (1986) *Veterinary acupuncture*. University of Pennsylvania Press, Philadelphia.

Köhn F-M, Haidl G, Schill W-B. *Medikamentöse Therapie bei männlichen Fertilitätsstörungen und Hypogonadismus*. Reproduktionsmedizin 1999; 15: 9-17.

Köhn F, Schill W, Schuppe H. *Welchen Einfluß haben Umweltfaktoren auf die Ejakulatqualität?* Journal für Fertilität und Reproduktion 2000; 10: 15-25.

Kommisrud E, Berg KA. *The Influence of Duration of Sexual Preparation on Bovine Semen Characteristics and Fertility Rates*. Reproduction in domestic animals 1996; 31: 369-371.

Koo S-T, Kim S-K, Kim E-H, Kim J-H, Youn D-H, Lee B-H, Chae Y-B, Choi I-H, Choi S-M. *Acupuncture point locations for experimental animal studies in rats and mice*. Korean Journal of Acupuncture 2010; 27: 67-78.

Kothbauer O, Meng A (1983) *Grundlagen der Veterinärakupunktur–spezielle Akupunktur bei Rind, Schwein und Pferd*. Welsermühl Verlag, München.

Kothbauer O, Meng A (1990) *Grundlagen der Veterinärakupunktur–spezielle Akupunktur bei Rind, Schwein und Pferd*. Welsermühl Verlag, München.

Kothbauer O. *Über die Anwendung von Akupunktur bei Tieren mit Störungen im Bereich des Hypothalamus-Hypophysen-Systems*. Deutsche Zeitschrift für Akupunktur 2005; 48: 22-30.

Krause D. *Männlicher Geschlechtsapparat*. In: Die klinische Untersuchung des Rindes: Begründet von Gustav Rosenberger. Dirksen G, Gründer H-D, Stöber M, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2012: 422-471.

Krause W, Ochsendorf F, Glander H-J. *Computer-assistierte Samenanalyse (CASA), Entzündungsparameter und Aussagefähigkeit von Ejakulatbefunden*. In: Dermatologie an der Schwelle zum neuen Jahrtausend. Plattenberg A, Weigel WN, Moll I, eds. Heidelberg: Springer Verlag 2000: 417-419.

Krokowski C, Fatrai A (2007) *Akupunktur und Phytotherapie bei Kaninchen und Meerschweinchen: 176 Tabellen*. Sonntag Verlag, Stuttgart.

Kucuk E, Bindayi A, Boylu U, Onol F, Gumus E. *Randomised clinical trial of comparing effects of acupuncture and varicocelectomy on sperm parameters in infertile varicocele patients*. Andrologia 2016; 48: 1080-1085.

Kumar D, Kumar P, Singh P, Yadav S, Sarkar S, Bharadwaj A, Yadav P. *Characteristics of frozen thawed semen in predicting the fertility of buffalo bulls*. Indian Journal of Animal Sciences 2014; 84: 389-392.

Kumar N, Verma RP, Singh LP, Varshney VP, Dass RS. *Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative and qualitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (Bos indicus x Bos taurus) bulls*. Reproduction Nutrition Development 2006; 46: 663-675.

Lange G (1985) *Akupunktur der Ohrmuschel*. WBV, Bielefeld.

Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giwercman A. *Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team*. Human Reproduction 2000; 15: 1562-1567.

Layek S, Mohanty T, Kumaresan A, Parks J. *Cryopreservation of bull semen: evolution from egg yolk based to soybean based extenders*. Animal reproduction science 2016; 172: 1-9.

Leiding C. *Künstliche Besamung beim Rind*. In: Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren. Waberski D, Petrunkina A, eds. Stuttgart: Schattauer Verlag 2007: 147-197.

Lewis I (1998) *Innovative Semen Collection Techniques: A new approach for vertebrate animals*. In: A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Monash Medical Centre, Melbourne. 1-13.

Liangyue D, Yijun G, Shuhui H, Xiaoping J, Yang L, Rufen W, Yiaoping W, Xuetai W, Hengze X, Xiuing Y, Jiuling Y (1987) *Chinese Acupuncture and Moxibustion*. Foreign Languages Press, China.

Ligner A (2009) *Charakterisierung von Besamungsbullen anhand der mehrdimensionalen Graustufenanalyse sonografischer Bilder des Genitales sowie einem erweiterten spermatologischen Untersuchungsspektrum*. Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover.

Limehouse JB, Taylor-Limehouse PA. *Östliche Akupunkturkonzepte*. In: Akupunktur in der Tiermedizin: Lehrbuch und Atlas für die Klein- und Großtierbehandlung. Schoen AM, ed. München: Urban & Fischer Verlag 2009: 73-86.

Linford E, Glover F, Bishop C, Stewart D. *The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull*. Journal of reproduction and fertility 1976; 47: 283-291.

Liu DY, N. G, Clarke GN, Baker HG. *Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro*. Journal of andrology 1991; 12: 231-239.

Liu T. *Role of acupuncturists in acupuncture treatment*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2007; 4: 3-6.

Liu T, Yu C-p. *Placebo analgesia, acupuncture and sham surgery*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011: 1-6.

Lunstra DD (1982) *Testicular Development and Onset of Puberty in Beef Bulls*. In: Beef Research Program Progress Report No. 1. . U.S. Meat Animal Research Center, ARM-NC-21, Clay Center. 26-27.

MacPherson H, White A, Cummings M, Jobst KA, Rose K, Niemtow RC. *Standards for reporting interventions in controlled trials of acupuncture: the STRICTA recommendations*. The Journal of Alternative & Complementary Medicine 2002; 8: 85-89.

Malama E, Zeron Y, Janett F, Siuda M, Roth Z, Bollwein H. *Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality*. Theriogenology 2017; 87: 79-90.

Masoumi R, Towhidi A, Javaremi AN, Nabizadeh H, Zhandi M. *Influence of PGF2a on semen quality and libido in Holstein bulls*. Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences 2011; 35: 1-6.

Mathevon M, Buhr M, Dekkers J. *Environmental, Management, and Genetic Factors Affecting Semen Production in Holstein Bulls*. Journal of Dairy Science 1998; 81: 3321-3330.

Maxwell W, Johnson L. *Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma*. Theriogenology 1999; 52: 1353-1362.

Mazur P (1980) *Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos*. Oak Ridge National Laboratory, TN, USA.

Medeiros C, Forell F, Oliveira A, Rodrigues J. *Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?* Theriogenology 2002; 57: 327-344.

Melbaum J, Schwerhoff M, Gehrmeier D, Melbaum H, Wassmuth R. *Einfluss des Alters auf die Spermaproduktion und auf die Non-Return Rate in der künstlichen Besamung von Ersteinsatzbullen der Rasse Holstein-Friesian*. Züchtungskunde 2016; 88: 371-378.

Ming-hua P. *Treatment of Oligospermia by Acupuncture in 39 Cases*. Journal of Acupuncture and Tuina Science 2005; 3: 8-9.

Mingmin Z, Guangying H, Fuer L, Paulus W, Sterzik K. *Influence of Acupuncture on Idiopathic Male Infertility in Assisted Reproductive Technology*. Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences] 2002; 22: 228-230.

Moallem U, Neta N, Zeron Y, Zachut M, Roth Z. *Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen*. Theriogenology 2015; 83: 1110-1120.

Mocé E, Graham J. *In vitro evaluation of sperm quality*. Animal Reproduction Science 2008; 105: 104-118.

Morrell JM, Nongbua T, Valeanu S, Verde IL, Lundstedt-Enkel K, Edman A, Johannisson A. *Sperm quality variables as indicators of bull fertility may be breed dependent*. Animal Reproduction Science 2017; 185: 42-52.

Müller M (2011) *Checkliste Akupunktur für Kleintiere*. Sonntag Verlag, Stuttgart.

Müller VE, Szilagyi J. *Untersuchungen über die Verbesserung der Sperma-Qualität von „Problem-Bullen“ durch Beifütterung von „Miragest“*. Reproduction in domestic animals 1966; 1: 57-66.

Müller VE, Brandl G. *Untersuchung über den Einfluß von Kallikrein auf Merkmale der Ejakulate von Problemstieren*. *Reproduction in domestic animals* 1977; 12: 24-28.

Murphy E, Eivers B, O'Meara C, Lonergan P, Fair S. *Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination*. *Theriogenology* 2018a; 108: 217-222.

Murphy EM, O'Meara C, Eivers B, Lonergan P, Fair S. *Comparison of plant- and egg yolk-based semen diluents on in vitro sperm kinematics and in vivo fertility of frozen-thawed bull semen*. *Animal Reproduction Science* 2018b; 191: 70-75.

Murphy EM, Kelly AK, O'Meara C, Eivers B, Lonergan P, Fair S. *Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre*. *Journal of Animal Science* 2018c; 96: 2408-2418.

Nagy Á, Polichronopoulos T, Gáspárdy A, Solti L, Cseh S. *Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis*. *Acta Veterinaria Hungarica* 2015; 63: 370-381.

Nehring H, Rothe L, Reguszynski K, Schumann-Zühlke D. *Entwicklungstrends in der Qualitätsbeurteilung und Konservierung von Bullensperma*. *Züchtungskunde* 2005; 77: 93-109.

Ni M (2011) *Der Gelbe Kaiser: Das Grundlagenwerk der chinesischen Medizin*. Knauer Verlag, München.

Nickel U. *Was macht Studien zum Nachweis der Wirksamkeit von Akupunktur so schwierig?* *Der Schmerz* 2005; 19: 74-77.

Nizański W, Partyka A, Rijsselaere T. *Use of Fluorescent Stainings and Flow Cytometry for Canine Semen Assessment*. *Reproduction in domestic animals* 2012; 47: 215-221.

Nogier PMF (1980) *Introduction pratique à l'auriculothérapie*. Maisonneuve, Paris.

Nongbua T, Al-Essawe EM, Edman A, Johannisson A, Morrell JM. *Effect of adding heterologous versus homologous bovine seminal plasma prior to cryopreservation on bull sperm quality after thawing*. *Zygote* 2018; 26: 388-394.

Oliveira LZ, de Arruda RP, de Andrade AF, Celeghini EC, Reeb PD, Martins JP, dos Santos RM, Beletti ME, Peres RF, Monteiro FM, Hossepian de Lima VF. *Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program*. *Animal Reproduction Sciences* 2013; 137: 145-155.

Orgebin-Crist M-C, Boivineau L, De Fontaubert Y. *Recherches expérimentales sur la durée de passage des spermatozoïdes dans l'épididyme du taureau*. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 1962; 2: 51-108.

Osmers J, Herrmann C. *Reproduktion und Fitness bei genomisch selektierten Jungbullen*. Züchtungskunde 2017; 89: 9-21.

Oxford Centre for Evidence-Based Medicine. *Levels of Evidence* 2009: <https://www.cebm.net/2009/06/oxford-centre-evidence-based-medicine-levels-evidence-march-2009/>. Zuletzt aufgerufen am 21.02.2020.

Paldusova M, Kopec T, Chladek G, Hosek M, Machal L, Falta D (2014) *The effect of the stable environment and age on the semen production in the Czech Fleckvieh bulls*. Mendel Net. Brno. 178-182.

Parkinson T. *Fertility and infertility in male animals*. In: Veterinary Reproduction and Obstetrics. Noakes D, Parkinson TJ, England GCW, ed. London, England: Elsevier Verlag 2009: 705-764.

Paterson C, Dieppe P. *Characteristic and incidental (placebo) effects in complex interventions such as acupuncture*. Bmj 2005; 330: 1202-1205.

Pei J, Strehler E, Noss U, Abt M, Piomboni P, Baccetti B, Sterzik K. *Quantitative evaluation of spermatozoa ultrastructure after acupuncture treatment for idiopathic male infertility*. Fertility and sterility 2005; 84: 141-147.

Pepper-Yowell AR (2011) *The use of computer assisted semen analysis to predict fertility in Holstein bulls*. Colorado State University.

Pesch S, Bergmann M. *Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation*. Micron 2006; 37: 597-612.

Petrunkina A, Töpfer-Petersen E, Waberski D. *Moderne Verfahren in der spermatologischen Diagnostik*. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie 2008; 5: 262-271.

Petzoldt R. *Akzessorisches Sekret*. In: Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren Busch W, Holzmann A, eds. Stuttgart: Schattauer Verlag 2001: 55-66.

Phillips PH. *Preservation of bull semen*. Journal of biological chemistry 1939; 130: 415.

Platsch K-D (2014) *Die fünf Wandlungsphasen: das Tor zur chinesischen Medizin*. Urban & Fischer Verlag, München.

Polge C, Smith AU, Parkes AS. *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures*. Nature 1949; 164: 666.

Puglisi R, Pozzi A, Foglio L, Spanò M, Eleuteri P, Grollino MG, Bongioni G, Galli A. *The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo*. *Animal Reproduction Science* 2012; 132: 17-28.

Ramey DW. *A review of the evidence for the existence of acupuncture points and meridians*. *AAEP Proceedings* 2000; 46: 220-223.

Ramey DW, Buell PD. *Acupuncture and 'traditional Chinese medicine' in the horse. Part 2: A scientific overview*. *Equine Veterinary Education* 2004; 17: 106-112.

Rao A, Haranath G, Rao C, Rao J. *Effect of prostaglandin F2 alpha on libido, seminal quantity and quality of buffalo bulls*. *Theriogenology* 1986; 25: 689-692.

Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, de Kruif A. *Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer*. *Theriogenology* 2003; 60: 1553-1568.

Rijsselaere T, Van Soom A, Tanghe S, Coryn M, Maes D, de Kruif A. *New techniques for the assessment of canine semen quality: a review*. *Theriogenology* 2005; 64: 706-719.

Rijsselaere T, Van Soom A, Maes D, Nizanski W. *Computer-assisted Sperm Analysis in Dogs and Cats: an Update after 20 Years*. *Reproduction in domestic animals* 2012; 47: 204-207.

Rinderunion Baden-Württemberg e. V. *Zuchtprogramme*. 2019: <https://www.rind-bw.de/de/ueber-uns/satzung-zuchtprogramme/1230.html>. Zuletzt aufgerufen am 01.03.2020.

Robinson NG. *The need for consistency and comparability of transitional acupuncture points across species*. *American Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine* 2006; 1: 14-21.

Robinson NG. *Veterinary acupuncture: an ancient tradition for modern times*. *Alternative & Complementary Therapies* 2007; 13: 259-265.

Romanello N, Botta D, Giro A, Moura A, Pantoja M, Barreto A, Sousa M, Volante C, Garcia A (2018) *Effect of GnRH on scrotal surface temperature, testicular volume and sperm parameters of bulls with poor semen quality*. *Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)*. Florianópolis, SC, Brazil. 459.

Roosen-Runge EC. *The process of spermatogenesis in mammals*. *Biological Reviews* 1962; 37: 343-376.

Rose WJ, Sargeant JM, Hanna WB, Kelton D, Wolfe DM, Wisener LV. *A scoping review of the evidence for efficacy of acupuncture in companion animals*. *Animal health research reviews* 2017; 18: 177-185.

Rosenthal R. *Interpersonal expectations: Effects of the experimenter's hypothesis. Artifacts in behavioral research* 2009; 138-210.

Ross A, Entwistle K. *The effect of scrotal insulation on spermatozoal morphology and the rates of spermatogenesis and epididymal passage of spermatozoa in the bull.* Theriogenology 1979; 11: 111-129.

Rovan E. *Biochemie der Spermatozoa.* In: Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Busch W, Holzmann A, eds.: Schattauer Verlag 2001: 23-54.

Rowe M, Powell J, Kegley E, Lester T, Rorie R. *Effect of supplemental trace mineral source on bull semen quality.* The Professional Animal Scientist 2014; 30: 68-73.

Rüsse I, Sinowatz F (2015) *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere.* Eigenverlag, München.

Sajjad M, Ali S, Akhter S, Ullah N. *Effect of gonadotropin releasing hormone on semen characteristics in Nili-Ravi buffalo bulls.* Pakistan Veterinary Journal 2007; 27: 153.

Samplaski MK, Nangia AK. *Adverse effects of common medications on male fertility.* Nature reviews urology 2015; 12: 401.

Schäfer-Somi S, Aurich C. *Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution.* Animal Reproduction Science 2007; 102: 1-13.

Schoen AM (2008) *Akupunktur in der Tiermedizin: Lehrbuch und Atlas für die Klein- und Großtierbehandlung.* Urban & Fischer Verlag., Stuttgart.

Schulz K, Altman D, Moher D. *CONSORT 2010: Aktualisierte Leitlinie für Berichte randomisierter Studien im Parallelgruppen-Design.* DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift 2011; 136: e20-e23.

Schulz KF, Altman DG, Moher D. *CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials.* BMC medicine 2010; 8: 18.

Schwab W, Kupferschmied H, Bachmann P. *Einflüsse auf die Spermaproduktion beim Rind.* Zuchthygiene 1987; 22: 241-246.

Schwartz C (2008) *Traditionelle Chinesische Medizin für Hunde und Katzen: Akupressur, Phytotherapie, Diätetik, Futterzusätze und Nährstoffe.* Sonntag Verlag, Stuttgart.

Sehner R (2006) *Untersuchungen zum Einsatz modifizierter Medien und Bedingungen bei der Konservierung von Bullensperma.* Thesis, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Sellem E, Broekhuijse ML, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EP. *Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen.* Theriogenology 2015; 84: 1447-1454.

Serres C, Escalier D, David G. *Ultrastructural Morphometry of the Human Sperm Flagellum with a Stereological Analysis of the Lengths of the Dense Fibres.* Biology of the cell 1983; 49: 153-162.

Shealy C, Helms J, McDaniels A. *Treatment of male infertility with acupuncture.* The Journal of Neurological & Orthopaedic Medicine & Surgery 1990; 11: 285-286.

Sierpina VS, Frenkel MA. *Acupuncture: a clinical review.* Southern Medical Journal 2005; 98: 330-337.

Simonik O, Sichtar J, Krejcarkova A, Rajmon R, Stadnik L, Beran J, Dolezalova M, Biniova Z. *Computer assisted sperm analysis—the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: a review.* Indian Journal of Animal Sciences 2015; 85: 3-11.

Siterman S, Eltes F, Wolfson V, Zabłudovsky N, Bartoov B. *Effect of acupuncture on sperm parameters of males suffering from subfertility related to low sperm quality.* Archives of andrology 1997; 39: 155-161.

Siterman S, Eltes F, Wolfson V, Lederman H, Bartoov B. *Does acupuncture treatment affect sperm density in males with very low sperm count? A pilot study.* Andrologia 2000; 32: 31-39.

Smith S, England G. *Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured using computer-aided sperm analysis.* Journal of reproduction and fertility. Supplement 2001; 57: 151-159.

Snoj T, Kobal S, Majdic G. *Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different Bos taurus breeds in a 31-year retrospective study.* Theriogenology 2013; 79: 847-852.

Söderquist L, Rodriguez-Martinez H, Janson L. *Post-thaw motility, ATP content and cytochrome C oxidase activity of AI bull spermatozoa in relation to fertility.* Journal of Veterinary Medicine Series A 1991; 38: 165-174.

Söderquist L, Janson L, Håård M, Einarsson S. *Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy A.I. bulls.* Animal Reproduction Science 1996; 44: 91-98.

Stalhammar E-M, Janson L, Philipsson J. *Genetic Studies on Fertility in AI bulls. I. Age, Season and Genetic Effects on Semen Characteristics in Young Bulls.* Animal Reproduction Science 1989; 19: 1-17.

Steger K. *Spermatogenese und Spermatogenesestörungen*. Reproduktionsmedizin 2001; 17: 137-148.

Steinmetz M (2014) *Taschenatlas Akupunktur beim Pferd* Sonntag Verlag, Stuttgart.

Stelting H-J. *Die Behandlung der Unfruchtbarkeit beim Mann mit TCM*. In: Chinesische Medizin bei Fertilitätsstörungen; Erfolgreiche Behandlung bei unerfülltem Kinderwunsch. Noll A, ed. Stuttgart: Hippokrates Verlag 2008: 256-268.

Stéphan J-M. *A propos d'un cas clinique: intérêt de la moxibustion, de l'acupuncture et de l'électroacupuncture dans une oligoasthénozoospermie*. Acupuncture & Moxibustion 2012; 11: 118-125.

Streitberger K, Kleinhenz J. *Introducing a placebo needle into acupuncture research*. The lancet 1998; 352: 364-365.

Stux G, Stiller N, Berman B, Pomeranz B (2007) *Einführung in die Akupunktur*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Stux G, Stiller N, Berman B, Pomeranz B (2008) *Akupunktur: Lehrbuch und Atlas*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Sukhato P, Thongsodseang S, Utha A, Songsasen N. *Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa*. Animal Reproduction Science 2001; 67: 69-77.

Thews F, Fritz U (2011) *TCM und Akupunktur in Merksätzen*. Haug Verlag, Stuttgart.

Tiandong L, Xianxun H. *Die Behandlung männlicher Sterilität*. Zeitschrift für traditionelle chinesische Medizin 2007; 4: 196-199.

Tsakmakidis IA. *Semen Analysis and Sperm Function Tests as Diagnostic Tools for Male Animals' Infertility*. Open access Journal of Veterinary Science and Research 2016; 1: 1-3.

Turner RM. *Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation*. Reproduction, Fertility and Development 2006; 18: 25-38.

Van Camp SD. *Common causes of infertility in the bull*. Veterinary Clinics: Food Animal Practice 1997; 13: 203-231.

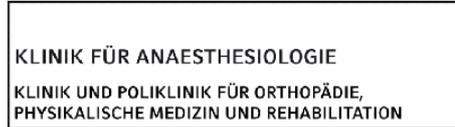
Van der Worp HB, Howells DW, Sena ES, Porritt MJ, Rewell S, O'Collins V, Macleod MR. *Can animal models of disease reliably inform human studies?* PLoS medicine 2010; 7: 1-8.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. *Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice*. Theriogenology 2002; 57: 149-179.

- Vishwanath R, Shannon P. *Storage of bovine semen in liquid and frozen state*. *Animal Reproduction Science* 2000; 62: 23-53.
- Waberski D, Petrunkina A. *Arbeits- und Untersuchungsmethoden*. In: Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren. Busch W, Waberski D, eds. Stuttgart: Schattauer Verlag 2007: 99-145.
- Waskowiak A. *Grundlagen*. In: Handbuch Reflextherapie: Shiatsu, Akupunkt-Massage nach Penzel, Tuina. Kalbantner-Wernicke K, Müller J, Tetling C, Waskowiak A, eds. Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2005: 4-6.
- Weidner W, Diedrich K, Diemer T, Kliesch S, Sperling H. *Infertilität–Diagnostik und Therapie*. *Der Urologe* 2006; 45: 150-156.
- Weitze K-F. *Spermatologische Untersuchung*. In: Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren. Busch W, Holzmann A, eds. Stuttgart: Schattauer Verlag 2001: 87-118.
- Westermayer E (2013) *Lehrbuch der Veterinärakupunktur: Band 1 : Allgemeine Akupunkturlehre*. M. & H. Schaper, Hannover.
- Wood P, Foulkes J, Shaw R, Melrose D. *Semen assessment, fertility and the selection of Hereford bulls for use in AI*. *Journal of reproduction and fertility* 1986; 76: 783-795.
- Xie H, Preast V (2013a) *Xie's Veterinary Acupuncture*. Wiley-Blackwell, Hoboken, USA.
- Xie H, Preast V. *General Rules of Acupuncture Therapy*. In: Xie's veterinary acupuncture. Xie H, Preast V, eds. Hoboken, USA: Wiley-Blackwell 2013b: 235-246.
- Yeste M, Bonet S, Rodríguez-Gil JE, Rivera Del Álamo MM. *Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements?* *Reproduction, Fertility and Development* 2018; 30: 789-798.
- Yin CS, Jeong H-S, Park H-J, Baik Y, Yoon M-H, Choi C-B, Koh HG. *A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model*. *Research in veterinary science* 2008; 84: 159-165.
- Zhen-bei Y. *Treatment of Male Sterility by Acupuncture: A Report of 34 Cases*. *Journal of Acupuncture and Tuina Science* 2005; 3: 6-7.

IX. ANHANG

1. Dokumentationsbogen zur Erfassung der Libido



INTERDISZIPLINÄRE
INNENSTADT
PD DR. MED. DOMINIK IRNICH

TELEFON +49 (0)89 / 4400 - 57508
TELEFAX +49 (0)89 / 4400 - 57507

INTERNET:
WWW.KLINIKUM.UNI-MUENCHEN.DE



POSTANSCHRIFT:
PETTENKOFERSTR. 8A
D-80336 MÜNCHEN

Einsatz von Akupunktur zur Verbesserung der
Spermaqualität genomisch geprüfter Jungbullen – eine
randomisiert kontrollierte Studie

FRAGEBOGEN ZUM VERHALTEN DER JUNGBULLEN WÄHREND DER ABSAMUNG

BITTE KREUZEN SIE ENTSPRECHENDES VERHALTEN WÄHREND DER ABSAMUNG AN:

Der Bulle zeigt eine Reaktionszeit von $\leq 0,5$ min.

Der Bulle zeigt eine Reaktionszeit von $\leq 0,5-5$ min.

Der Bulle zeigt eine Reaktionszeit von 5–10 min.

Der Bulle zeigt eine Reaktionszeit von 10–30 min.

Der Bulle beachtet nur bestimmte, aber nicht alle ihm vorgestellten Sprungpartner

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts
Direktor der Klinik für Anaesthesiologie:
Leiter der Schmerzambulanz Innenstadt:
Direktor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin u. Rehabilitation:
Leiter der Schmerzambulanz Innenstadt:

Prof. Dr. med. B. Zwiffler
PD Dr. med. D. Irnich
Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson
Dr. med. A. Winkelmann

öffentlicher Verkehr:

U1, U2, U3, U6, U7 bis Haltestelle Sendlinger Tor

2. Setup-Parameter des „IVOS II Clinical“

CASA-Setup-Parameter	Interpretation	Einstellung
VAP statisch (VAP _{statisch})	Maximalwert der VAP, damit ein Spermium als „statisch“ gewertet wird	4 $\mu\text{m/s}$
VSL statisch (VSL _{statisch})	Maximalwert der VSL, damit ein Spermium als „statisch“ gewertet wird	1 $\mu\text{m/s}$
Linearität progressiv (STR _{progressiv})	Mindestwert der Linearität, damit ein Spermium als „progressiv beweglich“ gewertet wird	80 %
VAP progressiv (VAP _{progressiv})	Mindestwert der VAP, damit ein Spermium als „progressiv beweglich“ gewertet wird	50 $\mu\text{m/s}$
VSL langsam (VSL _{langsam})	Maximalwert der VSL, damit ein Spermium als „langsam“ gewertet wird	30 $\mu\text{m/s}$
VAP langsam (VAP _{langsam})	Maximalwert der VAP, damit ein Spermium als „langsam“ gewertet wird	20 $\mu\text{m/s}$
Durchschnittliche Länge für Schwanzkrümmung	Schwanzlänge, über die eine Krümmung gemessen wird	5 μm
Minimale Schwanzkrümmungsrate	Mindestwert der Schwanzkrümmungsrate, damit einem Spermium ein „geknickter Schwanz“ zugerechnet wird	20 $^\circ/\mu\text{m}$
Minimale Schwanzkrümmung	Mindestwert des Schwanzkrümmungswinkels, damit einem Spermium eine „Schleifenform“ zugerechnet wird	180 $^\circ$
Proximale Kopflänge Tröpfchen	Mindestlänge für die Summe aus Spermienkopf und proximalem Zytoplasmatropfen, damit einem Spermium ein „proximaler Zytoplasmatropfen“ zugerechnet wird	10,5 μm
Minimaler distaler Abstand Tröpfchen	Mindestabstand von der Kopfbasis bis zum distalen Zytoplasmatropfen, damit einem Spermium ein „distaler Zytoplasmatropfen“ zugerechnet wird	4 μm
Maximale DMR-Tröpfchen bis Schwanzende	Maximaler Abstand zwischen Schwanzende und Zytoplasmatropfen, damit einem Spermium ein „Distaler-Mittelstückreflex“ zugerechnet wird	50 μm
Maximale DMR-Schwanzlänge	Abstand von der Kopfbasis bis zum Schwanzende, damit einem Spermium ein „Distaler-Mittelstückreflex“ zugerechnet wird	20 μm

Abk.: DMR: distaler-Mittelstückreflex; s: Sekunde; VAP: *average path velocity* (dt.: Mittlere Geschwindigkeit, $\mu\text{m/Sek}$); VCL: *curvilinear velocity* (dt.: Kurvilineare Geschwindigkeit, $\mu\text{m/Sek}$); VSL: *straight line velocity* (dt.: Lineare Geschwindigkeit, $\mu\text{m/Sek}$); μm : Mikrometer

3. Entwicklung der Spermienparameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum: Behandlungsgruppe

Die Medianwerte entsprechen der Summe aller Einzeltiermediane pro Untersuchungswoche. Die Einzeltiermediane wurden aus allen pro Tier und Woche gewonnenen Spermproben ermittelt.

	Spermien- samtzahl	Bewegliche Spermien	Progressiv bewegliche Spermien	Statische Spermien	Langsame Spermien	Kopf- Schlagfre- quenz	Lineari- tät	Geradli- nigkeit	Spermien mit IM	Spermien mit GS	Spermien mit SF	Spermien mit PZT	Spermien mit DZT	Spermien mit DMR
w1	MD ICR	80,53 58,68-89,54	50,68 43,05-58,88	19,48 10,46-41,33	5,60 3,93-8,01	26,51 23,38-30,76	0,46 0,43-0,54	0,85 0,82-0,89	95,40 87,88-97,16	1,75 0,78-3,08	0,40 0,20-0,70	0,75 0,55-3,09	0,70 0,50-1,95	1,00 0,61-2,31
w2	MD ICR	80,70 63,20-89,55	49,55 39,88-56,20	19,30 10,45-36,80	5,00 4,30-6,53	25,57 23,85-30,36	0,46 0,40-0,55	0,85 0,80-0,89	96,30 88,43-97,60	1,40 0,83-2,78	0,20 0,10-0,45	0,85 0,60-2,70	0,80 0,40-2,03	0,75 0,53-2,15
w3	MD ICR	79,05 62,35-87,23	49,55 37,58-55,25	20,95 12,78-37,65	5,60 4,33-9,03	26,47 23,81-30,54	0,44 0,40-0,52	0,84 0,80-0,89	93,80 86,95-97,10	2,10 1,03-3,05	0,20 0,08-0,25	1,35 0,40-4,40	1,20 0,45-1,98	1,40 0,65-3,73
w4	MD ICR	76,85 68,10-85,95	51,20 46,15-54,13	23,15 14,05-31,90	5,40 4,55-6,83	25,79 23,77-30,44	0,45 0,40-0,53	0,84 0,81-0,87	92,40 87,35-96,65	1,90 1,13-3,68	0,25 0,10-0,48	1,05 0,43-3,08	1,40 0,65-2,13	1,50 0,75-3,75
w5	MD ICR	75,25 66,85-87,98	49,85 44,80-53,60	24,75 12,03-33,15	5,70 4,35-7,05	26,12 23,60-30,02	0,44 0,41-0,51	0,84 0,80-0,87	93,40 86,95-97,15	2,30 1,18-4,28	0,25 0,13-0,68	1,15 0,53-2,80	1,40 0,85-2,23	1,35 0,70-2,95
w6	MD ICR	76,80 68,80-87,50	49,00 39,25-53,45	23,20 12,50-31,20	5,75 4,90-9,03	25,64 23,29-31,02	0,42 0,40-0,54	0,82 0,81-0,87	92,50 89,03-98,03	2,20 1,33-3,48	0,20 0,10-0,43	1,20 0,55-3,08	1,10 0,70-2,03	1,45 0,58-3,38
w7	MD ICR	76,43 67,15-85,80	45,80 41,06-52,15	23,58 14,20-32,85	5,30 4,55-6,75	25,69 23,08-29,30	0,42 0,38-0,53	0,84 0,78-0,88	92,00 88,90-97,19	2,33 1,14-2,86	0,20 0,06-0,41	0,93 0,63-2,66	1,00 0,45-1,99	1,63 0,64-4,14
w8	MD ICR	71,65 65,13-84,08	46,40 42,88-57,03	28,35 15,93-34,88	6,00 4,75-7,50	25,87 23,74-30,98	0,46 0,42-0,55	0,83 0,81-0,88	91,55 85,53-97,13	2,85 1,18-3,83	0,30 0,15-0,88	1,85 0,48-3,58	1,90 0,85-3,40	2,10 0,73-3,85
w9	MD ICR	73,45 66,13-87,58	51,50 41,63-61,50	26,55 12,43-33,88	5,10 4,35-7,23	26,77 23,53-31,94	0,44 0,41-0,52	0,84 0,81-0,88	91,70 86,58-97,43	1,45 0,95-3,53	0,15 0,08-0,43	1,35 0,45-3,80	2,20 0,93-2,83	1,85 0,63-3,98
w10	MD ICR	74,05 68,85-88,60	52,05 47,50-59,70	25,95 11,40-31,15	5,65 4,60-6,55	26,07 23,68-30,25	0,44 0,40-0,57	0,84 0,82-0,89	93,05 90,45-97,95	1,75 0,70-2,65	0,10 0,00-0,20	1,05 0,30-3,30	1,25 0,55-2,35	1,70 0,65-3,60
w11	MD ICR	78,00 72,58-86,05	55,00 34,88-59,75	22,00 13,95-27,43	5,70 4,03-6,78	25,42 23,95-30,68	0,46 0,38-0,55	0,83 0,80-0,88	93,65 90,63-96,78	1,95 1,15-2,83	0,20 0,03-0,45	0,90 0,58-2,03	1,35 0,85-2,10	1,20 0,65-2,55
w12	MD ICR	79,75 69,03-88,33	57,70 47,05-63,83	20,25 11,68-30,98	4,70 3,73-6,08	26,14 24,32-31,56	0,49 0,41-0,55	0,86 0,83-0,89	93,65 87,83-97,48	1,70 0,98-3,20	0,25 0,08-0,50	1,15 0,55-2,90	1,35 0,70-2,70	1,35 0,73-3,25
w13	MD ICR	76,55 60,40-88,98	46,70 41,85-58,00	23,45 11,03-39,60	6,00 4,35-7,58	25,59 24,09-29,22	0,44 0,40-0,52	0,85 0,81-0,90	95,60 89,15-97,33	1,55 1,05-3,03	0,20 0,10-0,45	0,95 0,45-3,13	1,05 0,60-1,75	1,80 0,53-2,68

	Spermien- samtzahl	Bewegliche Spermien	Progressiv bewegliche Spermien	Statische Spermien	Langsame Spermien	Kopf- Schlagfre- quenz	Lineari- tät	Geradli- nigkeit	Spermien mit IM	Spermien mit GS	Spermien mit SF	Spermien mit PZT	Spermien mit DZT	Spermien mit DMR
w14	MD	79,30	53,25	20,70	4,55	25,97	0,45	0,86	93,90	2,15	0,25	0,75	1,05	0,90
	ICR	74,10-87,43	40,85-66,03	12,58-25,95	3,35-7,60	23,64-30,79	0,39-0,53	0,78-0,90	91,10-97,13	1,00-2,58	0,13-0,45	0,50-3,03	0,55-1,50	0,53-3,08
w15	MD	83,10	55,90	16,90	4,30	26,23	0,44	0,84	96,55	1,60	0,15	0,70	0,90	1,20
	ICR	75,78-88,73	46,03-64,48	11,28-24,23	3,50-6,53	24,38-29,36	0,41-0,55	0,81-0,88	91,88-97,83	0,85-2,43	0,13-0,43	0,40-1,80	0,53-1,68	0,60-2,28
w16	MD	79,70	55,00	20,30	4,50	25,55	0,44	0,84	95,65	1,30	0,20	1,20	1,05	1,25
	ICR	71,63-87,05	34,68-63,18	12,95-28,38	3,03-6,45	23,80-30,63	0,39-0,53	0,81-0,89	91,93-97,25	0,65-2,25	0,05-0,28	0,53-1,70	0,53-1,48	0,65-2,18
w17	MD	79,75	55,60	20,25	4,70	24,93	0,45	0,86	94,80	1,05	0,15	0,85	0,80	0,80
	ICR	68,33-91,63	48,13-64,45	8,38-31,68	3,38-5,60	24,04-29,64	0,41-0,53	0,81-0,88	92,00-98,08	0,68-2,53	0,00-0,33	0,35-2,38	0,43-1,75	0,53-2,08
w18	MD	86,30	61,38	13,70	3,83	25,74	0,47	0,85	96,30	1,55	0,15	0,75	0,75	0,93
	ICR	75,43-90,09	48,44-65,81	9,91-24,58	2,84-5,59	24,38-32,18	0,42-0,54	0,83-0,88	91,44-97,98	0,63-2,45	0,00-0,25	0,35-1,96	0,35-1,41	0,45-2,43
w19	MD	77,25	55,55	22,75	4,80	27,53	0,49	0,87	95,43	1,58	0,13	1,03	1,15	1,13
	ICR	73,70-90,03	46,55-62,85	9,98-26,30	3,44-6,61	24,90-30,61	0,42-0,54	0,81-0,90	91,85-97,15	0,98-2,79	0,00-0,29	0,53-2,60	0,75-1,80	0,76-2,24
w20	MD	81,70	55,85	18,30	3,30	26,90	0,49	0,86	94,90	1,50	0,20	0,85	1,10	0,90
	ICR	73,63-90,38	50,38-67,55	9,63-26,38	2,75-4,93	24,17-31,25	0,43-0,58	0,82-0,90	90,55-97,80	0,68-2,48	0,10-0,45	0,38-2,15	0,58-1,70	0,63-2,13
w21	MD	85,25	60,40	14,75	4,55	27,83	0,50	0,88	96,15	1,10	0,10	0,60	0,75	0,90
	ICR	73,25-89,60	52,80-68,73	10,40-26,75	2,78-5,75	24,52-34,95	0,42-0,61	0,83-0,92	91,28-97,93	0,50-1,80	0,00-0,40	0,38-2,08	0,48-1,33	0,48-2,28
w22	MD	81,65	55,15	18,35	4,30	25,06	0,47	0,87	95,70	1,45	0,15	0,70	0,80	1,05
	ICR	72,05-89,40	48,25-64,85	10,60-27,95	3,70-6,18	24,16-30,66	0,41-0,56	0,81-0,88	92,80-97,58	0,78-2,78	0,08-0,53	0,38-1,65	0,43-1,55	0,45-2,50
w23	MD	84,45	59,65	15,55	4,50	26,41	0,46	0,86	95,85	1,40	0,15	0,70	0,70	0,80
	ICR	74,75-89,53	51,25-67,60	10,48-25,25	3,15-5,13	23,86-34,05	0,41-0,59	0,82-0,90	93,03-97,93	0,75-2,23	0,10-0,23	0,25-1,70	0,38-1,75	0,53-1,73
w24	MD	81,20	62,05	18,80	4,35	26,08	0,50	0,87	96,25	1,30	0,15	0,60	0,85	0,65
	ICR	75,05-90,45	42,10-66,80	9,55-24,95	3,50-5,40	24,33-32,57	0,40-0,62	0,80-0,92	92,90-97,70	0,80-1,85	0,05-0,20	0,30-1,30	0,50-1,10	0,45-2,20

Abk.: DMR: distaler-Mittelstückreflex; DZT: distaler Zytoplasmatrophen; ICR: *interquartile range* (dt.: Interquartilsabstand); IM: intakte Morphologie; GS: geknickter Schwanz; MD: Medianwert; PZT: proximaler Zytoplasmatrophen; SF: Schleifenform; w: Untersuchungswoche

4. Entwicklung der Spermienparameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum: Kontrollgruppe

Die Medianwerte entsprechen der Summe aller Einzeltiermediane pro Untersuchungswoche. Die Einzeltiermediane wurden aus allen pro Tier und Woche gewonnenen Spermaproben ermittelt.

	Spermien- samtzahl	Bewegliche Spermien	Progressiv bewegliche Spermien	Statische Spermien	Langsame Spermien	Kopf- Schlagfre- quenz	Lineari- tät	Geradli- nigkeit	Spermien mit IM	Spermien mit GS	Spermien mit SF	Spermien mit PZT	Spermien mit DZT	Spermien mit DMR
w1	MD ICR	82,60 68,33-88,38	52,30 46,60-55,03	17,40 11,63-31,68	5,25 4,23-8,03	25,61 24,45-28,42	0,43 0,39-0,49	0,83 0,80-0,86	92,15 85,70-96,38	1,65 1,00-3,28	0,15 0,03-0,50	1,05 0,73-3,83	1,65 1,05-2,38	1,70 1,15-2,88
w2	MD ICR	80,60 65,30-87,90	51,85 44,98-55,43	19,40 12,10-34,70	6,35 3,65-8,38	26,60 24,25-29,14	0,44 0,39-0,49	0,83 0,80-0,88	90,55 82,00-96,35	1,55 0,93-3,48	0,35 0,08-0,63	1,60 0,70-5,03	1,80 0,73-2,63	2,10 0,95-3,28
w3	MD ICR	72,10 60,33-88,28	47,10 36,05-56,83	27,90 11,73-39,68	5,35 4,13-8,10	27,43 24,47-28,76	0,42 0,39-0,53	0,82 0,78-0,89	93,30 86,90-96,48	2,80 0,85-5,28	0,30 0,15-0,70	1,65 0,60-3,25	1,70 0,83-3,15	2,50 1,10-3,80
w4	MD ICR	74,75 67,55-81,05	44,83 37,76-53,64	25,25 18,95-32,45	7,85 5,00-8,39	25,09 23,67-29,22	0,44 0,38-0,51	0,83 0,78-0,88	91,08 85,59-94,74	2,43 1,44-3,59	0,25 0,15-0,45	1,28 0,75-3,44	1,93 0,98-3,85	1,90 0,99-5,30
w5	MD ICR	82,65 69,69-88,35	48,78 40,44-52,99	17,35 11,65-30,31	7,03 4,55-9,86	26,81 24,14-30,65	0,45 0,39-0,52	0,82 0,78-0,89	90,85 85,30-95,20	2,35 0,91-3,31	0,20 0,10-0,33	1,75 0,81-5,66	2,05 0,73-3,78	2,30 1,03-2,98
w6	MD ICR	77,15 56,20-85,05	46,60 37,43-54,35	22,85 14,95-43,80	6,35 4,05-11,25	27,47 24,22-32,76	0,46 0,40-0,59	0,86 0,80-0,90	91,35 87,23-95,98	2,35 1,00-3,63	0,35 0,15-0,65	1,00 0,60-2,78	1,45 1,00-2,58	2,80 1,03-4,40
w7	MD ICR	77,45 65,23-79,88	48,30 39,15-53,28	22,55 20,13-34,78	4,80 3,70-7,10	25,09 23,84-31,57	0,41 0,39-0,55	0,81 0,81-0,91	92,20 84,45-95,20	2,15 1,05-3,80	0,20 0,10-0,38	1,45 0,70-3,68	1,85 1,00-3,20	2,55 0,78-4,58
w8	MD ICR	77,35 67,80-87,10	47,85 38,53-60,50	22,65 12,90-32,20	5,60 3,83-5,98	26,00 23,10-28,58	0,45 0,40-0,50	0,85 0,81-0,88	91,95 88,65-95,63	1,75 0,88-2,95	0,30 0,15-0,53	1,15 0,78-1,85	1,60 0,63-2,90	2,50 1,03-4,30
w9	MD ICR	79,98 13,08-87,89	45,65 13,61-59,31	20,03 13,08-35,40	5,08 3,36-6,99	27,48 4,60-30,95	0,45 0,11-0,54	0,86 0,07-0,89	94,40 6,04-96,13	1,85 1,74-3,28	0,13 0,12-0,25	1,03 2,96-2,31	1,58 1,51-2,90	1,70 1,92-3,33
w10	MD ICR	82,10 75,10-88,40	56,35 45,28-64,03	17,90 11,60-24,90	4,45 3,03-10,33	28,06 24,99-31,84	0,46 0,43-0,56	0,86 0,82-0,87	94,05 88,78-96,00	1,90 0,80-4,20	0,15 0,10-0,43	0,80 0,50-1,83	1,75 1,05-1,85	1,80 0,98-2,65
w11	MD ICR	82,75 71,68-90,53	52,20 45,75-61,10	17,25 9,48-28,33	4,35 2,98-6,30	25,45 24,14-29,18	0,44 0,39-0,51	0,84 0,81-0,89	95,85 91,35-96,48	1,30 0,65-2,20	0,15 0,10-0,35	0,85 0,53-1,65	1,35 0,83-1,65	1,55 0,60-3,40
w12	MD ICR	79,05 68,80-82,96	55,38 44,74-61,28	20,95 17,04-31,20	4,60 3,43-6,86	26,70 24,07-33,74	0,46 0,40-0,55	0,86 0,80-0,90	94,70 90,43-96,94	1,70 1,01-2,65	0,18 0,01-0,40	1,08 0,64-1,59	1,60 0,75-2,10	2,03 0,86-3,76
w13	MD ICR	85,30 70,43-88,53	58,80 42,13-63,05	14,70 11,48-29,58	4,70 2,78-7,00	27,61 24,25-31,52	0,49 0,42-0,54	0,87 0,84-0,91	94,25 91,33-96,85	2,00 1,15-2,68	0,25 0,15-0,35	0,95 0,68-1,65	1,10 0,73-2,23	1,95 0,83-3,13

	Spermien- samtzahl	Bewegliche Spermien	Progressiv bewegliche Spermien	Statische Spermien	Langsame Spermien	Kopf- Schlagfre- quenz	Lineari- tät	Geradli- nigkeit	Spermien mit IM	Spermien mit GS	Spermien mit SF	Spermien mit PZT	Spermien mit DZT	Spermien mit DMR
w14	MD 5015,94	82,60	54,40	17,40	4,25	28,53	0,52	0,88	94,30	1,60	0,10	0,90	1,40	1,30
	ICR 3195,37-5942,47	67,90-91,58	49,90-67,80	8,43-32,10	3,48-6,15	24,70-33,35	0,41-0,58	0,81-0,92	91,23-97,30	0,85-2,38	0,03-0,30	0,38-1,55	0,63-2,68	0,73-2,30
w15	MD 4227,45	85,80	54,35	14,20	4,25	25,64	0,43	0,84	96,00	1,30	0,15	0,80	1,00	1,30
	ICR 3178,30-6261,89	72,23-88,23	44,25-62,18	11,78-27,78	3,18-5,60	22,75-29,93	0,38-0,54	0,80-0,88	92,05-97,73	0,80-1,83	0,03-0,28	0,38-2,03	0,65-2,13	0,60-2,30
w16	MD 4931,29	87,60	51,35	12,40	4,40	26,18	0,46	0,86	96,40	1,75	0,15	1,10	1,40	1,70
	ICR 3196,79-6683,44	67,35-89,85	44,28-66,45	10,15-32,65	3,05-6,08	23,19-32,86	0,41-0,54	0,81-0,89	90,65-97,20	0,70-2,65	0,05-0,30	0,48-2,58	0,68-2,30	1,05-2,35
w17	MD 5035,01	84,30	55,65	15,70	3,75	24,63	0,43	0,84	96,55	1,30	0,15	0,80	0,60	1,25
	ICR 4490,42-6188,83	74,35-90,23	46,15-66,48	9,78-25,65	3,43-4,50	23,29-32,27	0,38-0,56	0,80-0,90	90,63-98,03	0,58-2,28	0,08-0,33	0,30-2,25	0,35-2,10	0,70-2,35
w18	MD 4186,72	84,80	55,40	15,20	3,35	25,75	0,44	0,83	95,15	1,20	0,10	0,80	0,95	1,60
	ICR 3560,01-6338,99	73,28-91,03	47,38-61,50	8,98-26,73	2,95-5,53	23,68-31,41	0,40-0,52	0,81-0,89	92,33-97,53	0,63-1,98	0,00-0,20	0,33-1,35	0,58-1,93	0,83-2,73
w19	MD 4576,31	83,15	56,10	16,85	4,10	25,32	0,47	0,85	97,15	1,00	0,10	0,60	0,60	1,20
	ICR 4018,65-6651,01	72,50-91,40	42,73-69,23	8,60-27,50	2,83-5,63	23,60-33,13	0,39-0,54	0,81-0,89	93,18-97,85	0,75-2,20	0,10-0,20	0,40-1,73	0,48-1,15	0,60-1,53
w20	MD 4672,50	87,65	61,60	12,35	3,70	25,65	0,47	0,86	96,45	1,20	0,15	0,85	0,95	1,20
	ICR 3805,43-6879,18	74,88-90,08	47,80-71,55	9,93-25,13	2,85-4,88	23,38-32,41	0,40-0,54	0,83-0,90	93,18-97,23	0,70-1,75	0,00-0,20	0,43-1,83	0,63-1,95	0,38-1,75
w21	MD 4593,26	85,15	58,15	14,85	3,60	24,71	0,45	0,86	95,50	1,50	0,10	0,90	1,05	1,45
	ICR 3277,38-5626,40	65,73-91,05	44,23-70,10	8,95-34,28	2,95-4,73	24,24-33,36	0,42-0,54	0,83-0,89	93,00-97,53	0,75-2,18	0,03-0,38	0,55-1,88	0,53-2,03	0,63-2,58
w22	MD 4839,92	85,10	58,20	14,90	3,75	26,93	0,49	0,86	95,75	1,10	0,20	0,60	1,00	1,10
	ICR 4104,89-7407,29	69,20-90,80	48,50-70,28	9,20-30,80	2,48-5,30	24,22-31,03	0,40-0,57	0,83-0,91	90,08-97,65	0,85-2,73	0,03-0,30	0,33-2,05	0,48-2,00	0,68-3,58
w23	MD 5033,95	83,15	57,20	16,85	3,50	25,76	0,51	0,87	95,70	1,25	0,10	0,80	1,00	1,00
	ICR 3218,80-6357,57	75,45-89,50	47,73-70,20	10,50-24,55	2,60-5,60	24,67-31,61	0,39-0,56	0,80-0,91	93,98-97,70	0,70-1,90	0,08-0,30	0,28-1,33	0,45-2,13	0,63-1,55
w24	MD 4807,84	84,73	56,28	15,28	4,15	27,60	0,50	0,87	96,08	0,85	0,05	0,98	1,13	1,45
	ICR 3560,30-5569,51	66,48-90,90	44,01-70,58	9,10-33,53	3,05-5,54	23,67-30,91	0,42-0,57	0,83-0,90	91,83-97,99	0,30-2,23	0,00-0,24	0,41-2,20	0,45-1,99	0,74-3,46

Abk.: DMR: distaler-Mittelstückreflex; DZT: distaler Zytoplasmatropfen; ICR: *interquartile range* (dt.: Interquartilsabstand); IM: intakte Morphologie; GS: geknickter Schwanz; MD: Medianwert; PZT: proximaler Zytoplasmatropfen; SF: Schleifenform; w: Untersuchungswoche

5. Entwicklung der Spermienparameter über den Gesamtbeobachtungszeitraum: gute Kohorte

Die Medianwerte entsprechen der Summe aller Einzeltiermediane pro Untersuchungswoche. Die Einzeltiermediane wurden aus allen pro Tier und Woche gewonnenen Spermaproben ermittelt.

	Spermien- samtzahl	Bewegliche Spermien	Progressiv bewegliche Spermien	Statische Spermien	Langsame Spermien	Kopf- Schlagfre- quenz	Lineari- tät	Geradli- nigkeit	Spermien mit IM	Spermien mit GS	Spermien mit SF	Spermien mit PZT	Spermien mit DZT	Spermien mit DMR
w1	MD ICR	4503,90 3052,38-5708,23	87,80 85,70-90,43	67,70 64,25-68,90	12,20 9,58-14,30	3,75 3,10-4,40	26,54 24,23-27,33	0,47 0,44-0,48	0,87 0,84-0,88	96,00 94,80-98,10	0,90 0,48-1,40	0,05 0,00-0,50	0,60 0,40-0,73	0,60 0,53-1,70
w2	MD ICR	4196,02 3584,73-6166,11	86,20 81,43-89,45	64,10 58,95-68,20	13,80 10,55-18,58	4,50 3,98-5,88	25,83 24,69-28,03	0,46 0,43-0,48	0,86 0,84-0,88	96,10 94,80-97,33	1,25 0,95-1,73	0,15 0,08-0,38	0,75 0,45-1,13	0,65 0,40-1,18
w3	MD ICR	3329,36 2586,56-7833,61	83,05 76,00-90,75	61,40 57,00-65,15	16,95 9,25-24,00	4,60 3,43-6,13	26,55 25,41-28,35	0,45 0,43-0,48	0,86 0,84-0,87	95,20 92,65-98,18	1,25 0,73-1,93	0,10 0,03-0,70	0,65 0,23-1,23	1,00 0,10-2,05
w4	MD ICR	4763,16 3184,13-5218,50	85,05 80,38-91,05	68,45 59,80-71,25	14,95 8,95-19,63	3,00 2,80-3,95	25,58 24,16-28,33	0,46 0,43-0,51	0,87 0,84-0,90	97,05 95,10-97,80	0,90 0,48-1,40	0,25 0,08-0,30	0,55 0,33-0,80	0,65 0,33-1,50
w5	MD ICR	3987,98 3238,88-7092,87	90,85 87,08-91,90	70,00 67,35-71,73	9,15 8,10-12,93	3,35 2,55-4,15	26,52 25,32-28,28	0,47 0,46-0,51	0,87 0,86-0,89	96,65 96,50-98,40	0,90 0,40-1,08	0,05 0,00-0,15	0,40 0,33-0,78	0,45 0,25-1,38
w6	MD ICR	4654,84 2330,48-5461,63	89,50 85,68-91,10	72,85 66,50-73,73	10,50 8,90-14,33	3,05 2,65-4,05	25,83 24,16-31,68	0,47 0,45-0,55	0,86 0,86-0,92	97,40 96,38-98,33	0,60 0,48-1,03	0,10 0,00-0,45	0,40 0,28-0,65	0,85 0,53-0,93
w7	MD ICR	3661,49 3261,72-5969,25	86,50 83,13-88,23	65,70 61,30-67,98	13,50 11,78-16,88	3,25 2,80-4,88	26,33 24,77-28,51	0,47 0,44-0,50	0,87 0,85-0,88	97,30 95,05-97,58	1,20 0,93-1,43	0,15 0,03-0,23	0,40 0,20-0,53	0,60 0,43-0,85
w8	MD ICR	4463,75 2889,08-5902,85	90,45 88,33-92,23	68,70 66,68-73,13	9,55 7,78-11,68	3,10 2,75-5,15	25,75 24,52-29,21	0,47 0,44-0,52	0,87 0,85-0,90	97,85 96,98-98,65	0,70 0,45-1,03	0,10 0,05-0,33	0,35 0,20-0,40	0,60 0,28-0,93
w9	MD ICR	3730,49 2870,83-7425,42	88,15 87,78-91,70	70,80 62,55-75,48	11,85 8,30-12,23	3,60 3,15-4,45	27,48 24,32-29,99	0,48 0,45-0,54	0,87 0,85-0,90	96,95 96,28-98,28	0,75 0,33-1,08	0,05 0,00-0,15	0,30 0,13-0,95	0,60 0,38-1,70
w10	MD ICR	3421,31 3150,05-7352,19	90,40 88,03-90,80	68,15 63,43-72,75	9,60 9,20-11,98	3,10 2,78-4,25	26,81 24,07-29,66	0,47 0,43-0,52	0,87 0,83-0,90	97,15 96,63-98,00	0,95 0,60-1,18	0,25 0,05-0,30	0,30 0,18-0,50	0,60 0,45-1,28
w11	MD ICR	6584,90 2939,59-8131,78	88,53 86,54-91,66	68,40 63,69-70,45	11,48 8,34-13,46	4,00 2,00-4,40	26,48 24,08-29,58	0,46 0,43-0,57	0,86 0,85-0,90	97,43 97,09-98,38	0,75 0,58-1,18	0,13 0,03-0,34	0,18 0,11-0,40	0,50 0,26-0,84
w12	MD ICR	3604,71 2238,76-6976,90	89,40 87,63-91,15	70,00 67,35-72,65	10,60 8,85-12,38	2,90 2,25-4,18	26,10 25,22-28,90	0,48 0,44-0,55	0,87 0,85-0,91	97,90 97,23-98,23	0,95 0,63-1,30	0,10 0,05-0,20	0,35 0,25-0,40	0,50 0,33-0,60
w13	MD ICR	5075,63 3618,99-5661,61	94,05 88,55-94,73	71,55 64,63-79,68	5,95 5,28-11,45	3,15 2,30-4,00	27,09 25,27-30,84	0,50 0,45-0,54	0,87 0,85-0,90	98,50 96,75-98,78	0,35 0,10-0,93	0,15 0,03-0,25	0,35 0,18-0,45	0,35 0,23-0,95

	Spermien- samtzahl	Bewegliche Spermien	Progressiv bewegliche Spermien	Statische Spermien	Langsame Spermien	Kopf- Schlagfre- quenz	Lineari- tät	Geradli- nigkeit	Spermien mit IM	Spermien mit GS	Spermien mit SF	Spermien mit PZT	Spermien mit DZT	Spermien mit DMR
w14	MD 3768,52	90,25	70,70	9,75	3,15	26,94	0,49	0,88	98,15	0,55	0,00	0,55	0,75	0,40
	ICR 2929,53-6353,49	87,63-92,65	68,90-76,25	7,35-12,38	2,38-3,38	25,08-29,90	0,45-0,58	0,86-0,92	97,25-98,43	0,28-1,08	0,00-0,08	0,28-0,68	0,23-0,90	0,08-0,80
w15	MD 5522,44	91,75	74,40	8,25	3,10	26,98	0,49	0,89	97,70	0,50	0,15	0,45	0,50	0,50
	ICR 4554,76-7531,38	85,25-94,45	68,00-77,00	5,55-14,80	2,25-4,50	25,87-31,05	0,47-0,59	0,87-0,92	97,28-98,38	0,20-0,90	0,05-0,28	0,28-0,75	0,35-0,73	0,18-0,85
w16	MD 5624,28	90,50	74,20	9,50	2,55	27,54	0,50	0,89	98,00	0,50	0,15	0,25	0,60	0,40
	ICR 3188,78-7075,27	88,25-93,23	68,95-80,45	6,78-11,75	2,48-3,85	26,26-29,81	0,47-0,61	0,87-0,93	97,30-98,60	0,25-0,75	0,00-0,25	0,15-0,45	0,33-0,95	0,25-0,65
w17	MD 6218,27	91,45	72,50	8,55	2,85	26,71	0,48	0,88	98,50	0,40	0,10	0,40	0,30	0,30
	ICR 3501,61-7708,75	90,48-93,75	69,10-75,40	6,25-9,53	1,95-3,15	25,17-27,79	0,46-0,50	0,85-0,89	97,70-98,83	0,30-0,68	0,00-0,23	0,18-0,60	0,23-0,80	0,15-0,68
w18	MD 5666,21	90,00	71,85	10,00	3,50	26,68	0,49	0,88	97,85	0,55	0,15	0,30	0,50	0,40
	ICR 4938,70-6842,80	87,43-92,20	59,33-78,18	7,80-12,58	2,63-3,78	25,41-28,36	0,44-0,57	0,84-0,92	97,70-98,48	0,38-0,95	0,05-0,20	0,20-0,38	0,10-0,55	0,10-1,00
w19	MD 5427,43	89,60	74,25	10,40	2,40	27,06	0,50	0,89	97,90	0,85	0,05	0,30	0,40	0,55
	ICR 4039,84-7360,13	88,50-93,78	69,73-79,18	6,23-11,50	2,25-3,08	25,33-30,57	0,47-0,62	0,86-0,92	97,28-98,60	0,40-1,33	0,00-0,25	0,20-0,38	0,25-0,65	0,18-0,68
w20	MD 4084,76	90,30	76,05	9,70	3,25	27,62	0,55	0,90	98,10	0,45	0,00	0,30	0,70	0,40
	ICR 3461,34-6150,57	88,55-93,10	70,05-78,55	6,90-11,45	2,58-3,80	26,45-31,25	0,50-0,61	0,89-0,94	97,28-98,90	0,28-0,78	0,00-0,23	0,15-0,53	0,18-0,88	0,23-0,73
w21	MD 6547,22	91,98	75,68	8,03	2,85	27,37	0,55	0,90	97,65	0,75	0,25	0,50	0,38	0,48
	ICR 3572,66-7057,14	86,38-93,16	66,88-78,15	6,84-13,63	2,56-3,36	25,30-31,27	0,46-0,65	0,86-0,95	96,46-98,76	0,41-1,11	0,01-0,51	0,19-0,68	0,20-0,40	0,30-0,69
w22	MD 5354,96	91,78	78,33	8,23	3,15	27,66	0,55	0,91	98,13	0,53	0,00	0,35	0,38	0,58
	ICR 3811,87-7020,11	89,99-94,56	72,58-79,56	5,44-10,01	2,41-4,48	26,49-31,10	0,48-0,64	0,87-0,94	97,50-98,64	0,34-0,75	0,00-0,11	0,20-0,59	0,24-0,83	0,31-0,73
w23	MD 7756,20	92,68	74,55	7,33	3,35	27,20	0,53	0,90	98,43	0,53	0,10	0,20	0,23	0,50
	ICR 5131,26-9305,41	91,05-94,39	72,19-77,49	5,61-8,95	3,13-4,06	25,48-29,17	0,48-0,68	0,88-0,95	97,64-98,81	0,40-0,93	0,01-0,14	0,00-0,38	0,20-0,56	0,33-0,68
w24	MD 7158,98	93,50	74,78	6,50	3,15	27,25	0,56	0,91	97,88	0,53	0,13	0,38	0,43	0,55
	ICR 4554,20-9097,93	87,96-94,40	72,40-81,43	5,60-12,04	2,45-3,38	25,89-29,42	0,48-0,60	0,87-0,92	97,11-98,33	0,33-1,36	0,00-0,34	0,20-0,44	0,26-0,75	0,34-0,85

Abk.: DMR: distaler-Mittelstückreflex; DZT: distaler Zytoplasmatropfen; ICR: *interquartile range* (dt.: Interquartilsabstand); IM: intakte Morphologie; GS: geknickter Schwanz; MD: Medianwert; PZT: proximaler Zytoplasmatropfen; SF: Schleifenform; w: Untersuchungswoche

X. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe, danken. Es freut mich sehr, mit ihm einen akademischen Lehrer gefunden zu haben, der mit Neugierde die Bereitschaft gezeigt hat, sich einem Thema aus der Komplementärmedizin zu widmen und mir im konstruktiven Austausch wesentliche Impulse für diese Arbeit gegeben hat.

Meinem Mentor, Herrn Prof. Dr. Dominik Irnich, danke ich für die langjährige persönliche Förderung – bereits weit vor Beginn des Promotionsvorhabens im Rahmen der Akupunkturausbildung der DÄGfA. Er hat das interdisziplinäre Forschungsprojekt von der ersten Idee bis zum Abschluss begleitet und mit seiner wissenschaftlichen Expertise einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet. Mit seinem ganz einzigartigen Humor hat er mir auch über schwierige Momente hinweggeholfen.

Frau Dr. Petra Bäumler, die mir als Betreuerin in der Interdisziplinären Schmerzambulanz zur Seite stand, bin ich zu außerordentlich großem Dank verpflichtet. Sie hat mir weit mehr als nur die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens vermittelt. Ihre zweifelsohne vorhandene Liebe zur Präzision hat mich häufig gefordert, aber letztlich erheblich gefördert. Ich habe es sehr geschätzt, ihre Kompetenzen während der gesamten Studie in Anspruch nehmen zu dürfen, was insbesondere in der Auswertungsphase von unschätzbarem Wert war.

Ebenso gilt mein Dank meiner Betreuerin an der tierärztlichen Fakultät, Frau Dr. Christiane Otdorff. Ihre inhaltliche Unterstützung bei andrologischen Fragestellungen hat mir sehr weitergeholfen. Ich konnte mir stets einer kritischen und außerordentlich raschen Korrektur sicher sein, was dem Fortgang der Arbeit sehr zuträglich war.

Den Anstoß für diese Studie lieferte Frau Dr. Anne-Rose Fischer, die als leitende Tierärztin der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“ durch ihre langjährige Erfahrung auf dem Gebiet der Veterinärakupunktur eine große Bereicherung darstellte. Ohne ihre hohe Flexibilität, ihr uneigennütziges Entgegenkommen und ihre stete Hilfsbereitschaft wäre das Forschungsprojekt so nicht durchführbar gewesen. Sie hat mich an ihrem großen Sachverstand auf Augenhöhe partizipieren lassen und ist mir in der Studienzeit freundschaftlich ans Herz gewachsen.

Außerdem danke ich dem gesamten Team der „Rinderunion Baden-Württemberg e. V.“, durch welches ich bestmögliche Bedingungen zur Durchführung der Studie vorfinden

durfte; zuvorderst Herrn Dr. Alfred Weidele, der als Geschäftsführer das Forschungsvorhaben in seinem Betrieb genehmigte. Namentlich möchte ich auch den Stationstierarzt Herrn Roland Halblaub sowie die Labormitarbeiterin Frau Gabriele Walser hervorheben. Für den reibungslosen Ablauf vor Ort stand mir stets das gesamte Tierpfleger-Team zur Seite. Insbesondere danke ich Herrn Wolfgang Stöckler für seinen überobligatorischen Einsatz.

Dem „Förderverein Bioökonomieforschung e. V.“ sowie der „Dres. Jutta und Georg Bruns-Stiftung“ und dem Unternehmen „IMV Technologies“ danke ich für die großzügige finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglichte, mich intensiv auf die Studie fokussieren zu können.

Die vorliegende Forschungsarbeit konnte nur durch freundschaftlichen und familiären Rückhalt wachsen, der mich immer wieder Kraft hat tanken lassen und für die nötige Ablenkung gesorgt hat.

Zunächst möchte ich daher meinen Mitstreitern, den Doktorandinnen und Doktoranden der Interdisziplinären Schmerzambulanz, danken, die mich immer wieder motiviert und aufgemuntert haben. Unsere gemeinsame Zeit hat mit dem Abschluss dieser Arbeit hoffentlich nicht sein Ende gefunden.

Frau Dr. Alex Bläske hat insbesondere in der letzten Korrekturschleife sehr viel Zeit und Mühe investiert, wofür ich ihr sehr dankbar bin. Ihre kritischen Anmerkungen waren für diese Arbeit von großem Nutzen.

Mit Frau Kim Gießler verbindet mich eine enge Freundschaft. Wir haben gemeinsam die Höhen und Tiefen des Studiums durchlebt und durchlitten. Als innige Vertraute durfte und darf ich mich stets uneingeschränkt auf ihre klugen und empathischen Ratschläge verlassen. Ihr steter Rückhalt soll in meiner Doktorarbeit als Ausdruck meiner Verbundenheit nicht unerwähnt bleiben.

Zuletzt möchte ich meiner Familie von ganzem Herzen danken: Meinem Lebensgefährten Herrn Dr. Florian Ruhs für seine allzeit liebevolle, selbstverständliche Unterstützung, seinen seelischen Beistand und sein unermüdliches Korrekturlesen; meiner Tochter Marlene, die mir täglich ein Lachen ins Gesicht gezaubert und mir so den nötigen Antrieb für die Finalisierung dieser Arbeit gegeben hat; und schließlich meiner Mutter, der ich diese Arbeit widmen möchte. Ich danke ihr von Herzen für ihre bedingungslose Unterstützung in allen Lebensphasen, ihre tröstenden Worte und ihr tiefes Vertrauen in mich.