

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. H. Zerbe
angefertigt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Braun

**Untersuchungen zur Kryokonservierung von Schaf spermien unter besonderer
Berücksichtigung des Einflusses der Verdünner, Verdünnungsprotokolle und
Einfriermethoden auf die Spermienqualitätsparameter**

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

vorgelegt von
Stella Angela Pogorzelski
aus Wegberg

München 2005

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

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E.P. Märtlbauer
Referent:	Univ.-Prof. Dr. J. Braun
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. W. Breuer

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

Alles Gescheite ist schon gedacht worden, man muss nur versuchen,
es noch einmal zu denken. (J. W. v. Goethe)

Für meinen Opi

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	2
2.1	Künstliche Besamung beim Schaf mit kryokonservierten Spermien	2
2.2	Kryokonservierung	4
2.2.1	Kryobiologische Aspekte der Spermakonservierung	4
2.2.2	Kryoprotektiva	6
2.2.3	Aufgaben und Zusammensetzung von Spermaverdünnern	9
2.2.4	Kühlung und Gefrierdaten	14
2.2.5	Auftauen	17
2.3	Durchflusszytometrische Bestimmung von Spermienqualitätsparametern	18
2.3.1	FITC-PNA/PI-Färbung zur Bestimmung der Plasmamembranintegrität und des akrosomalen Status	19
2.3.2	JC1/PI-Färbung zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP)	20
2.3.3	Akridinorange-Färbung (AO) zur Analyse der Spermienchromatinstruktur (SCSA™)	21
3	MATERIAL UND METHODEN	22
3.1	Versuchstiere	22
3.2	Samengewinnung	22
3.3	Samenuntersuchung	22

3.3.1.1	<i>Makroskopische Untersuchung</i>	23
3.3.1.2	Volumen	23
3.3.1.3	Konsistenz	23
3.3.1.4	Farbe	24
3.3.2	<i>Mikroskopische Untersuchung</i>	24
3.3.2.1	Dichtebestimmung	24
3.3.2.2	Massenbewegung	24
3.3.2.3	Einzelbewegung	24
3.3.2.4	Lebend-Tot-Färbung	25
3.3.2.5	Morphologie	25
3.4	Kryokonservierung	26
3.4.1	Verdünner	26
3.4.2	Glyzerinkonzentration	26
3.4.3	Einfriermethoden	27
3.4.4	Auftaumethode	27
3.4.5	Versuchsaufbau	28
3.5	Lichtmikroskopische Untersuchung der aufgetauten Proben	29
3.5.1	Motilität	29
3.5.2	Lebend-Tot-Färbung	29
3.5.3	Morphologie	29
3.6	Durchflusszytometrische Untersuchung der aufgetauten Proben	30
3.6.1	Geräte und Einstellungen	30
3.6.2	FITC-PNA/PI-Färbung zur Bestimmung der Plasmamembranintegrität und des akrosomalen Status	31
3.6.3	JC-1/PI-Färbung zur Bestimmung des Mitochondrienmembran- potentials (MMP)	32

3.6.4	Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA™)	32
3.7	Statistische Auswertung	33
4	ERGEBNISSE	34
4.1	Ergebnisse der Spermauntersuchung im Frischsamen	34
4.2	Effekte der Verdüner in den TG-Samenproben	35
4.2.1	Einfluss der Verdüner auf die Motilität nach dem Auftauen	35
4.2.2	Einfluss der Verdüner auf das Mitochondrienmembranpotential (MMP) nach dem Auftauen	35
4.2.3	Einfluss der Verdüner auf die Vitalität nach dem Auftauen	36
4.2.4	Einfluss der Verdüner auf die Plasmamembranintegrität nach dem Auftauen	36
4.2.5	Einfluss der Verdüner auf den akrosomalen Status nach dem Auftauen	37
4.2.6	Einfluss der Verdüner auf die Morphologie nach dem Auftauen	37
4.2	Effekte des Verdünnungsprotokolls in den TG-Samenproben	39
4.2.1	Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf die Motilität nach dem Auftauen	39
4.2.2	Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf das Mitochondrienmembranpotential (MMP) nach dem Auftauen	40
4.2.3	Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf die Vitalität nach dem Auftauen	40
4.2.4	Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf die Plasmamembranintegrität nach dem Auftauen	41
4.2.5	Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf den akrosomalen Status nach dem Auftauen	41
4.2.6	Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf die Morphologie nach dem Auftauen	42

4.3	Effekte der Einfriermethode in den TG-Samenproben	44
4.3.1	Einfluss der Einfriermethode auf die Motilität nach dem Auftauen	44
4.3.2	Einfluss der Einfriermethode auf das Mitochondrienmembranpotential (MMP) nach dem Auftauen	45
4.3.3	Einfluss der Einfriermethode auf die Vitalität nach dem Auftauen	45
4.3.4	Einfluss der Einfriermethode auf die Plasmamembranintegrität nach dem Auftauen	46
4.3.5	Einfluss der Einfriermethode auf den akrosomalen Status nach dem Auftauen	46
4.3.6	Einfluss der Einfriermethode auf die Morphologie nach dem Auftauen	47
4.4	Kombinationen der Versuchsvariablen Verdünner, Verdünnungsprotokoll und Einfriermethode in den TG-Samenproben	49
4.4.1	Einfluss der Versuchsvariablen auf die Motilität nach dem Auftauen	49
4.4.2	Einfluss der Versuchsvariablen auf das Mitochondrienmembranpotential (MMP) nach dem Auftauen	51
4.4.3	Einfluss der Versuchsvariablen auf die Vitalität nach dem Auftauen	52
4.4.4	Einfluss der Versuchsvariablen auf die Plasmamembranintegrität nach dem Auftauen	53
4.4.5	Einfluss der Versuchsvariablen auf den akrosomalen Status nach dem Auftauen	54
4.4.6	Einfluss der Versuchsvariablen auf die Morphologie nach dem Auftauen	55
5	DISKUSSION	58
5.1	Effekte der Verdünner	59
5.2	Effekte des Verdünnungsprotokolls	62
5.3	Effekte der Einfriermethode	63

5.4	Interaktionen von Verdünner, Verdünnungsprotokoll und Einfriermethode	65
6	ZUSAMMENFASSUNG	70
7	SUMMARY	72
8	LITERATURVERZEICHNIS	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	et alii
Fa.	Firma
LDL	Low Density Lipoprotein
LN ₂ /N ₂	Flüssigstickstoff
µl	Mikroliter
Mrd.	Milliarden
ml	Milliliter
mM	Millimol
mV	Millivolt
min	Minute
MMP	Mitochondrienmembranpotential
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
®	registriertes Warenzeichen
SCSA TM	Spermienchromatinstrukturanalyse
Sek.	Sekunden
Tab.	Tabelle
TM	Trademark
vs.	Versus

Verzeichnis der Abkürzungen der verwendeten Farbstoffe und Medien

AO	Akridin-Orange
Aqua dest.	Aqua destillata
DMSO	Dimethylsulfoxyd
FITC	Fluorescence-Isothiocyanat
JC-1	5,5`6,6`-tetrachloro-1,1`3,3`-tetraethylbenzimidazolylcarbo- Cyaniniodid
PI	Propidium Iodide
PNA	Peanut Agglutinin

Verzeichnis mathematischer und statistischer Zeichen

>	größer
≥	größer oder gleich
<	kleiner
≤	kleiner oder gleich
±	plus/minus
%	Prozent
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
s	Standardabweichung
x	Mittelwert

1 EINLEITUNG

Die Kryokonservierung von Schafbockspermien gewinnt immer mehr an Bedeutung, da der Export von Schafböcken aufgrund seuchenhygienischer Bedingungen der importierenden Länder zunehmend schwieriger und unwirtschaftlicher wird. Die Entwicklung eines praxisreifen und zuverlässigen Konservierungs- und Besamungsverfahrens könnte die routinemäßige Ein- und Ausfuhr von Tiefgefriersperma zur Verbesserung der hygienischen Verhältnisse bei der Schafzucht ermöglichen.

Für eine erfolgreiche Befruchtung der Eizelle müssen die Spermien über eine gute Motilität, eine funktionstüchtige Plasmamembran und ein intaktes Akrosom verfügen. Aus zahlreichen vergleichenden Untersuchungen geht hervor, dass die Plasmamembran, das Akrosom und die Mitochondrien von Schafpermien aufgrund ihrer spezifischen Membranbeschaffenheiten empfindlicher auf den Tiefgefrierprozess reagieren als die von Bullenspermien. Demzufolge sind auch die Trächtigkeitsraten der Schafe nach künstlicher Besamung mit Tiefgefriersperma im internationalen Maßstab geringer als die der Rinder. Aus Gründen der Wirtschaftlichkeit wird die Spermienqualität nach der Kryokonservierung üblicherweise lichtmikroskopisch untersucht. Die Aussagekraft dieser Untersuchungsmethode ist jedoch eingeschränkt, da auf diese Weise nur sehr kleine Zellpopulationen beurteilt werden können. Eine neuere Methode, von der man sich wesentliche Fortschritte verspricht, ist die durchflusszytometrische Analyse verschiedener Strukturen der Samenzelle mit Hilfe unterschiedlicher Fluoreszenzfärbungen. Damit können Tausende Spermien innerhalb weniger Sekunden objektiv und mit hoher Genauigkeit analysiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Verdünner, Verdünnungsprotokolle und Einfriermethoden vergleichend auf ihre Eignung für Schafpermien zu überprüfen. Dazu wurden nach dem Auftauen lichtmikroskopisch die Vitalität, Motilität und Morphologie bestimmt. Mittels Durchflusszytometrie wurden das Mitochondrienmembranpotential, die Plasmamembranintegrität und der akrosomale Status der Spermien beurteilt.

2 LITERATUR

2.1 Künstliche Besamung beim Schaf mit kryokonservierten Spermien

Tiefgefriersperma zeigt eine generell reduzierte Befruchtungsfähigkeit im Vergleich zu Frischsperma (WATSON, 2000). Der Autor fasst die verschiedenen Stressmomente des Tiefgefrierprozesses für die Samenzellen wie folgt zusammen: Temperaturveränderungen, osmotischer und toxischer Stress durch die Gefrierschutzsubstanzen, Entstehung und Auflösung von Eiskristallen im extrazellulären Raum (siehe 2.2 Kryobiologie). Trotz Anwendung optimierter Konservierungsprotokolle wird die Spermienpopulation durch diese Effekte um 40-50% dezimiert.

Nach MEDEIROS et al. (2002) ist die Fertilität von Spermien generell von ihrer Fähigkeit abhängig, zur Eizelle zu gelangen, mit dieser zu interagieren und sie zu penetrieren. Dazu benötigen sie ihre volle Funktionsfähigkeit und Motilität. Im Zusammenhang mit der künstlichen Besamung müssen die Spermien vom Ort ihrer Deponierung bis zur Eileiterampulle gelangen können und fähig sein, mit den Epithelzellen und den Sekreten des weiblichen Reproduktionstrakts zu interagieren. SALOMON und MAXWELL (1995a) sehen den eingeschränkten Transport des Tiefgefrierspermas im weiblichen Genitaltrakt und die reduzierte Lebensfähigkeit der Samenzellen als Hauptursache für die niedrige Fertilität beim Schaf an. Ihren Angaben zufolge können Spermien, die nach der Kryokonservierung ihre Motilität und biologische Funktionsfähigkeit beibehalten haben, eine Fertilitätsrate von 86-93% erzielen.

Zahlreiche Studien wurden unternommen, um die Fertilität nach künstlicher zervikaler Besamung mit Tiefgefriersperma zu verbessern. Versuche, den Verlust durch den Konservierungsprozess mit einer erhöhten Spermienkonzentration auszugleichen, führten nicht zum erwarteten Erfolg. Nach Erkenntnissen von GIL et al. (1999) stellt eine Zentrifugation aufgetauter Samenproben im Sinne einer Konzentrationserhöhung einen zusätzlichen Stressfaktor dar und wirkt sich nachteilig auf die Spermienqualität aus. Auch eine Erhöhung der Spermienanzahl durch

niedrige Verdünnungsraten vor dem Einfrieren erbrachte nur schlechte Befruchtungsergebnisse (RITAR und BALL, 1992).

Eine andere Methode zur Verbesserung der Fertilität ist die Doppelbesamung. In einigen umfassenden Studien von SALOMON und LIGHTFOOD (1970) und SALOMON (1971) wurden durch die zweite Besamung signifikant bessere Ablammergebnisse erzielt. Die wichtigste Rolle spielen dabei die Spermienkonzentration in der Besamungsdosis und der Zeitpunkt der Insemination während des Östrus. Geringe Vorteile erbrachte eine zweite Besamung, wenn die erste in der Mitte des Östrus durchgeführt wurde (SALOMON, 1972). VISSER und SALOMON (1974) führten die verbesserten Ablammraten nach einer Doppelbesamung darauf zurück, dass durch die zweite Besamung insgesamt doppelt so viele Spermien deponiert wurden wie durch eine einfache. In einer späteren Arbeit erzielte SALOMON (1977) ähnliche Ablammergebnisse, wenn die Anzahl motiler Spermien bei der einfachen wie auch bei der Doppelbesamung gleich groß war und die Besamung 12-25 Stunden nach Erkennung des Östrus vorgenommen wurde. Bei der Doppelbesamung erwies sich ein Intervall von 8-10 Stunden als vorteilhaft (KASYMOV, 1984).

Die effektivste Methode zur Steigerung der Fertilität nach zervikaler Insemination ist eine tiefe Deponierung des Tiefgefrierspermas im Zervikalkanal (SALOMON und MAXWELL, 1995b). Um die anatomischen Barrieren der Zervix der Mutterschafe zu überwinden, wurden verschiedene Techniken entwickelt. ANDERSEN et al. (1973) gelang durch instrumentellen oder manuellen Zug an der Zervix eine Platzierung des Spermas bis zu einer Tiefe von 2-5 cm bzw. sogar bis in den Uterus hinein. Diese Verfahren führten zwar zu einer Verbesserung der Fertilität, bedeuteten für die Tiere jedoch großen Stress. Erleichtert werden kann eine tiefe zervikale Insemination durch spezielle Besamungspipetten wie sie bei SALOMON und MAXWELL (1995b) beschrieben sind.

Tiefe zervikale Besamung erlaubt eine Reduktion der Besamungsdosis auf 20-40 Millionen motiler Spermien, die nach einfacher Besamung eine Ablammrate von 50-53% erzielen. Eine Kontrollbesamung mit 80-100 Millionen Spermien erbrachten eine Ablammrate von 51% (STOJANOV, 1980).

Die besten Ablammergebnisse werden nach intrauteriner Besamung erzielt. Diese kann transzervikal oder laparoskopisch erfolgen. Aufgrund der schwierigen anatomischen Verhältnisse der Schafzervix bedarf die transzervikale Methode weiterer Perfektion, um konstantere Besamungserfolge zu gewährleisten (SALOMON und MAXWELL, 1995b). Nach einer Studie von WINDSOR (1992) erbrachte die laparoskopische Besamung eine Trächtigkeitsrate am 70. Tag von 45%. Transzervikal und zervikal besamte Schafe waren am gleichen Tag zu 32% bzw. 9% trüchtig. Die laparoskopische Insemination liefert nicht nur zufriedenstellende Ablammerfolge, sondern bietet auch die Möglichkeit, eine geringere Anzahl motiler Spermien pro Dosis zu deponieren (SALOMON und MAXWELL, 1995b). Diese Methode wird überwiegend bei synchronisiertem Östrus durchgeführt. Diesbezüglich wurden Methoden und Zeitpunkt der Synchronisation, sowie der Zeitpunkt der Besamung, die Inseminationsdosis und die intrauterine Lage der Samendeponierung erforscht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Studien liefert eine Übersicht von SALOMON und MAXWELL (2000).

Ursprünglich wurde mithilfe der Insemination nach Laparotomie die Befruchtungskapazität von kryokonservierten Spermien getestet. Heutzutage wird die laparoskopische Insemination nach Östrussynchronisation routinemäßig in den meisten Schaf-produzierenden Ländern angewendet (EVANS, 1991; HARESIGN, 1992). Aufgrund der hohen Kosten für die laparoskopische Besamung und die Östrussynchronisation der Mutterschafe, ist diese Methode jedoch besonders für kleine Schafherden unrentabel (MAXWELL und WATSON, 1996). Auch die vergleichsweise schlechten Fertilitätsraten nach zervikaler Besamung legen für Länder mit geringer Schafwirtschaft eine natürliche Reproduktion nahe.

2.2 Kryokonservierung

2.2.1 Kryobiologische Aspekte der Spermakonservierung

Spermien sind hochspezialisierte Zellen, die auf rasche und starke physikalisch-chemische Veränderungen des sie umgebenden Milieus schockartig reagieren (QUINN und WHITE, 1969). Insbesondere die Zellmembranen sind beim Gefrier-

Auftau-Prozess verschiedenen Stressmomenten ausgesetzt (PARKS und GRAHAM, 1992). Bei der Entstehung von Gefrierschäden an Spermienzellmembranen kommt den Veränderungen des intrazellulären Wassers eine zentrale Bedeutung zu (MAZUR 1985): In einem Temperaturbereich zwischen -5° und -15°C erfolgt eine Entstehung von Eiskristallen im extrazellulären Raum. Das Zellinnere bleibt aufgrund der Schutzwirkung der Plasmamembran ungefroren und unterkühlt. Dadurch verändert sich das osmotische Potential der Zelle, so dass Wasser ausströmt und extrazellulär gefriert. Vollzieht sich dieser Prozess zu schnell durch eine zu hohe Kühlrate kann die Exosmose nur unvollständig stattfinden, und es kommt zu einer intrazellulären Eiskristallbildung (HOLT et al., 1992). Das osmotische Potential zwischen intra- und extrazellulärem Raum gerät aus dem Gleichgewicht, so dass Ionen ins Zellinnere einströmen (MERYMAN, 1968).

Der Auftauprozess kehrt alle eingetretenen Effekte des Einfrierens um. Durch die hohe intrazelluläre Ionenkonzentration erfolgt ein starker Rückstrom von Wasser ins Zellinnere, infolge dessen es zu Zellschwellung und Zerstörung der Zellmembran kommen kann (HOLT, 2000).

Ein weiteres Phänomen kryobiologischer Veränderungen an Spermienzellen ist die sogenannte Kryokapazitation, deren Entstehung noch nicht vollständig geklärt ist (BAILEY et al., 2000). Die physiologische Kapazitation ist mit komplexen strukturellen Veränderungen der Plasmamembran des Spermienkopfes assoziiert (LANGLAIS und ROBERTS, 1985; LIN und KAN, 1996). Bei der Kryokapazitation werden solche Veränderungen nach Meinung von WATSON (1995) durch den Gefrierprozess ausgelöst. Diese Modifikationen können zu einer erhöhten Reaktionsbereitschaft der Spermien führen. Auch PEREZ et al. (1996) haben gezeigt, dass kryokonservierte Spermien die Kapazitation schneller durchlaufen als frische Spermien.

MAXWELL und JOHNSON (1997) meinen, dass kryokapazitierte Spermien eine Membran-Destabilisierung und einen Calcium-Influx ins Zellinnere reflektieren.

Nach DE LAMARINDE et al. (1998) und LECLERC et al. (1997) spielt bei der Kryokapazitation auch das Auftreten von Superoxid-Anionen während der Kryokonservierung eine Rolle.

2.2.2 Kryoprotektiva

Kryoprotektiva werden eingesetzt, um Schäden, die während des Tiefgefrierprozesses an biologischem Material entstehen können, zu verringern bzw. zu verhindern (SHERMAN, 1964, ROWE, 1966;). Nach den Erkenntnissen von FAHY (1986) ist es jedoch nicht möglich, ein hundertprozentiges Überleben tiefgefrorener Zellen zu erreichen. Dabei ist zu beachten, dass die Kryoprotektiva neben ihrer schützenden Funktion an konserviertem zellulären Material ähnliche Schäden hervorrufen können wie der Tiefgefriervorgang selbst. Dieser schädigende Effekt ist zum einen abhängig von ihrer Konzentration. Aber auch zelluläre Eigenschaften wie die Permeabilität der Plasmamembran und deren Widerstandsfähigkeit gegenüber physikalischem Stress limitieren den positiven Einfluss der Kryoprotektiva (MEDEIROS et al., 2002). Nach Erkenntnissen von HAMMERSTEDT et al. (1978) sind die Effekte der Kryoprotektiva aufgrund unterschiedlicher Zellbeschaffenheiten der Spermien speziesspezifisch.

Allgemein können Kryoprotektiva in zwei große Gruppen eingeteilt werden (ROWE, 1966; MERYMAN et al., 1977, MC GANN, 1978; WATSON, 1979). Zu der einen Gruppe zählen Substanzen, die ihre Wirkung extrazellulär ausüben: Polyvinylpyrrolidon, Polyglykol, Dextran, Laktose oder Sucrose (MERYMAN et al., 1977). Für ihre Verwendung - hauptsächlich für die Kryokonservierung kernloser Zellen – ist eine rasche Abkühlrate erforderlich (ROWE, 1966). Zu der anderen Gruppe gehören Kryoprotektiva, die die Fähigkeit besitzen, in die zu konservierenden Zellen einzudringen. Hierzu gehören z. B. Glyzerin und DMSO (LOVELOCK und POLGE, 1954; SHERMAN, 1964). Diese Substanzen werden eher zur Konservierung kernhaltiger Zellen unter Anwendung einer langsamen Kühlrate eingesetzt (ROWE, 1966).

Die Wirkungsweise der Gefrierschutzsubstanzen ist allerdings nicht vollständig geklärt (WATSON, 1995). Laut GAO et al. (1997) verursachen extrazellulär wirkende Kryoprotektiva eine osmotische Stimulation der Zelldehydratation, so dass weniger Wasser in der Zelle verbleibt und so die Gefahr der intrazellulären Eiskristallbildung reduziert wird.

Der protektive Effekt intrazellulär wirkender Substanzen liegt nach MAZUR (1970) in einer konsequenten Senkung der Salzkonzentrationen. Dadurch kann die Dehydratation der Zelle verringert werden, indem mehr ungefrorenes Wasser zum Erhalt des Zellvolumens in der Zelle verbleibt. (MAZUR and RIGOPOULOS, 1983; MAZUR und COLE, 1985; MEDEIROS et al., 2002) Diese Kryoprotektiva stören das osmotische Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Raum nicht und sollten laut MERYMAN (1971) daher bevorzugt eingesetzt werden.

Glyzerin wird als das Kryoprotektivum der Wahl angesehen (SHERMAN, 1964; SCHRAMM und LÖHLE, 1976; WILMUT und POLGE, 1977; JEYENDRAN und GRAHAM, 1980; NEUBERT und MENGER, 1981; MAXWELL et al., 1996; HOLT, 2000; WATSON, 2000; MEDEIROS et al., 2002). Es hat verschiedenen Studien zufolge eine sowohl intra- wie auch extrazelluläre Wirkungsweise. Dabei soll der extrazelluläre osmotische Einfluss der wichtigste positive Effekt sein (AMANN und PICKETT, 1987; MEDEIROS et al., 2002). Forschungen haben ergeben, dass Glyzerin in der Lage ist, sich von außen direkt an Bestandteile der Zellmembran zu binden und damit ihre Struktur und Festigkeit zu verändern (HAMMERSTEDT und GRAHAM, 1992).

Innerhalb der Zelle reduziert Glyzerin den osmotischen Stress, indem es durch Interaktionen mit Ionen und Makromolekülen für den Rückhalt von Zellwasser sorgt und den Gefrierpunkt des Wassers herabsetzt (MEDEIROS et al., 2002). Eine Übersicht über Gefrierschädigungen und Gefrierschutz unter besonderer Berücksichtigung der Schutzeffekte des Glyzerins gibt WEITZE (1977). Die Menge an Glyzerin, die in den Verdünnermedien zur Kryokonservierung von Spermien (siehe 2.4.3) enthalten sein soll, wird letztlich durch seine Toxizität limitiert. Diese ist ihrerseits anhängig von der Gefriereschwindigkeit, der Zusammensetzung des jeweiligen Verdünners, sowie von der Methode des Zusatzes des Kryoprotektivums (FAHY, 1986).

Verschiedene Arbeiten über unterschiedliche Glyzerinkonzentrationen und Gefrierarten bei der Kryokonservierung von Schafspermien haben ergeben, dass die optimale Glyzerinkonzentration umso niedriger ist, je höher die Gefriereschwindigkeit ist (VISSER und SALOMON, 1974; FISER und FAIRFULL, 1984). FISER und FAIRFULL (1984) beobachteten bei einem Glyzeringehalt von 4-

6% und einer Gefriertrate von 10-100°C/min die größte Anzahl überlebender Spermien nach dem Auftauen. Auch COLAS hat durch seine Studien bereits 1975 eine Glycerinkonzentration von 4% im Verdünnermedium als optimal erachtet. Andere Autoren gaben eine Konzentration von 6-8% Glycerin als Optimum an (FIRST et al., 1961). Nach WATSON und MARTIN (1975) hingegen sind die Überlebensraten von Spermien bei Glycerinkonzentrationen von 2,5% und 7,5% vergleichbar.

Neben der Gefriergeschwindigkeit beeinflusst die Zusammensetzung des Verdünners den Optimalbereich der Glycerinkonzentration. WATSON und MARTIN haben 1974 vermutet, dass die Menge des im Verdünner enthaltenen Eigelbs die Konzentration des Glycerins beeinflussen kann. Demnach sei die Menge an Glycerin umgekehrt proportional zur Menge des Eigelbs. Nach ABDELHAKEM (1991b) kann bei einer Eigelb-Konzentration von 25-30% im Verdünner sogar auf die Verwendung von Glycerin verzichtet werden. Weiterhin wurde berichtet, dass die Verwendung von Antioxidantien mit kryokonservierendem Effekt in Verdünnermedien möglicherweise ebenfalls eine niedrige Glycerinkonzentration erlaubt (VARNAVSKIJ und VARNAVSKAJA, 1976; MILOVANOV et al., 1985).

In zahlreichen Studien wurde die Verdünnung der Spermien und damit der Zusatz des Glycerins durch verschiedene Verdünnungsprotokolle vorgenommen (z. B. BERNDTSON und FOOTE, 1972; FISER und FAIRFULL, 1986a; GIL et al., 2001; MORRIER et al., 2001; GIL et al., 2003a; ANEL et al., 2003). Entweder wurden die Spermienproben durch eine 1-Schritt-Verdünnung bei ca. 29°C mit einem glyzerinhaltigen Medium verdünnt oder es wurde zunächst ein glyzerinfreier Verdünner verwendet. Bei diesem Versuchsprotokoll wurde der Samenprobe das Kryoprotektivum in einem zweiten Verdünnungsschritt nach Abkühlung bei einer Temperatur von 5°C hinzugegeben (2-Schritt-Verdünnung). Einigen Erkenntnissen zufolge war die Zugabe des Glycerins nach 2-Schritt-Verdünnung bei 5°C verträglicher für die Spermien, so dass diese Methode oftmals bevorzugt angewendet wird (SALOMON und MAXWELL, 2000). Andere Studien hingegen ergaben eine Gleichwertigkeit beider Verdünnungsmethoden (SALOMON, 1968; LIGHTFOOD und SALOMON, 1969; MORRIER et al. 2001). Heute ist die 1-Schritt-Verdünnung mit glyzerinhaltigen Medien eine praktikable und weit verbreitete

Methode bei der Kryokonservierung von Schafspermien (SALOMON, 1976; EVANS und MAXWELL, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; BAILEY et al., 2000).

2.2.3 Aufgaben und Zusammensetzung von Spermaverdünnern

Für den Erhalt der physiologischen Eigenschaften und Funktionen der Spermien ist die chemisch-physikalische Zusammensetzung eines Spermaverdünners bedeutsam. Dabei kommt es nicht nur auf die Einzelkomponenten des jeweiligen Verdünners an, sondern auch auf deren Wechselwirkungen untereinander (OBANDO und LUCENA, 1984).

In der Literatur findet man eine nahezu unüberschaubare Anzahl verschiedenster Spermaverdüner, die meist aus unterschiedlichen Variationen einiger Standardrezepturen zusammengesetzt sind (WATSON, 1979). Die Arbeiten von NEVES (1980), TEKIN (1982) und MYTZKA (1988) bieten eine breite Übersicht über die für die Tiefgefrierkonservierung von Schafspermien verwendeten Verdüner. Eine Veröffentlichung von SALOMON und MAXWELL (2000) enthält eine Einteilung der Verdüner gemäss ihrer Hauptkomponenten in verschiedene Klassen.

Generell sollten die verwendeten Verdüner nach WATSON (1979) und SALOMON und MAXWELL (2000) einen angemessenen pH-Wert und eine ausreichende Pufferkapazität aufweisen, um pH-Verschiebungen durch aerobe und anaerobe Stoffwechselprodukte der Spermien ausgleichen zu können. Ebenso wichtig ist eine geeignete Osmolalität. Spermaverdüner sollten durch ihre Inhaltsstoffe genug Nahrung und Energie für die Spermien bereitstellen und eine ausreichende Schutzfunktion gegen alle schädigenden Einflüsse des Konservierungsprozesses erfüllen. Diese Aufgaben können zahlreichen Studien zufolge vor allem von verschiedenen Zuckern, Milch, Eigelb und unterschiedlichen Kryoprotektiva (siehe 2.2.2) übernommen werden (MYTZKA, 1988). Neuere Arbeiten erforschen die Verwendbarkeit von Sojabohnenextrakten als Alternative zu Eigelb (u.a. MÜLLER-SCHLÖSSER et al., 1995; GIL et al., 2000; THUN et al., 2001; GIL et al., 2003b). Da die Komponenten Zucker, Milch, Eidotter bzw. Soja in unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen Verwendung finden und damit die Basis der

vielen verschiedenen Verdünnern bilden, sollen sie im folgenden näher erläutert werden:

Zucker stellen einerseits rasch verfügbare Energie zur Anregung und Aufrechterhaltung des Stoffwechsels und der Spermienmotilität zur Verfügung (MARTIN, 1966) und fördern andererseits durch ihren osmotischen Effekt die Dehydratation der Spermienzellen, setzen die intrazelluläre Eiskristallbildung herab und vermindern somit das Risiko der Zellschädigung (MOLINIA et al., 1994). NAGASE und GRAHAM (1964) beobachteten, dass Zucker mit einem hohen Molekulargewicht einen besseren Schutz gewähren als solche mit einem niedrigen Molekulargewicht. Weiterhin werden den Trisacchariden bessere kryoprotektorische Eigenschaften zugesprochen als den Mono- und Disacchariden (MOLINIA et al., 1994).

Daten zur Verwendung von Milch als Bestandteil von Spermaverdünnern für die Tiefgefrierkonservierung von Spermien findet man in der Literatur bereits in den 50er Jahren. Allerdings wurde ihre Eignung von jeher kontrovers diskutiert. Während AEHNELT (1953) die Milch aufgrund ihrer geringen Haltbarkeit und ihrer Eignung als Nährboden für Mikroorganismen als Verdünnerezusatz ablehnte, wurde sie bei WEISS (1953) als eines der geeignetsten Spermienverdünnungsmedien überhaupt beurteilt.

Die Vorteile der Milch für die Qualität kryokonservierter Spermien liegen vor allem in ihrem hohen Gehalt an Nährstoffen und Milchzucker sowie an hochwertigem Milcheiweiß und an zahlreichen Vitaminen (PETERS, 1953a; PETERS 1953b). Die in der Milch enthaltenen Proteine schützen die Spermien vor Schädigungen durch den Gefrierprozess. Nach Erkenntnissen von CHOONG und WALES (1962 und 1963) bilden die Milchproteine eine schützende Kolloidhülle um die Spermienzellen und vermindern so die Permeabilitätssteigerung der Zellmembran. Zur Anwendung in Spermaverdünnern kommt neben Vollmilch von Kuh und Schaf (WEISS, 1953; PETERS, 1953a; PETERS, 1953b; JONES, 1969; ROYCHOUDHURY und DUBAY, 1977) insbesondere auch Magermilch (WEISS, 1953; PETERS, 1953b; BLACKSHAW, 1960; LAPWOOD et al., 1972). Letztere wird vorzugsweise in Form von Magermilchpulver verwendet (BLACKSHAW, 1960; FISER und FAIRFULL,

1986a). Der Einsatz von Milch als Verdünnerezusatz, auch in Kombination mit Eidotter, spielt heutzutage allerdings eine untergeordnete Rolle.

Eidotter ist inzwischen ein allgemein verbreiteter Bestandteil von Spermaverdünnern, seit PHILLIPS und LARDY (1940) zum ersten Mal von seinem schützenden Effekt für Spermien gegenüber schädigenden Einflüssen durch Kältebehandlung berichteten. Laut HOLT et al. (1988) verhindert Eigelb die Spiralisierung der Spermienflagellen und bewahrt so ihre Motilität. Als aktive Komponente des Eidotters wird ein sogenanntes „Low Density Lipoprotein“ (LDL) wie beispielsweise Lecithin angesehen, das seine Wirkung ausschließlich an der Zelloberfläche entfalten kann (WATSON, 1976; FOULKES, 1977). Diese Lipidkomponente interagiert mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran und sorgt für deren Stabilisierung (WATSON, 1975; HOLT et al., 1988). OKAMURA et al. (1991) begründen dies mit einer Modifizierung der Membranpermeabilität und der Aktivierung der Adenylatzyklase, einem Steuerungsenzym, das in der Membran weitere Enzyme und Membranproteine aktivieren kann. 1992 ergänzten HOLT et al. ihre Erkenntnisse durch weitere Studien, die ergaben, dass die schädigenden Effekte der hyperosmotischen Bedingungen, denen die Membran während des Gefrierprozesses (siehe 2.2.1) ausgesetzt ist, durch die Anwesenheit des Eidotters im Verdünnermedium minimiert werden. BLACKSHAW wies allerdings bereits 1954 auf speziesspezifische Unterschiede bezüglich der Effektivität der Wirkung des Eidotters auf kryokonservierte Spermien hin. So zeigten Schafbockspermien bei Verdünnung mit einem eidotterhaltigen Medium eine größere Empfindlichkeit gegenüber der Kältekonservierung als beispielsweise Bullenspermien.

Forschungen haben ergeben, dass eine Zugabe von Detergentien zum Verdünnermedium die Eidotterpartikel möglicherweise derart modifizieren kann, dass eine noch effizientere Interaktion mit der Plasmamembran möglich wird (PONTBRIAND et al., 1989). Studien von BWANGA (1991) haben eine solche Wirkung vor allem für Eberspermien nachgewiesen. Eine speziessübergreifende Eignung von Detergentien für die Verbesserung der Spermienqualität nach der Kryokonservierung konnte allerdings bisher nicht eindeutig bestätigt werden (HOLT, 2000).

Eine große Variationsbreite von Eidotterkonzentrationen in Verdünnern für die Tiefgefrierkonservierung von Schafbockspermien ist erforscht worden (u.a. WATSON und MARTIN, 1972; WATSON und MARTIN, 1975; OLLERO et al., 1998; SANCHEZ-PARTIDA et al., 1998; GIL et al., 2003a). In den frühen Arbeiten wurden Konzentrationen zwischen 30 und 50% getestet, während die meisten späteren Studien eher niedrigere Konzentrationen bevorzugten. Für die Konservierung von Schafpermien in Pailletten wurden Konzentrationen von 15-20% als Optimum angegeben, obwohl die Effekte von der Gesamtzusammensetzung des Verdünnermediums anhängig sind (SALOMON und LIGHTFOOD, 1969). Konzentrationen unter 10% wurden von GRAHAM et al. (1978) als unzureichend beschrieben. In kommerziell erhältlichen Verdünnermedien wie beispielsweise Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Germany) sind 20% Eidotter enthalten.

Die Zugabe von Komponenten tierischen Ursprungs wie Eigelb und Milch zu Konservierungsverdünnern für Spermien ist schwierig zu standardisieren, da die Ingredienzien je nach Charge oder Herkunft unterschiedlicher Zusammensetzung und Güte sein können (MÜLLER-SCHLÖSSER et al., 1995). Außerdem bergen sie ein potentielles Risiko der mikrobiellen Kontamination (BOUSSEAU et al., 1998). Bakterien oder Mykoplasmen bieten eine mögliche Quelle für die Bildung von Endotoxinen, welche die Samenqualität bis hin zur Befruchtungsunfähigkeit der Spermien beeinträchtigen können. Einige Länder befürchten sogar eine Einschleppung exotischer Erkrankungen durch den internationalen Handel mit eidotter- bzw. milchhaltigen Verdünnern (OLAR und PICKETT, 1980). Die aktuellen Forschungen haben sich daher dahingehend verlagert, einen Verdünner zu entwickeln, der frei von hygienischen Risiken ist.

Sojabohnen-Lecithin scheint einigen Studien zufolge ein dem Eidotter gleichwertiger Ersatz als Verdünnerzusatz für die Kryokonservierung von Spermien zu sein (u.a. GIL et al., 2000; AIRES et al., 2003; HEROLD et al., 2003; GIL et al., 2003b). Die Mechanismen der präventiven Wirksamkeit des Sojabohnen-Lecithins gegenüber pathologischen Prozessen beruhen hauptsächlich auf seiner Ähnlichkeit mit Phospholipiden biologischer Membranen, die eine direkte Interaktion mit der Lipiddoppelschicht erlaubt (IPATOVA et al., 2004).

Nach Erkenntnissen früherer In-vitro-Studien über den Einfluss des Verdünnerzusatzes Glycerin auf die Struktur der Membran-Doppelschicht des Lecithins vermutet man, dass der Gefrierschutzeffekt durch Interaktion des Kryoprotektivums mit den hydrophilen Enden der Lecithinmoleküle zusätzlich verstärkt wird (BUCKINGHAM und STAEHLIN, 1969). Obwohl die genauen Mechanismen dieser Interaktionen immer noch ungeklärt sind, kann Studien von BOUSSEAU et al. (1998) zufolge durch das Zusammenwirken von Glycerin mit Lecithin ein gleichwertiger Schutz der Spermien gegenüber Gefrierschäden erzielt werden wie durch milch- oder eidotterhaltige Verdünner. Solche Erfahrungen zeigen auch die Arbeiten von MÜLLER-SCHLÖSSER (1995), HINSCH et al. (1997) und GIL et al. (2000). Andere Autoren hingegen bewerten die kryoprotektiven Eigenschaften des Eidotters insgesamt als überlegen (HEROLD et al., 2003; THUN et al., 2003). Dabei wird allerdings zwischen der Effizienz bezüglich der verschiedenen Spermienqualitätsparameter unterschieden. So erzielte die Konservierung mit einem eidotterhaltigen Medium eine höhere Motilitätsrate, die Bewegungsgeschwindigkeit der einzelnen Spermien war jedoch bei den mit Sojalecithin verdünnten Samenproben größer.

Derzeit sind vor allem drei sojabohnenlecithinhaltige Konservierungsmedien für Bullensamen unter den Handelsnamen Biociphos-Plus[®] (IMV, L'Aigle, France), Bioexcell[®] (IMV, L'Aigle, France) und AndroMed[®] (Minitüb, Tiefenbach, Germany) kommerziell erhältlich. GIL et al. (2003b) erprobten erstmals in einer Arbeit Bioexcell[®] (IMV, L'Aigle, France) im Vergleich mit einem Milch-Eidotter-Verdünner bei der Kryokonservierung von Schafbockspermien. Dabei gelangten sie aufgrund ihrer Ergebnisse zu der Erkenntnis, dass der sojalecithinhaltige Verdünner als eine gute Alternative zu den konventionellen Milch-Eidotter-Medien bewertet werden kann. Ein eindeutiger Vorteil sojahaltiger Medien gegenüber den herkömmlichen ist der geringe präparative Aufwand, der lediglich die Zugabe von Wasser zum Konzentrat erfordert (MÜLLER-SCHLÖSSER et al., 1995).

2.2.4 Kühlung und Gefrierraten

Spermien von Schafböcken sind extrem empfindlich gegenüber starken Temperaturveränderungen während des Prozesses der Tiefgefrierkonservierung. Bei dieser Spezies liegt der kritische Temperaturbereich beim Einfrieren zwischen -10 und -25°C (SALOMON und MAXWELL, 1995a,b).

Berichten von WATSON und MARTIN (1975) zufolge, kann der Einfrierprozess dadurch optimiert werden, dass die Spermiesuspension in Minipailletten, sog. „Ministraws“ aus Kunststoff mit einem Volumen von $0,25$ bis $0,5$ ml konserviert wird. Auch neuere Arbeiten (u.a. WEITZE et al., 1987) bestätigten einen positiven Einfluss eines großen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses bezüglich der Spermiesuspension bei kritischen Temperaturen unter 0°C . Bei einem Probenvolumen beispielsweise von $0,5$ ml ist kein Punkt innerhalb des „Ministraws“ weiter als 1 mm von der Oberfläche entfernt. Setzt die Eiskristallbildung ein, breitet sie sich rasch vom Kernpunkt in alle Richtungen entlang der Paillette aus. Aufgrund der großen Oberfläche in Relation zum Volumen der Paillette kann die latente Schmelzwärme schnell abgeführt und eine annähernd lineare Gefrierrate erzielt werden (WATSON und MARTIN, 1975).

Nach Zugabe des Verdünners werden die Samenproben in Pailletten abgefüllt und im Kühlschrank auf eine Temperatur von $2-5^{\circ}\text{C}$ heruntergekühlt. Diese Kühlphase wird als Äquilibrierungsphase bezeichnet und bedeutet eine Adaption der Spermienzellen an einen reduzierten Metabolismus (SALOMON und MAXWELL, 2000). Während dieser Periode kann das Kryoprotektivum die Membranen der Spermienzellen penetrieren, um eine ausgeglichene intra- und extrazelluläre Konzentration zu erreichen (siehe 2.2.2). Es darf dabei nicht außer Acht gelassen werden, dass während der Äquilibrierung auch andere Bestandteile des Verdünnermediums mit osmotischem Potential ihre Wirkung entfalten (SALOMON und MAXWELL, 2000). Bei einer 2-Schritt-Verdünnung (siehe 2.2.2) erfolgt der Kontakt der Spermien mit Glycerin erst nach der Abkühlung bei einer Temperatur von $2-5^{\circ}\text{C}$, wohingegen er bei der oben erwähnten 1-Schritt-Verdünnung bereits bei ca. 30°C eintritt. Bei beiden Methoden müssen die verdünnten Spermienproben vor dem Einfrieren auf $2-5^{\circ}\text{C}$ heruntergekühlt werden. Die Dauer der Kühlung beträgt

meist 1 bis 3 Stunden (SALOMON und MAXWELL, 2000). Laut FISER und FAIRFULL (1986b) hat eine schnelle Kühlung von 30°C auf etwa 15°C keinen Effekt auf das Überleben der Spermien. Schnelles Kühlen von 30°C auf 10, 5 oder 0°C mindert jedoch die Motilität der Spermien nach dem Auftauen. Gegenwärtig wird routinemäßig die Methode der 1-Schritt-Verdünnung mit einem glyzerinhaltigen Medium angewendet. Hierfür wird eine Kühlung auf 5°C in 1,5 bis 2 Stunden vor dem Einfrieren empfohlen (SALOMON, 1976; EVANS und MAXWELL, 1987).

Bis zu einer Temperatur von ca. -5°C bleibt intra- und extrazelluläres Wasser ungefroren und befindet sich in einem unterkühlten Zustand (siehe 2.2.1). Zwischen -5 und -10°C beginnt die extrazelluläre Eiskristallbildung, während das Wasser innerhalb der Spermienzelle weiter ungefroren bleibt. Der entstehende osmotische Druck bedingt eine Dehydrierung der Zelle. An diesem Punkt muss die Gefrierate einerseits langsam genug sein, um die Dehydrierung der Zelle zu ermöglichen und damit die intrazelluläre Bildung von Eiskristallen zu unterbinden, andererseits aber schnell genug, um die Zelle den hyperosmotischen Einflüssen zu entziehen (HOLT et al., 1992; WATSON, 2000; MEDEIROS et al., 2002). Demnach ist eine Kühlrate angemessen, die das Gefrieren extrazellulären Wassers erlaubt, ohne dass sich innerhalb der Zelle Eis bilden kann.

Eine weitere Senkung der Temperatur bis zu einem kritischen Bereich von -15 bis -60°C birgt ein ansteigendes Risiko der intrazellulären Eiskristallbildung, die eine Zerstörung zellulärer Strukturen zur Folge hat (MAZUR, 1985; GAO et al, 1997). Eine frühere Studie von MAZUR belegte bereits 1965, dass vorwiegend in diesem Temperaturbereich Schäden an Spermienmembranen entstehen und nicht während der Lagerung in Flüssigstickstoff (LN₂) mit einer Temperatur von -196°C. Das direkte Eintauchen der Spermienproben in LN₂ ist allerdings ungeachtet der Anwendung von Kryoprotektiva für alle Spermienzellen tödlich (FISER und FAIRFULL, 1984).

Verschiedene Autoren sind zu unterschiedlichen Auffassungen bezüglich des optimalen Verlaufs der Gefrierkurve während des Konservierungsprozesses gelangt. SALOMON und MAXWELL (2000) halten eine parabelförmige Senkung der Temperatur für angemessen, die durch Einfrieren der Spermiesuspensionen in Pailletten 4-6 cm über der Oberfläche von flüssigem Stickstoff (LN₂) erreicht werden

kann. Hierbei fällt die Temperatur in nur 10 Sekunden von 5 auf -15°C . Aufgrund der latenten Schmelzwärme entsteht ein oszillierender Temperaturverlauf (ANEL et al., 2003). Demgegenüber stehen Erfahrungen von KUMAR et al. (2003), die eine konstante Kühlung durch kontrollierte lineare Gefrieraten mit Hilfe von Einfriercomputern bevorzugen. Bei dieser Methode ist die Temperaturkurve aufgrund der gemäßigeren Absenkung der Temperatur von 5 auf -15°C in 34 bis 38 Sekunden deutlich weniger oszillierend (ANEL et al., 2003).

PONTBRIAND et al. sind 1989 zu der Erkenntnis gelangt, dass das manuelle Einfrieren von Spermienproben über LN_2 -Dampf vergleichbare Ergebnisse erzielt wie das Einfrieren mit einem programmierbaren Gefriercomputer. Jedoch ist die manuelle Methode empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen wie beispielsweise Luftbewegung und personelle Handhabung des Konservierungsprozesses, infolge deren eine konsequentere Überwachung erfolgen muss.

Trotz ihrer hohen Empfindlichkeit gegenüber extremen Temperaturveränderungen scheinen Schafbockspermien einen weiten Bereich von Gefriergeschwindigkeiten zu tolerieren. FISER und FAIRFULL (1984) berichteten, dass mit Gefrieraten von 10 bis $100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ akzeptable Ergebnisse für den Konservierungserfolg erzielt wurden, wohingegen WATSON und MARTIN (1975) die Temperaturspanne auf 6 bis $24^{\circ}\text{C}/\text{min}$ eingrenzten. Eine spätere Studie gab eine Einfrierate von 50 bis $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ als optimal für Schafpermien an (CURRY et al., 1994). In dieser Arbeit verweisen die Autoren auf Erkenntnisse von MAZUR et al. (1972), denen zufolge eine Steigerung der Gefrierate einen Anstieg der Überlebensrate der Spermienzellen nach sich zieht. Diese Proportionalität erreicht ein Maximum, nach dem jede weitere Beschleunigung der Gefriergeschwindigkeit eine Verringerung der Überlebensrate verursacht. Laut KUMAR et al. (2003) erzeugte eine Kühlrate von $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ die geringsten Gefrierschäden an Spermien verschiedener Spezies. Bei allen getesteten Spezies zeigte die Vitalität stets bessere Ergebnisse als die Motilität. Nach ihren Erfahrungen wirkten sich langsamere Gefrieraten insbesondere bei Schafbockspermien nachteilig aus. Auch BYRNE et al. (2000) erzielten bessere Ergebnisse bezüglich der Fertilität bei der Anwendung höherer Einfriergeschwindigkeiten und unterstützten damit auch Beobachtungen von O'NEILL (1998). Im Unterschied zu den oben genannten Arbeiten wurde hier stufenweise eingefroren: Während der kritischen Temperaturzone von -10 bis -25°C

lag die schnelle Kühlrate bei 5°C/min und die langsame bei 0,5°C/min. Danach wurde die Einfriergeschwindigkeit auf 50°C/min erhöht. Auch BAG et al. (2002) wandten eine lineare Gefrierate von 25°C/min bei der Kryokonservierung von Schafbockspermien an. Sie erweiterten ihre Studie allerdings um die Erkenntnis über den Effekt der Temperatur, bei der die „Ministraws“ in LN₂ getaucht werden. Damit griffen sie Beobachtungen von SALOMON auf, der bereits 1970 eine Abhängigkeit des Kryokonservierungserfolges von diesem Faktor beschrieb. Die besten Ergebnisse erzielte man, wenn die Spermienproben bei einer Temperatur von -125°C in LN₂ überführt wurden. Signifikant schlechtere Resultate ergaben Eintauchtemperaturen von -25 und -75°C.

2.2.5 Auftauen

Bei der Kryokonservierung hat sowohl die Kühl- als auch die Auftaugeschwindigkeit einen Effekt auf das Überleben der Spermien (MAZUR, 1985), weil die kritische Temperaturzone von -15°C bis -60°C beim Auftauen ein zweites Mal überwunden werden muss.

Das Auftauen der Pailletten erfolgt üblicherweise in einem Warmwasserbad durch Anwendung standardisierter Temperatur-Zeit-Kombinationen (HOLT, 2000).

WEITZE et al. (1987) weisen darauf hin, dass das Oberflächen-Volumen-Verhältnis für die Spermienzellen auch beim Auftauen von Bedeutung ist (siehe auch 2.2.4). Ein großes Verhältnis der Zelloberflächen zum Volumen der Probensuspension, wie es bei den Pailletten gegeben ist, erlaubt eine nahezu lineare Auftaurate.

Die Vor- und Nachteile schneller und langsamer Auftautechniken werden bei SALOMON und MAXWELL (1995a) und bei PURSEL und PARK (1985) detailliert diskutiert. Im Allgemeinen wird eine schnelle Auftaugeschwindigkeit durch relativ hohe Temperaturen empfohlen (60°C bis 80°C für 5 bis 10 Sekunden), da ein langsamer Erwärmungsprozess unter Umständen eine Vergrößerung kleiner intrazellulärer Eiskristalle ermöglicht. Auch das osmotische Gleichgewicht im intra- und extrazellulären Raum wird durch eine schnelle Auftaumethode schneller wiederhergestellt als durch eine langsame (MAZUR, 1985). Ein schneller

Auftauvorgang erfordert allerdings eine genaue Kontrolle des Zeitraumes, während dessen die Spermien den hohen Temperaturen ausgesetzt sind. Erreicht nämlich die Temperatur innerhalb der Paillette ein zu hohes Niveau, kann die Lebensfähigkeit der Spermien beeinträchtigt werden (SÖDERQUIST et al., 1997).

Einige Autoren weisen jedoch darauf hin, dass die Handhabung eines schnellen Auftauprozesses aufgrund seiner kurzen Dauer unter Praxisbedingungen schwierig ist (FISER et al., 1986b; PAULENZ et al., 2004). Sie empfehlen, die Temperatur zu senken und die Dauer des Auftauprozesses entsprechend zu verlängern. In einer Studie von PONTBRIAND et al. (1989) zeigte ein Vergleich einer schnellen mit einer langsamen Auftaumethode (60°C für 8 Sek. vs. 37°C für 20 Sek.) keine Unterschiede der Spermienqualität bezüglich Motilität, Akrosomenintegrität und Fertilität. Eine höhere Überlebensrate wurde jedoch bei der höheren Auftautemperatur erzielt.

Eine Temperatur-Zeit-Kombination von 37°C für 30 Sekunden ist wegen der leichten Durchführbarkeit heutzutage eine weitverbreitete Methode zum Auftauen kryokonservierter Schafspermien (u.a. OLLERO et al., 1998; D'ALESSANDRO und MARTEMUCCI, 2003).

2.3. Durchflusszytometrische Bestimmung von Spermienqualitätsparametern

Mit der Entwicklung der ersten Durchflusszytometer im Jahre 1965 wurde es möglich, eine große Anzahl von Zellstrukturen und deren physiologische Eigenschaften mithilfe optischer Messungen objektiv zu beurteilen (GROGAN und COLLINS, 1990). Von dieser Methode verspricht man sich auch auf dem Gebiet der Spermienuntersuchung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen wesentliche Fortschritte. Dabei werden Spermien mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und in einen Flüssigkeitsstrom geleitet. Dieser wird an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Die für die einzelnen Zellen charakteristischen Lichtemissionen werden von einem optischen System detektiert und in digitale Signale umgewandelt, die dann von einem Computer ausgewertet werden (BALLACHEY et al., 1986).

Die Anfärbbarkeit der Spermienzellen lässt Rückschlüsse auf deren funktionalen Status zu. Es lassen sich so u.a. die Integrität der Plasmamembran, der akrosomale Status, das Mitochondrienmembranpotential und die Chromatinstruktur der Spermien analysieren. Die unterschiedlichen Fluorochrome können auch kombiniert eingesetzt

werden, so dass mehrere Parameter gleichzeitig untersucht werden können (ERICSSON et al., 1993; GARNER et al., 1997). Weitere Vorteile bietet die durchflusszytometrische Technik zum einen mit der Möglichkeit, Tausende Spermien innerhalb von Sekunden zu analysieren (STOLLA 1984; BALLACHEY et al., 1986; GRAHAM et al., 1990) und zum anderen mit der höheren Sensitivität verglichen mit konventionellen Methoden (MIYAZAKI et al., 1990; MAGISTRINI et al., 1997).

2.3.1 FITC-PNA/PI-Färbung zur Bestimmung der Plasmamembranintegrität und des akrosomalen Status

Befruchtungsfähige Spermien müssen einerseits intakte und reaktionsfähige Akrosomen besitzen (CHENG et al., 1996; BLOTTNER et al., 1998; ABOU-HAILA und TULSIANI, 2000). Andererseits sind auch die Integrität und die damit zusammenhängende Funktionalität der Plasmamembran für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien sowie für deren Vitalität von Bedeutung (JEYENDRAN et al., 1984).

Nach BLOTTNER et al. (1998) lassen sich Akrosomen selektiv mit Lektinen markieren, an die Fluoreszenzfarbstoffe wie das Fluorescence-Isothiocyanat (FITC) konjugiert sind. Die Lektine von *Arachis hypogea* (peanut agglutinin, PNA) und *Pisum sativum* agglutinin (PSA) haben sich dabei besonders bewährt. PNA bindet sich selektiv an die äußere Akrosomenmembran und emittiert nach Laseranregung grünes Licht (MORTIMER et al., 1987; CHENG et al., 1996; BLOTTNER et al., 1998; COOPER und YEUNG, 1998; SIRIVAIDYAPONG et al., 2000; GADELLA et al., 2001). Die Plasmamembran vitaler Spermien, die über der äußeren Akrosomenmembran verläuft, ist für FITC-PNA nicht permeabel (CHENG et al., 1996). Während der Akrosomenreaktion tritt die sogenannte Vesikulation ein. Dabei verschmelzen die beiden Membranen miteinander und der Farbstoff kann an die äußere Akrosomenmembran binden. Daher zeigen akrosomenreagierte Spermien eine grün fluoreszierende Kopfkappe.

Davon zu unterscheiden sind Spermien mit zusätzlich geschädigter Plasmamembran (KRIENKE, 2003). Diese werden durch den Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI)

angefärbt, der an die DNA der Zellen bindet. Da PI nicht membranpermeabel ist, gelingt eine Kernfärbung nur bei geschädigter Plasmamembran (GROGAN und COLLINS, 1990; HARRISON und VICKERS, 1990; GARNER et al., 1994). Infolgedessen zeigen akrosomenreagierte Spermien mit geschädigter Plasmamembran neben der grünen Kopfkappenfluoreszenz eine rote Kernfärbung.

Zusätzlich lässt sich eine weitere Spermienpopulation detektieren, die sich ausschließlich mit PI anfärbt. Diese besteht aus Spermien, deren Plasmamembran defekt ist, aber deren äußere Akrosomenmembran intakt und daher nicht mit FITC-PNA anfärbbar ist. Dazu gehören aber auch völlig denaturierte Zellen mit Verlust des Akrosoms (GARNER et al., 1999; RATHI et al., 2001).

Die Kombination der Färbungen FITC-PNA/PI ermöglicht also die Unterscheidung von drei Spermienpopulationen: vitale Spermien mit Akrosomenreaktion zeigen eine grüne Kopfkappenfluoreszenz; tote Spermien mit Akrosomendegeneration weisen im Kern eine rote und am Akrosom eine grüne Färbung auf; tote Spermien mit völlig intaktem oder auch verlorengangenen Akrosom zeigen nur eine rote Kernfluoreszenz (THOMAS et al., 1997; RATHI et al., 2001).

2.3.2 JC1/PI-Färbung zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP)

Das lipophile Kation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyaniniodid (JC-1) ist ein membranpermeables Cyanid mit einer delokalisierten positiven Ladung (REERS et al., 1991). Dieser metachromatische Farbstoff kann entweder in monomerer Form vorliegen oder reversibel in Aggregatform übergehen. Laut COSSARIZZA et al. (1996) werden JC-1-Monomere in die Mitochondrienmatrix eingeschleust. Da es sich um ein positiv geladenes Molekül handelt, ist der Einstrom proportional zum Mitochondrienmembranpotential (MMP). Ab einem Schwellenwert von -80 bis -100 mV werden JC-1-Aggregate reversibel gebildet. Nach einer Laseranregung (488 nm) fluoresziert die monomere Form von JC-1 mit einer Wellenlänge von 527 nm grün. In Aggregatform emittiert es bei 590 nm oranges Licht (REERS et al., 1991; SMILEY et al., 1991). Auf diese Weise können Spermien mit

hohem MMP, deren Mitochondrien orange fluoreszieren, von denen mit niedrigem MMP (grüne Fluoreszenz) unterschieden werden (COSSARIZZA et al., 1996).

2.3.3 Akridinorange-Färbung (AO) zur Analyse der Spermienchromatinstruktur (SCSA™)

Basierend auf der „Two-step AO-Färbeprozedur“ nach DARZYNKIEWICZ et al. (1975), entwickelten EVENSON et al. (1980) den Sperm Chromatin Structure Assay® (SCSA™), mit dessen Hilfe die Integrität der Spermienchromatinstruktur beurteilt werden kann (EVENSON et al., 1991; LOVE und KENNEY, 1998; SPANO et al., 1998).

Der SCSA™ beruht auf dem Prinzip, dass abnormal strukturiertes Chromatin in situ eine erhöhte Empfindlichkeit für eine physikalisch induzierte Denaturierung besitzt (DIGRASSIE, 2000).

Um die Denaturierung der DNA für die Analyse herbeizuführen, werden die Spermien zunächst mit einem stark sauren Medium (pH = 1,2) versetzt. Dies bewirkt eine teilweise Trennung der normalerweise doppelsträngig vorliegenden DNA in Einzelstränge. Der Grad der provozierten Denaturierung ist abhängig von der Chromatinintegrität der Spermien. Nach der anschließenden Färbung mit Akridinorange (AO) kommt es zur Anlagerung des Farbstoffs an die gesamte DNA. Doppelsträngige, also intakte DNA, emittiert Licht im grünen Bereich, während einzelsträngige, denaturierte Erbsubstanz rot fluoresziert (EVENSON et al., 1991; EVENSON et al., 1995).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Versuchstiere

Für die Samengewinnung wurden drei Schafböcke der Rasse Deutsches Bergschaf (Nr. 8, 9, 11), sowie ein Schafbock der Rasse Deutsches Merinolandschaf (Nr. 7) herangezogen. Das Alter der Tiere betrug durchschnittlich eineinhalb Jahre. Die vier Schafböcke wurden unter gleichen Fütterungs- und Aufstallungsbedingungen gehalten.

3.2 Samengewinnung

Von den vier Schafböcken wurden in dem Zeitraum vom 16.11.2004 bis zum 11.12.2004 mit Intervallen von zwei bis drei Tagen mehrere Ejakulate gewonnen. Als Sprungpartner diente ein ruhiges weibliches Schaf. Zur Samengewinnung wurde eine künstliche Vagina (Modell Hannover) verwendet, deren Innentemperatur mit erhitztem Wasser auf 42°C eingestellt war. Um die Stimulation zu optimieren, wurde zusätzlich Luft über ein Ventil in die Scheide eingeblasen und die Öffnung der Vagina mittels Vaseline gleitfähig gemacht. Dem Auffangen des Ejakulates dienten temperierte und geeichte Samenauffanggläser, die zum Erhalt der Temperatur durch einen Isoliermantel vor Kälte geschützt waren.

3.3 Samenuntersuchung

Die Qualität der gewonnenen Ejakulate wurde direkt im Anschluss an die Samengewinnung beurteilt. Eigenschaften wie Volumen, Farbe, Konsistenz, „Wolkenbildung“ und Fremdpartikel wurden zunächst grobsinnlich bestimmt. Mikroskopisch ermittelt wurden Dichte, Motilität, die Anzahl lebender und toter Spermien sowie die Morphologie.

Für den durchzuführenden Versuch mussten die in Tabelle 1 angegebenen Mindestanforderungen erfüllt sein. Andernfalls wurden die entsprechenden Ejakulate

ausgesondert. Für den Versuch wurden von jedem Schafbock 5 geeignete Ejakulate herangezogen.

Tab. 3.1. Mindestanforderungen an die Frischejakulate (physiologische Spermienqualitätsparameter)

Parameter	Anforderung	Parameter	Anforderung
Volumen	≥ 1 ml	Massenbewegung	+++
Konsistenz	rahmig	Motilität Vorwärtsbeweglichkeit %	> 70
Farbe	elfenbeinfarben		
Dichte Spermien/ml	≥ 2,8 Mrd.	Morphologie Gesamtdefekte%	< 20
Vitalität %	≥ 80		

3.3.1 Makroskopische Untersuchung

3.3.1.1 Volumen

Das Volumen des Ejakulates wurde durch Ablesen der Milliliter an der Eichung des tulpenförmigen Samenauffangglases bestimmt. Für die Durchführung des vorliegenden Versuchs genügte eine ungefähre Messgröße.

3.3.1.2 Konsistenz

Die Konsistenz des Ejakulates gibt einen ersten Hinweis auf die Konzentration der Spermien und wurde durch Schwenken des Samenauffangglases bestimmt. Je spermienreicher das Ejakulat ist, desto höher ist seine Konsistenz. Aufgrund der hohen Spermiedichte von Wiederkäuerejakulaten weisen diese meist eine rahmige Konsistenz auf.

3.3.1.3 Farbe

Die Farbe des Ejakulates lässt ebenfalls einen Schluss auf die Konzentration der Spermien zu und zeigt eine eventuelle Beimengung von Blut oder Entzündungsprodukten an. Demnach kann eine Beurteilung als grau-weiß, elfenbeinfarben, gelblich, rötlich oder bräunlich erfolgen.

3.3.2 Mikroskopische Untersuchung

3.3.2.1 Dichtebestimmung

Die Spermiendichte wurde mittels einer Zählkammer nach BÜRCKER und TÜRCK bestimmt und in Milliarden pro Milliliter angegeben. Die Verdünnung und Abtötung der Spermien erfolgte mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:100. Die Auszählung wurde am Phasenkontrastmikroskop bei 400facher Vergrößerung durchgeführt. Die Konzentration der Spermien im Ejakulat wurde nach der Zählung rechnerisch durch eine vorgegebene Formel ermittelt.

3.3.2.2 Massenbewegung

Zur Beurteilung der Massenbewegung wurde mit einer Kapillarpipette ein Tropfen unverdünnten Spermas auf einen auf 37°C temperierten Objektträger verbracht und ohne Deckglas bei 100facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop untersucht. Die Einstufung erfolgte nach folgendem Schema: +++ für sehr gute Massenbewegung, ++ für gute Massenbewegung, + für mäßige Massenbewegung, +- für geringe Massenbewegung und – für keine Massenbewegung.

3.3.2.3 Einzelbewegung

Die Einzelbewegung der Spermien im Ejakulat wurde in Form einer subjektiven prozentualen Schätzung in die Kategorien vorwärtsbeweglich, ortsbeweglich,

pathologisch beweglich und unbeweglich eingeteilt. Für die Beurteilung wurde ein Tropfen des Ejakulates auf einem erwärmten Objektträger (37°C) mit 10µl Natriumchloridlösung verdünnt und nach Auflegen eines Deckglases bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop untersucht.

3.3.2.4 Lebend-Tot-Färbung

Für die Lebend-Tot-Färbung wurde eine Bromphenolblau-Nigrosin-Lösung verwendet. Die Zellmembran lebender Samenzellen ist für diesen Farbstoff nicht durchlässig, so dass diese sich im Ausstrichpräparat ungefärbt darstellten. Tote Spermien hingegen zeigen aufgrund ihrer porösen Membran eine tiefe Blaufärbung. Zur Herstellung eines gefärbten Ausstrichpräparats wurden nebeneinander auf einen entfetteten Objektträger ein Tropfen unverdünnten Spermas und eine etwa gleich große Menge Färbelösung aufgetragen. Zum Vermischen der beiden Flüssigkeiten wurde die gerade Kante eines Deckglases gleichzeitig in beide Tropfen eingetaucht und behutsam von einer Ecke zur anderen hin bewegt. Anschließend wurde das Gemisch mit demselben Deckglas auf dem Objektträger möglichst dünn ausgestrichen und dieser anschließend zur schnellen Trocknung auf einen Heiztisch verbracht. Im getrockneten Präparat wurden bei 1000facher Vergrößerung mit dem Ölimmersionsobjektiv 300 Spermien ausgezählt und der prozentuale Anteil ungefärbter Spermien ermittelt.

3.3.2.5 Morphologie

Die Beurteilung der Spermienmorphologie erfolgte ebenfalls anhand des gefärbten Ausstrichpräparats, das für die Lebend-Tot-Bestimmung (siehe 3.3.2.4) angefertigt wurde. Die Spermien wurden in die Kategorien Kopfmisbildungen, Schwanzmisbildungen, Krümmlinge, abgelöste Köpfe, abgelöste Kopfkappen und Zytoplasmotropfen eingeteilt. Es wurden 300 Spermien bei 1000facher Vergrößerung mit dem Ölimmersionsobjektiv ausgezählt. Der prozentuale Anteil der jeweiligen morphologisch veränderten Spermien wurde rechnerisch ermittelt.

3.4 Kryokonservierung

3.4.1 Verdüner

Die Ejakulate wurden insgesamt in vier Teilproben unterteilt, jeweils zwei für jede Versuchsreihe.

Für die erste Versuchsreihe wurde OviPro[®] (Minitüb, Tiefenbach, Germany) als Verdüner A herangezogen. Dieser ist eine Spezialanfertigung des Triladyl[®] - Verdünners für Bullenspermien (Minitüb, Tiefenbach, Germany) auf Eigelb-Basis.

Für die zweite Versuchsreihe stand als Verdüner B eine Spezialanfertigung eines Verdünners auf Sojabohnen-Basis zur Verfügung, der bei der Tiefgefrierkonservierung von Rindersamenzellen unter dem Namen AndroMed[®] (Minitüb, Tiefenbach, Germany) Verwendung findet.

3.4.2 Glycerinkonzentration

Der OviPro[®] - Verdüner wurde von der Firma Minitüb (Tiefenbach, Germany) ohne Glycerin zur Verfügung gestellt. Das kommerziell erhältliche Triladyl[®] enthält 7% Glycerin. Für den vorliegenden Versuch wurden drei Chargen OviPro[®] -Verdünner angefertigt, die 2%, 7% bzw. 12% Glycerin enthielten.

Die Sonderanfertigung des AndroMed[®] -Verdünners der Firma Minitüb (Tiefenbach, Germany) enthielt 2% Glycerin. Nach Angaben des Herstellers war es technisch nicht möglich, einen Verdüner ohne Glycerin herzustellen. Der kommerziell erhältliche AndroMed[®] -Verdüner weist einen Gehalt von 7% auf. Der Glyzeringehalt wurde in zwei weiteren Chargen auf 7% bzw. 12% eingestellt.

Die Verdünnung der Ejakulate erfolgte nach zwei unterschiedlichen Verdünnungsprotokollen: Ein Teil der Samenproben wurde durch eine 1-Schritt-Verdünnung mit den 7% Glycerin enthaltenden Verdünnern einmalig auf ihre Endkonzentration verdünnt und in Pailletten (Volumen 0,5 ml) abgefüllt.

Anschließend wurden sie im Kühlschrank innerhalb von zwei Stunden von Raumtemperatur auf 5°C heruntergekühlt.

Die anderen Teilproben wurden durch eine 2-Schritt-Verdünnung zunächst mit dem 2% Glycerin enthaltenden Verdünnern vorverdünnt und innerhalb von zwei Stunden im Kühlschrank auf 5°C heruntergekühlt. Erst durch einen zweiten Verdünnungsschritt bei 5°C wurde die Glycerinkonzentration mithilfe der 12%-igen Verdünnungslösung auf die Endkonzentration von 7% eingestellt (siehe 3.4.5 Versuchsaufbau). Danach wurde die Spermiesuspension in Pailletten (Volumen 0,5 ml) abgefüllt.

3.4.3 Einfriermethoden

Die Teilproben beider Versuchsreihen (siehe 2.4.1) wurden jeweils nach zwei unterschiedlichen Protokollen eingefroren:

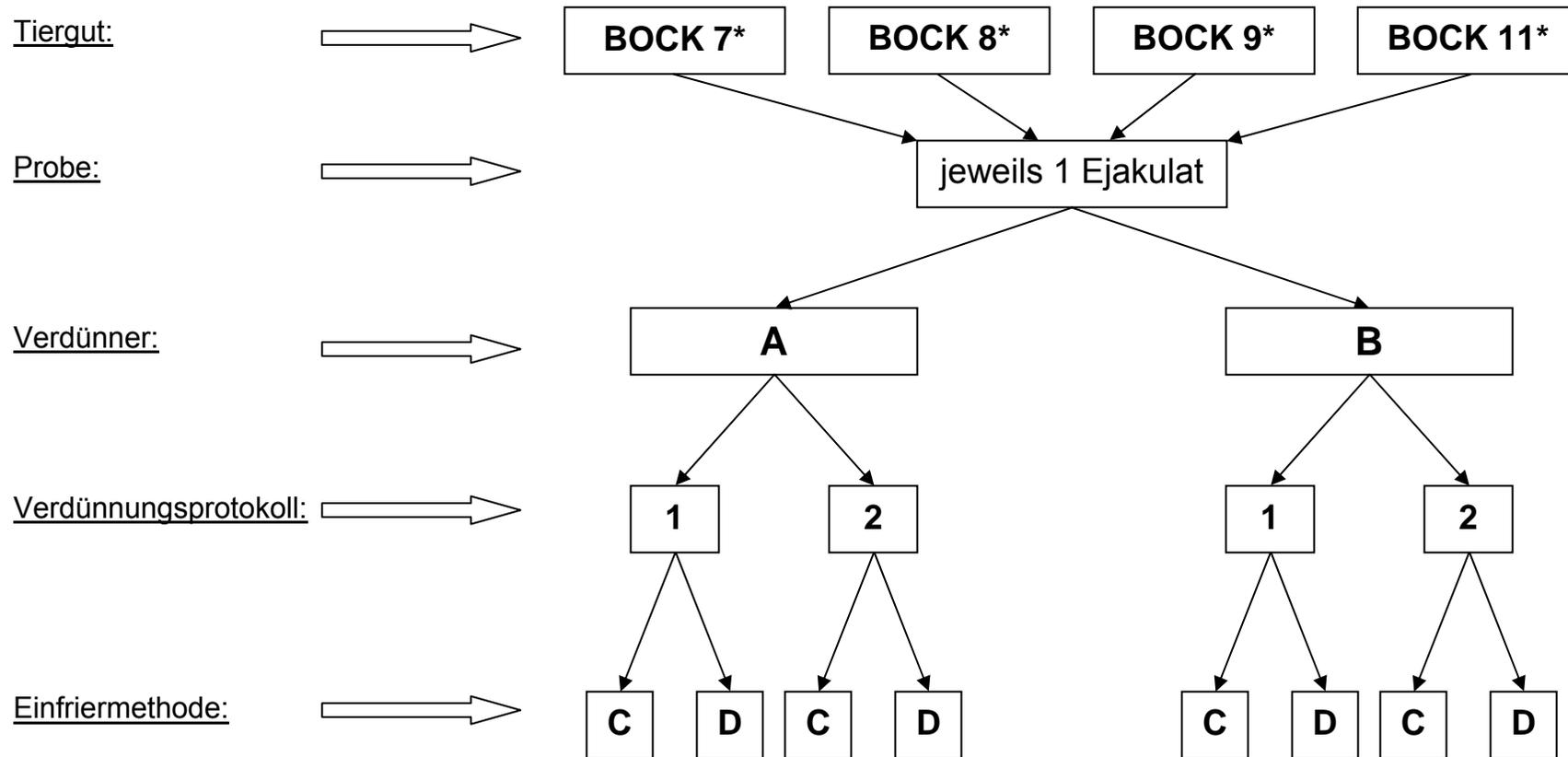
In Protokoll 1 wurden die Proben zunächst im Kühlschrank für zwei Stunden von Raumtemperatur auf 5°C heruntergekühlt (siehe 3.4.2). Anschließend wurden die Pailletten im Stickstoffdampf 4 cm über der Flüssigstickstoff-Oberfläche für 10 Minuten eingefroren und dann in den flüssigen Stickstoff eingetaucht.

Für Protokoll 2 stand ein Tiefgefriercomputer (Icecube, Minitüb, Germany) zur Verfügung, der die Proben im Anschluss an die zweistündige Kühlphase (siehe 3.4.2) mit einer Kühlrate von -30°C pro Minute von 5°C auf -125°C einfrieren sollte. Danach wurden die Proben in flüssigen Stickstoff getaucht (siehe 3.4.5 Versuchsaufbau).

3.4.4 Auftaumethode

Die kryokonservierten Samenproben wurden im Wasserbad bei 37°C in 30 Sekunden aufgetaut und anschließend in der unter 3.5 beschriebenen Weise bezüglich Motilität, Vitalität und Morphologie untersucht.

3.4.5 Versuchsaufbau

Legende:

Tiergut: 4 Schafböcke (*institutsinterne Nummerierung)
 Verdünner: (A) = Eidotter-Verdünner: OviPro® (B) = Soja-Verdünner: AndroMed®
 Verdünnungsprotokoll: (1) = 1-Schritt-Verdünnung (2) = 2-Schritt-Verdünnung
 Einfrieremethode: (C) = Gefriercomputer (D) = N₂-Dampf-Methode
 Versuchsdurchgänge: 5

3.5 Lichtmikroskopische Untersuchung der aufgetauten Proben

3.5.1 Motilität

Für die mikroskopische Beurteilung der Motilität nach dem Auftauen wurde ein Tropfen der Spermienprobe auf einen erwärmten Objektträger (37°C) verbracht und bei 400facher Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop untersucht. Die Anteile vorwärtsbeweglicher, ortsbeweglicher und pathologisch beweglicher Spermien wurden durch subjektive Schätzung ermittelt und zum Parameter beweglich zusammengefasst. Demgegenüber stand der Anteil unbeweglicher Spermien. Die jeweiligen Anteile wurden in Prozent angegeben.

3.5.2 Lebend-Tot-Färbung

Die Beurteilung der Vitalität nach dem Auftauen erfolgte anhand einer Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau-Nigrosin (siehe 3.3.2.4). Der Anteil lebender und toter Spermien wurde nach Auszählung von 300 Zellen bei 1000facher Vergrößerung mit dem Ölimmersionsobjektiv in Prozent angegeben.

3.5.3 Morphologie

Die Morphologie der Spermien nach dem Auftauen wurde im gefärbten Ausstrichpräparat untersucht (siehe 3.3.2.5). Der Anteil der morphologisch veränderten Spermien der jeweiligen Kategorien wurde nach Auszählung von 300 Zellen bei 1000facher Vergrößerung mit dem Ölimmersionsobjektiv in Prozent angegeben.

3.6 Durchflusszytometrische Untersuchung der aufgetauten Proben

Die Plasmamembranintegrität, das Mitochondrienmembranpotential und der akrosomale Status nach dem Auftauen wurden im vorliegenden Versuch mit Hilfe durchflusszytometrischer Verfahren anhand spezifischer Färbemethoden untersucht. Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die Samenproben mit TYRODE-Medium zu einer Endkonzentration von 5×10^6 Spermien/ml verdünnt und anschließend mit den Farbstoffen FITC-PNA/PI bzw. JC1/PI gefärbt und bei 37°C in einem Thermostat (TYP 5320, Fa. Eppendorf) inkubiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Farbstoffe erfolgte die Inkubation in einem abgedunkelten Raum. Für die Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSATM) wurden die Proben nach den Angaben von EVENSON und JOST (2000) aufbereitet.

Das TYRODE-Medium war wie folgt zusammengesetzt: 0,5844 g NaCl; 0,0231 g KCl, 0,0294 g CaCl₂ x H₂O; 0,0081 g MgCl₂ x 6 H₂O; 0,0061 g NaH₂PO₄; 0,0110 g Na Pyruvat; 0,2421 g Na Lactat; 0,2383g HEPES, ad 100 ml Aqua dest.

3.6.1 Geräte und Geräteeinstellungen

Für die Untersuchungen wurde ein Durchflusszytometer FACScanTM (Fa. Becton Dickinson) verwendet. Das Gerät war mit einem Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Leistung von 15 mW ausgestattet. Die Messungen wurden mit drei verschiedenen Filtern durchgeführt: FL-1 (530/30 nm) für die grüne Fluoreszenz, FL-2 (585/42 nm) für die orange Fluoreszenz und FL-3 (650 LP nm) für die rote Fluoreszenz. Die Datenanalyse erfolgte mit einem Power Mac G4-Computer der Firma Apple Computer Inc., der an das FACScan-Gerät angeschlossen war. Die Bearbeitung und Auswertung der Daten wurde mit Hilfe des Software-Programms CellquestTM (Fa. Becton Dickinson) durchgeführt. Die Auswertung der SCSATM-Daten erfolgte mit dem Software-Programm DAS Version 4.40 (BEISKER, 1994). Für die verschiedenen Untersuchungen mit den Kombinations-Farbstoffen FITC-PNA/PI und JC1/PI wurden einheitliche Geräteeinstellungen am FACScanTM vorgenommen.

3.6.2 FITC-PNA/PI-Färbung zur Bestimmung der Plasmamembranintegrität und des akrosomalen Status

Für die Bestimmung der Plasmamembranintegrität und damit der Vitalität kam der Fluoreszenzfarbstoff PI zum Einsatz, durch den nur Spermien mit beschädigter Plasmamembran anfärbbar sind. Diese Spermien wiesen eine erhöhte Rotfluoreszenz auf und wurden als tot eingestuft.

Bei der Analyse des akrosomalen Status wurde zwischen Spermien mit intaktem und solchen mit defektem Akrosom unterschieden. Nur Akrosomenschäden erlauben die Färbung des Spermiums durch den FITC-PNA-Farbstoff. So gefärbte Samenzellen zeigen eine grüne Fluoreszenz.

Für die Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz ausgewählt. Als Farbstoffe wurden FITC-PNA von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Katalog-Nr. L-7381) und Propidium-Iodide 95-98% von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Katalog-Nr. P-4170) eingesetzt.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 500µl verdünntes Sperma mit 3µl PI (2,99 mM) und 5µl FITC-PNA (100µg/ml Aqua dest.) gemischt und im Thermostat (TYP 5320, Fa. Eppendorf) bei 37°C für 15 Minuten inkubiert.

Für die Auswertung und Beurteilung wurden die Populationen der Spermienköpfe bezüglich ihrer Plasmamembranintegrität und ihres akrosomalen Status in vier Kategorien unterteilt, wobei die Zuordnung jeweils subjektiv erfolgte: Spermien mit defekter Plasmamembran und defektem Akrosom, Spermien mit intakter Plasmamembran und defektem Akrosom, Spermien mit defekter Plasmamembran und intaktem Akrosom sowie Spermien mit intakter Plasmamembran und intaktem Akrosom.

3.6.3 JC1/PI-Färbung zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP)

Zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) wurde festgelegt, dass die Stärke der Orange fluoreszenz der Spermien proportional zu deren Vitalität und Motilität ist. Zusätzlich sollten Spermien mit defekter Plasmamembran, d.h. tote Spermien, durch den Einsatz des rot fluoreszierenden PI-Farbstoffes eindeutig identifiziert werden.

Für die Auswertung kamen die Farbstoffe 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) von Molecular Probes (Katalog-Nr. T-3168), sowie Propidium-Iodide 95-98% von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Katalog-Nr. P-4170) zur Anwendung. Für die Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz, FL-2 für die orange Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt.

Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden 500µl des verdünnten Spermas mit 10µl JC-1 (0,153mM) gefärbt und im Thermostat (TYP 5320, Fa. Eppendorf) bei 37°C für 15 Minuten inkubiert.

Zur Auswertung und Beurteilung wurden die Populationen der Spermienköpfe im Punktwolkendiagramm in drei Kategorien unterteilt: Spermien mit hohem MMP (erhöhte Orange fluoreszenz), Spermien mit niedrigem MMP (geringe Orange fluoreszenz), tote Spermien (Rot fluoreszenz). Auch hier erfolgte die Zuordnung zur jeweiligen Kategorie subjektiv.

3.6.4 Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA™)

Zur Probenaufbereitung wurden die unverdünnten, schockgefrorenen Spermaproben zunächst mit einem stark sauren Medium (pH=1,2) versetzt, um eine Denaturierung der DNA herbeizuführen. Danach wurde die Spermienprobe mit Akridinorange angefärbt. Eine intakte, doppelsträngige DNA wird durch eine grüne Fluoreszenz angezeigt, während einzelsträngige DNA rot fluoresziert.

Für die Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt. Es folgte die computergestützte Auswertung der Punktwolkendiagramme und Messdaten, für die die in die Auswertung eingehenden Spermienpopulationen subjektiv eingegrenzt wurden. Angelehnt an EVENSON et al. (1991) galt für Spermien, dass entweder die grüne oder die rote Fluoreszenz mindestens 200 betragen und die grüne Fluoreszenzintensität maximal 800 und die rote maximal 900 betragen durfte.

3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit den Programmen Ms Excel 2002 (Microsoft Corporation/USA 2002) und SPSS 12.0 (SPSS GmbH Software München). Dabei wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

Zur Ermittlung von Signifikanzen zwischen den einzelnen Versuchsergebnissen wurde eine univariate Varianzanalyse unter Berücksichtigung sogenannter „nested effects“ durchgeführt. Diese zeigten signifikante Einflüsse der unterschiedlichen Versuchsvariablen auf die beurteilten Parameter an.

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Spermauntersuchung im Frischsamen

Die mikroskopische Untersuchung der Ejakulate nach der Samengewinnung ergab bei allen 4 Böcken physiologische Samenparameter (siehe Tab. 3.1). Bei der flowzytometrischen Bestimmung des Anteils denaturierter Spermien wurden ebenfalls sehr niedrige Anteile von Spermien mit Chromatinbrüchen ermittelt. Die Unterschiede zwischen den Böcken, insbesondere zwischen Bock 7 und 9, waren nicht signifikant.

Tab. 4.0 Übersicht über die lichtmikroskopisch ermittelte Spermienqualität vor der Kryokonservierung: Mittelwerte; (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

*Bock Nr.	Vitalität %	Motilität %	Anomalien gesamt %	Zytoplasmotropfen %
7	92	88	6	10
8	88	85	5	2
9	91	87	3	3
11	89	86	3	2

* institutsinterne Nummerierung

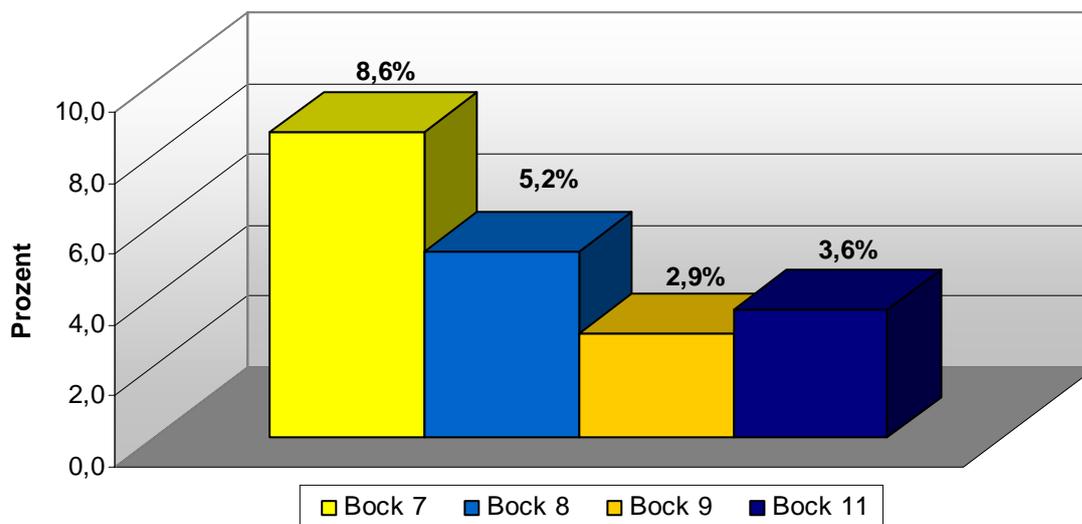


Abb.13: Übersicht über den prozentualen Anteil denaturierter Spermien nach durchflusszytometrischer Bestimmung (Mittelwert, 4 Böcke, je 5 Ejakulate)

4.2 Effekte der Verdünner in den TG-Samenproben

4.2.1 Einfluss der Verdünner auf die Motilität nach dem Auftauen

Die Motilität der mit Eigelb-Verdünner (Verdünner A) konservierten Ejakulatproben betrug gemäß subjektiver lichtmikroskopischer Einschätzung nach dem Auftauen durchschnittlich $34,4\% \pm 5,6\%$. Die mit Soja-Verdünner (Verdünner B) konservierten Ejakulatproben wiesen nach der gleichen Schätzmethode nach dem Auftauen eine Motilität von durchschnittlich $36,8\% \pm 5,2\%$ auf (Tab. 4.1, Abb.1). Die Differenz der Ergebnisse war signifikant ($p < 0,05$).

Tab. 4.1 Prozentuale Anteile motiler Spermien nach subjektiver lichtmikroskopischer Einschätzung: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

Verdünner	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
Eigelb	$34,4 \pm 5,6$	24,0	41,0
Soja	$36,8 \pm 5,2$	26,0	44,0

4.2.2 Einfluss der Verdünner auf das Mitochondrienmembranpotential (MMP) nach dem Auftauen

Der prozentuale Anteil von Spermien mit hohem MMP in Ejakulaten, die mit Verdünner A (eigelbhaltig) konserviert wurden, betrug nach durchflusszytometrischer Bestimmung JC-1-gefärbter Proben durchschnittlich $29,9\% \pm 18,0\%$. Die mit Verdünner B (sojahaltig) konservierten Spermien wiesen einen prozentualen Anteil von durchschnittlich $12,9\% \pm 5,9\%$ auf (Tab. 4.2, Abb.2). Die Differenz der Ergebnisse war signifikant ($p < 0,05$).

Tab. 4.2 **Prozentualer Anteil von Spermien mit hohem MMP: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)**

Verdünner	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
Eigelb	29,9 ± 18,0	4,6	73,9
Soja	12,9 ± 5,9	3,1	27,3

4.2.3 Einfluss der Verdünner auf die Vitalität nach dem Auftauen

Die Vitalität der Spermien der mit Verdünner A eingefrorenen Proben lag nach lichtmikroskopischer Auszählung der Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstriche nach dem Auftauen im Durchschnitt bei 68,2% ± 10,3%. In den mit Verdünner B konservierten Proben betrug die Vitalität nach der gleichen Auszählungsmethode nach dem Auftauen durchschnittlich 54,6% ± 6,4% (Tab. 4.3, Abb.1). Die Differenz der Ergebnisse war signifikant ($p < 0,05$).

Tab. 4.3 **Prozentualer Anteil vitaler Spermien nach lichtmikroskopischer Auszählung: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)**

Verdünner	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
Eigelb	68,2 ± 10,3	48,4	81,6
Soja	54,6 ± 6,4	40,2	64,0

4.2.4 Einfluss der Verdünner auf die Plasmamembranintegrität nach dem Auftauen

Der durch die FITC-PNA/PI-Färbung ermittelte prozentuale Anteil an Spermien mit erhaltener Plasmamembranintegrität, betrug bei den Proben, die mit Verdünner A konserviert wurden, durchschnittlich 77,1% ± 27,5%. Die mit Verdünner B behandelten Proben wiesen nach durchflusszytometrischer Untersuchung einen prozentualen Anteil an Spermien mit unversehrter Plasmamembran von durchschnittlich 68,6% ± 11,6% auf (Tab. 4.4, Abb.2). Die Differenz der Ergebnisse war signifikant ($p < 0,05$).

Tab. 4.4 Prozentualer Anteil von Spermien mit erhaltener Plasmamembranintegrität: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

Verdünner	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
Eigelb	77,1 ± 27,5	8,7	93,2
Soja	68,6 ± 11,6	48,5	87,0

4.2.5 Einfluss der Verdünner auf den akrosomalen Status nach dem Auftauen

Der prozentuale Anteil an Spermien mit geschädigtem Akrosom betrug nach durchflusszytometrischer Untersuchung von Proben, die mit Verdünner A konserviert wurden, durchschnittlich 61,9% ± 15,8%. Die mit Verdünner B eingefrorenen Proben wiesen nach FITC-PNA/PI-Färbung zu durchschnittlich 57,5% ± 16,0% ein geschädigtes Akrosom auf (Tab. 4.6, Abb.2). Die Differenz der Ergebnisse zeigte eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$).

Tab. 4.6 Prozentualer Anteil von Spermien mit geschädigtem Akrosom: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte, (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

Verdünner	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
Eigelb	61,9 ± 15,8	35,2	91,4
Soja	57,5 ± 16,0	30,8	85,7

4.2.6 Einfluss der Verdünner auf die Morphologie nach dem Auftauen

Der prozentuale Anteil an Spermien mit primären Anomalien, d. h. Kopf- und Schwanzanomalien, schwankte in Proben mit Verdünner A nach dem Auftauen zwischen 0 und 1,3%. Im Durchschnitt betrug er 0,2% ± 0,3%. Der prozentuale Anteil an Spermien mit sekundären Anomalien, zu denen abgelöste Köpfe, abgelöste Kopfkappen und Krümmlinge zählen, schwankte zwischen 2,4 und 13,9%. Im Durchschnitt betrug er 5,8% ± 4,1%. Spermien mit Zytoplasmotropfen lagen durchschnittlich zu 0,8% ± 1,4% vor. In Proben mit Verdünner B schwankte der

prozentuale Anteil von Spermien mit primären Anomalien nach dem Auftauen zwischen 0 und 0,2%. Im Durchschnitt betrug er $0,1\% \pm 0,1\%$. Der prozentuale Anteil an Spermien mit sekundären Anomalien lag in einem Bereich von 1,7 und 6,1% und betrug durchschnittlich $3,8\% \pm 1,7\%$. Spermien mit Zytoplasmotropfen lagen im Durchschnitt zu $0,1\% \pm 0,2\%$ vor (Tab. 4.5, Abb.1).

Die Differenzen der Ergebnisse der Parameter sekundäre Anomalien und Zytoplasmotropfen waren signifikant ($p < 0,05$).

Tab. 4.5 Prozentualer Anteil von Spermienanomalien nach lichtmikroskopischer Auszählung von Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstrichen: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwert, (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

Morphologie	Verdünner	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
¹ Primäre Anomalien	Eigelb	$0,2 \pm 0,3$	0	1,3
	Soja	$0,1 \pm 0,1$	0	0,2
² Sekundäre Anomalien	Eigelb	$5,8 \pm 4,1$	2,4	13,9
	Soja	$3,8 \pm 1,7$	1,7	6,1
Zytoplasmotropfen.	Eigelb	$0,8 \pm 1,4$	0	5,2
	Soja	$0,1 \pm 0,2$	0	0,7

¹Kopf- und Schwanzanomalien

²abgelöste Köpfe, abgelöste Kopfkappen, Krümlinge

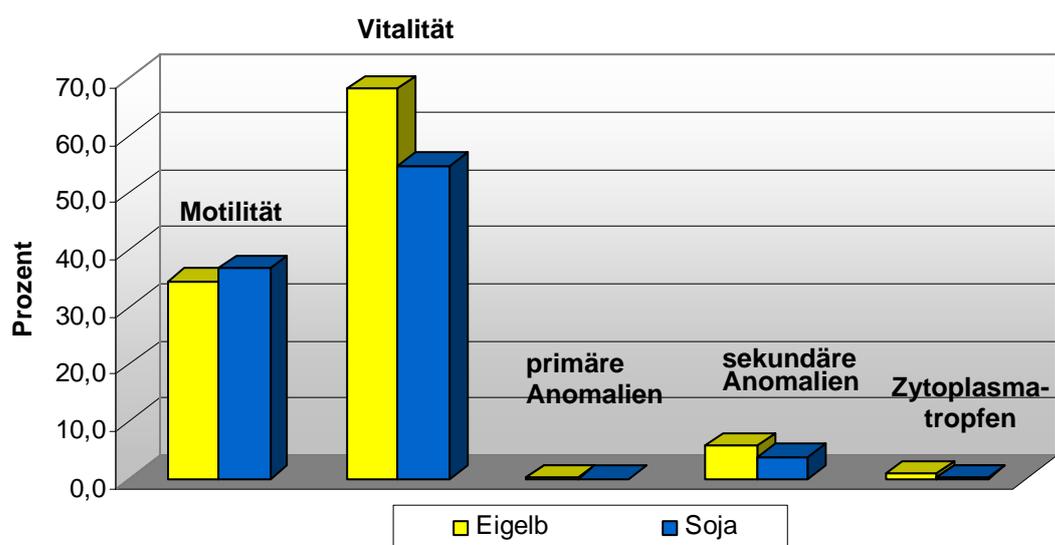
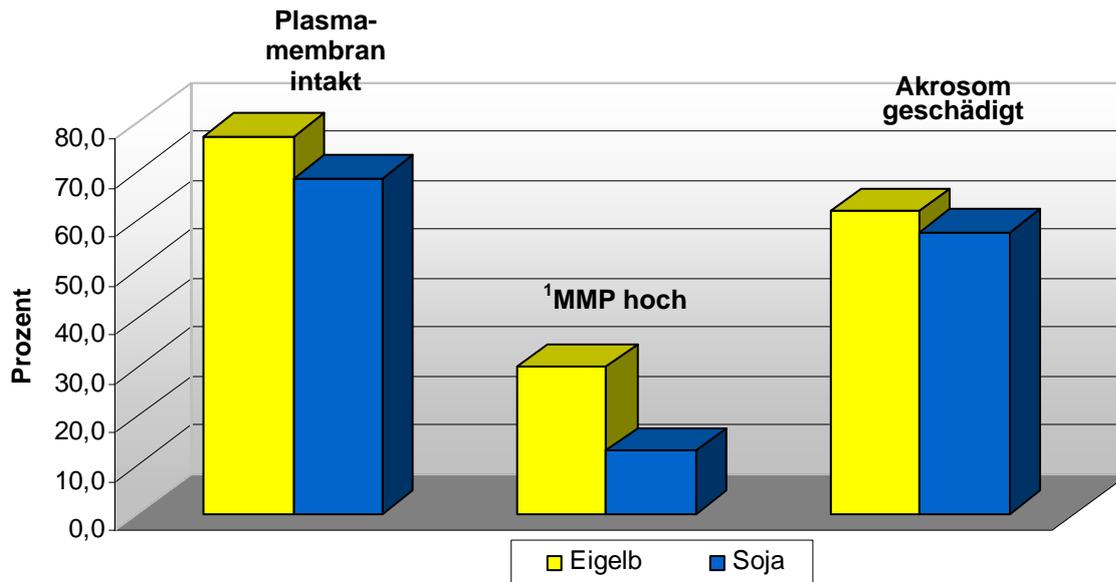


Abb. 1: Übersicht über die Effekte der Verdünner auf die Spermienqualitätsparameter nach mikroskopischer Untersuchung nach dem Auftauen. Angezeigt ist jeweils der prozentuale Anteil an Spermien für den entsprechenden Parameter.



¹ hohes Mitochondrienmembranpotential

Abb.2: Übersicht über die Effekte der Verdüner auf die durchflusszytometrisch ermittelten Spermienqualitätsparameter. Angezeigt ist jeweils der prozentuale Anteil an Spermien für den entsprechenden Parameter.

4.3 Effekte des Verdünnungsprotokolls in den TG-Samenproben

4.3.1 Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf die Motilität nach dem Auftauen

Der prozentuale Anteil motiler Spermien in Proben, die nach dem 1-Schritt-Verdünnungsprotokoll (Protokoll 1) eingefroren wurden, betrug nach subjektiver lichtmikroskopischer Einschätzung durchschnittlich $35,8\% \pm 4,5\%$. In Proben, die nach dem 2-Schritt-Verdünnungs-Protokoll (Protokoll 2) konserviert wurden, ergab die subjektive lichtmikroskopische Einschätzung einen prozentualen Anteil motiler Spermien von $35,3\% \pm 6,4\%$ (Tab. 4.7, Abb.3). Die Differenz der Ergebnisse war nicht signifikant ($p > 0,05$).

Tab. 4.7 Prozentualer Anteil motiler Spermien nach subjektiver lichtmikroskopischer Einschätzung: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

Verdünnungsprotokoll	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
1-Schritt-Verdünnung	35,8 ± 4,5	25,0	43,0
2-Schritt-Verdünnung	35,3 ± 6,4	24,0	44,0

4.3.2 Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf das Mitochondrienmembranpotential (MMP) nach dem Auftauen

Der prozentuale Anteil von Spermien mit hohem MMP in Ejakulaten, die mit 1-Schritt-Verdünnung konserviert wurden, betrug nach durchflusszytometrischer Bestimmung JC-1-gefärbter Proben durchschnittlich 23,8% ± 15,7%. Proben, die mit 2-Schritt-Verdünnung konserviert wurden, wiesen einen prozentualen Anteil von Spermien mit hohem MMP von durchschnittlich 19,1% ± 15,5% auf (Tab. 4.8, Abb.4). Der Einfluss des Verdünnungsprotokolls war nicht signifikant ($p > 0,05$).

Tab. 4.8 Prozentualer Anteil von Spermien mit hohem MMP: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

Verdünnungsprotokoll	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
1-Schritt-Verdünnung	23,8 ± 15,7	3,1	73,9
2-Schritt-Verdünnung	19,2 ± 15,5	3,4	73,1

4.3.3 Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf die Vitalität nach dem Auftauen

Die Vitalität der Spermien der nach Protokoll 1 eingefrorenen Proben lag nach lichtmikroskopischer Auszählung der Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstriche nach dem Auftauen im Durchschnitt bei 64% ± 8,8%. Die nach Protokoll 2 konservierten Proben zeigten nach dem Auftauen eine durchschnittliche Vitalität von 58,8% ± 12,4% (Tab. 4.9, Abb.3). Die Differenz der Ergebnisse zeigte eine Signifikanz ($p > 0,05$).

Tab. 4.9 **Prozentualer Anteil vitaler Spermien nach lichtmikroskopischer Auszählung: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)**

Verdünnungsprotokoll	X ± s	Minimalwert	Maximalwert
1-Schritt-Verdünnung	64 ± 8,8	48,6	78,2
2-Schritt-Verdünnung	58,8 ± 12,4	40,2	81,6

4.3.4 Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf die Plasmamembranintegrität nach dem Auftauen

Der prozentuale Anteil an Spermien mit erhaltener Plasmamembranintegrität betrug nach durchflusszytometrischer Untersuchung von Proben, die mit 1-Schritt-Verdünnung konserviert wurden, durchschnittlich 71,1% ± 23,7%. Proben, die mit 2-Schritt-Verdünnung konserviert wurden, wiesen einen prozentualen Anteil an Spermien mit erhaltener Plasmamembranintegrität von durchschnittlich 74,7% ± 23,0% auf (Tab. 4.10, Abb.4). Die Differenz der Ergebnisse war statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Tab. 4.10 **Prozentualer Anteil von Spermien mit erhaltener Plasmamembranintegrität in: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)**

Verdünnungsprotokoll	X ± s	Minimalwert	Maximalwert
1-Schritt-Verdünnung	71,1 ± 23,7	8,7	89,1
2-Schritt-Verdünnung	74,7 ± 23,0	13,9	91,7

4.3.5 Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf den akrosomalen Status nach dem Auftauen

Der prozentuale Anteil an Spermien mit reagiertem bzw. geschädigtem Akrosom betrug nach durchflusszytometrischer Bestimmung von Proben, die mit 1-Schritt-Verdünnung konserviert wurden, durchschnittlich 54,7% ± 16,3%. Die mit 2-Schritt-

Verdünnung eingefrorenen Proben wiesen nach FITC-PNA/PI-Färbung zu durchschnittlich $64,7\% \pm 14,3\%$ ein reagiertes Akrosom auf. (Tab. 4.12, Abb.4). Die Differenz der Ergebnisse war signifikant ($p < 0,05$).

Tab. 4.12 Prozentualer Anteil von Spermien mit reagiertem Akrosom: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

Verdünnungsprotokoll	$\bar{X} \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
1.Schritt-Verdünnung	$54,7 \pm 16,3$	30,8	87,8
2-Schritt-Verdünnung	$64,7 \pm 14,3$	37,8	91,4

4.3.6 Einfluss des Verdünnungsprotokolls auf die Morphologie nach dem Auftauen

Der prozentuale Anteil an Spermien mit primären Anomalien, d. h. Kopf- und Schwanzanomalien, schwankte in Proben nach Protokoll1 nach dem Auftauen zwischen 0 und 0,7%. Im Durchschnitt betrug er $0,1\% \pm 0,2\%$. Der prozentuale Anteil an Spermien mit sekundären Anomalien, zu denen abgelöste Köpfe, abgelöste Kopfkappen und Krümmlinge zählen, schwankte zwischen 1,7 und 13,9%. Im Durchschnitt betrug er $6,8\% \pm 3,5\%$. Spermien mit Zytoplasmotropfen lagen durchschnittlich zu $0,3\% \pm 0,7\%$ vor. In Proben nach Protokoll 2 schwankte der prozentuale Anteil von Spermien mit primären Anomalien nach dem Auftauen zwischen 0 und 0,4%. Im Durchschnitt betrug er $0,1\% \pm 0,3\%$. Der prozentuale Anteil an Spermien mit sekundären Anomalien lag in einem Bereich von 2,5 und 3,3%. Im Durchschnitt betrug er $2,8\% \pm 0,9\%$. Spermien mit Zytoplasmotropfen lagen im Durchschnitt zu $0,6\% \pm 1,3\%$ vor (Tab. 4.11, Abb.3). Bezüglich des Auftretens sekundärer Anomalien zeigt sich zwischen in der Differenz der Ergebnisse der beiden Verdünnungsprotokolle eine deutliche Signifikanz ($p < 0,05$).

Tab. 4.11 Prozentualer Anteil von Spermienanomalien nach lichtmikroskopischer Auszählung von Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstrichen: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwert (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

Morphologie	Verdünnungsprotokoll	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
Primäre Anomalien ¹	1-Schritt-Verdünnung	$0,1 \pm 0,2$	0	0,7
	2-Schritt-Verdünnung	$0,1 \pm 0,3$	0	0,4
Sekundäre Anomalien ²	1-Schritt-Verdünnung	$6,8 \pm 3,5$	1,7	13,9
	2-Schritt-Verdünnung	$2,8 \pm 0,9$	2,5	3,3
Zytoplasmotropen.	1-Schritt-Verdünnung	$0,3 \pm 0,7$	0	2,6
	2-Schritt-Verdünnung	$0,6 \pm 1,3$	0	5,2

¹Kopf- und Schwanzanomalien

²abgelöste Köpfe, abgelöste Kopfkappen, Krümlinge

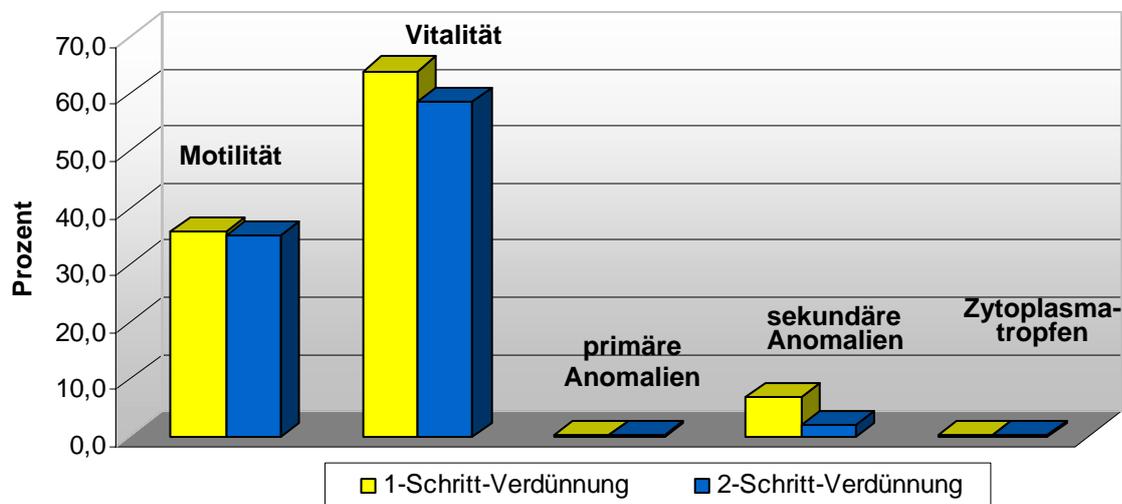
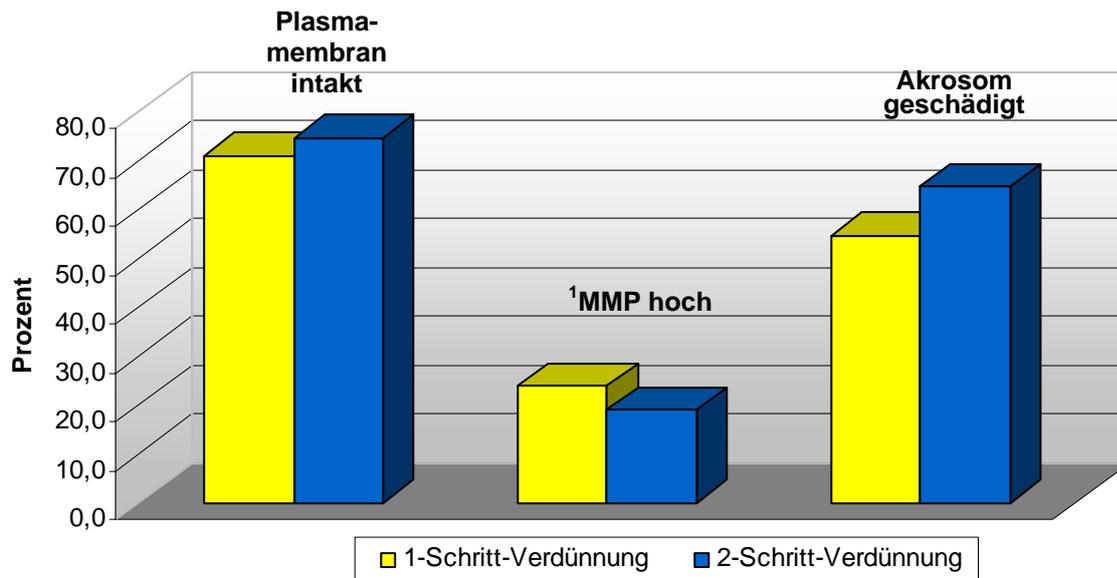


Abb.3: Übersicht über die Effekte des Verdünnungsprotokolls auf die Spermienqualitätsparameter nach mikroskopischer Untersuchung nach dem Auftauen. Angezeigt ist jeweils der prozentuale Anteil an Spermien für den entsprechenden Parameter.



¹Mitochondrienmembranpotential

Abb.4: Übersicht über die Effekte des Verdünnungsprotokolls auf die durchflusszytometrisch ermittelten Spermienqualitätsparameter. Angezeigt ist jeweils der prozentuale Anteil an Spermien für den entsprechenden Parameter.

4.4 Effekte der Einfrieremethode in den TG-Samenproben

4.4.1 Einfluss der Einfrieremethode auf die Motilität nach dem Auftauen

Die Motilität der nach Protokoll 1 (manuell über N₂-Dampf) konservierten Samenproben betrug gemäß subjektiver lichtmikroskopischer Einschätzung nach dem Auftauen durchschnittlich 33,8% ± 5,4%. In Proben, die nach Protokoll 2 (Gefriercomputer) konserviert wurden, ergab die subjektive lichtmikroskopische Einschätzung einen prozentualen Anteil motiler Spermien von 37,4% ± 5,0% (Tab. 4.13, Abb.5). Die Differenz der Ergebnisse war nicht signifikant ($p > 0,05$).

Tab. 4.13 Prozentualer Anteil motiler Spermien nach subjektiver lichtmikroskopischer Einschätzung: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

Einfrierprotokoll	X ± s	Minimalwert	Maximalwert
N ₂ -Dampf	33,8 ± 5,4	24,0	40,0
Computer	37,4 ± 5,0	28,0	44,0

4.4.2 Einfluss der Einfrieremethode auf das Mitochondrienmembranpotential (MMP) nach dem Auftauen

Der prozentuale Anteil von Spermien mit hohem MMP in Ejakulaten, die nach Protokoll 1 eingefroren wurden, betrug nach durchflusszytometrischer Bestimmung JC-1-gefärbter Proben durchschnittlich $19,9\% \pm 14,6\%$. In Proben, die nach Protokoll 2 eingefroren wurden, betrug der durchschnittliche prozentuale Anteil von Spermien mit hohem MMP $22,9\% \pm 16,6\%$ (Tab. 4.14, Abb.6). Die Einfrierprotokolle wiesen keine statistisch signifikante Ergebnisdifferenz auf ($p > 0,05$).

Tab. 4.14 **Prozentualer Anteil von Spermien mit hohem MMP: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)**

Einfrierprotokoll	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
N ₂ -Dampf	$19,9 \pm 14,6$	3,1	73,1
Computer	$22,9 \pm 16,6$	3,4	73,9

4.4.3 Einfluss der Einfrieremethode auf die Vitalität nach dem Auftauen

Die Vitalität der Spermien der manuell über N₂-Dampf eingefrorenen Proben lag nach lichtmikroskopischer Auszählung der Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstriche nach dem Auftauen im Durchschnitt bei $60,4\% \pm 11,9\%$ (Tab. 4.15, Abb.5). Die mit dem Gefriercomputer konservierten Proben zeigten nach dem Auftauen eine Vitalität von durchschnittlich $62,3\% \pm 10,1\%$ (Tab. 4.30, Abb.5). Die Ergebnisse wiesen keinen signifikanten Unterschied auf ($p > 0,05$).

Tab. 4.15 **Prozentualer Anteil vitaler Spermien nach lichtmikroskopischer Auszählung: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)**

Einfrierprotokoll	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
N ₂ -Dampf	$60,4 \pm 11,9$	40,2	81,6
Computer	$62,3 \pm 10,1$	47,3	81,2

4.4.4 Einfluss der Einfriermethode auf die Plasmamembranintegrität nach dem Auftauen

Die Plasmamembranintegrität von Spermien, die nach Protokoll 1 eingefroren wurden, war nach durchflusszytometrischer Bestimmung im Durchschnitt zu $74,2\% \pm 25,6\%$ erhalten (Tab. 4.16, Abb.6). Der prozentuale Anteil an Spermien mit erhaltener Plasmamembranintegrität betrug nach durchflusszytometrischer Untersuchung von Proben, die nach Protokoll 2 eingefroren wurden, durchschnittlich $71,6\% \pm 21,1\%$ (Tab. 4.16, Abb.6). Die Differenz der Ergebnisse war statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Tab. 4.16 **Prozentualer Anteil von Spermien mit erhaltener Plasmamembranintegrität: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)**

Einfrierprotokoll	X ± s	Minimalwert	Maximalwert
N ₂ -Dampf	74,2 ± 25,6	8,7	93,2
Computer	71,6 ± 21,1	13,9	89,1

4.4.5 Einfluss der Einfriermethode auf den akrosomalen Status nach dem Auftauen

Der prozentuale Anteil an Spermien mit geschädigtem Akrosom betrug nach durchflusszytometrischer Bestimmung von Proben, die nach Protokoll 1 konserviert wurden, durchschnittlich $62,0\% \pm 15,9\%$. Die nach Protokoll 2 eingefrorenen Proben wiesen nach FITC-PNA/PI-Färbung zu durchschnittlich $57,4\% \pm 16,0\%$ ein beschädigtes Akrosom auf. (Tab. 4.18, Abb.6). Die Differenz der Versuchsergebnisse zeigte keine Signifikanz ($p > 0,05$).

Tab. 4.18 Prozentualer Anteil von Spermien mit geschädigtem Akrosom: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwerte (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

Einfrierprotokoll	X ± s	Minimalwert	Maximalwert
N ₂ -Dampf	62,0 ± 15,9	32,2	91,4
Computer	57,4 ± 16,0	33,6	89,4

4.4.6 Einfluss der Einfriermethode auf die Morphologie nach dem Auftauen

Der prozentuale Anteil an Spermien mit primären Anomalien, d. h. Kopf- und Schwanzanomalien, schwankte in Proben, die nach Protokoll 1 eingefroren wurden nach dem Auftauen zwischen 0 und 0,1%. Im Durchschnitt betrug er 0,1% ± 0,1%. Der prozentuale Anteil an Spermien mit sekundären Anomalien, zu denen abgelöste Köpfe, abgelöste Kopfkappen und Krümmlinge zählen, schwankte zwischen 2,7 und 8,1%. Im Durchschnitt betrug er 4,6% ± 3,0%. Spermien mit Zytoplasmotropfen lagen durchschnittlich zu 0,3% ± 0,7% vor (Tab. 4.17, Abb.5). In Proben, die nach Protokoll 2 konserviert wurden, schwankte der prozentuale Anteil von Spermien mit primären Anomalien nach dem Auftauen zwischen 0 und 0,4%. Im Durchschnitt betrug er 0,2% ± 0,3%. Der prozentuale Anteil an Spermien mit sekundären Anomalien lag in einem Bereich von 2,5 und 9,0%. Im Durchschnitt betrug er 5,0% ± 3,6%. Spermien mit Zytoplasmotropfen lagen im Durchschnitt zu 0,5% ± 1,3% vor (Tab. 4.17, Abb.5). Die Ergebnisse zeigten bezüglich des Auftretens von Zytoplasmotropfen eine signifikante Differenz ($p < 0,05$).

Tab. 4.17 Prozentualer Anteil von Spermienanomalien nach lichtmikroskopischer Auszählung von Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstrichen: Mittelwert, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwert (4 Schafböcke, je 5 Ejakulate)

Morphologie	Einfrierprotokoll	$X \pm s$	Minimalwert	Maximalwert
Primäre Anomalien ¹	N ₂ -Dampf	0,1 ± 0,1	0	0,1
	Computer	0,2 ± 0,3	0	0,4
Sekundäre Anomalien ²	N ₂ -Dampf	4,6 ± 3,0	2,7	8,1
	Computer	5,0 ± 3,6	2,5	9,0
Zytoplasmotropfen.	N ₂ -Dampf	0,3 ± 0,7	0	2,6
	Computer	0,5 ± 1,3	0	5,2

¹Kopf- und Schwanzanomalien

²abgelöste Köpfe, abgelöste Kopfkappen, Krümmlinge

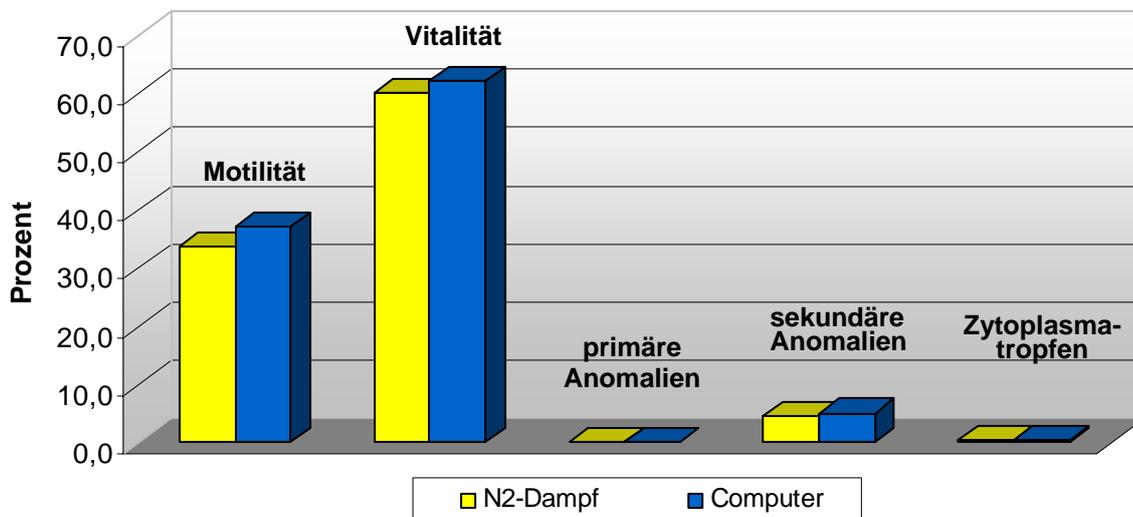
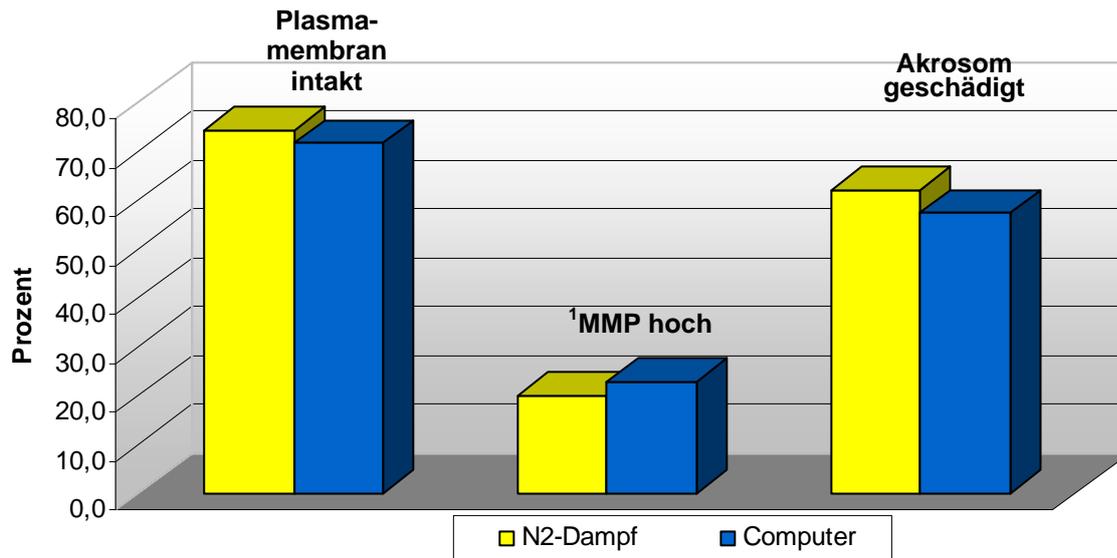


Abb.5: Übersicht über die Effekte des Einfrierprotokolls auf die Spermienqualitätsparameter nach mikroskopischer Untersuchung nach dem Auftauen. Angezeigt ist jeweils der prozentuale Anteil an Spermien für den entsprechenden Parameter.



¹Mitochondrienmembranpotential

Abb.6: Übersicht über die Effekte des Einfrierprotokolls auf die durchflusszytometrisch ermittelten Spermienqualitätsparameter. Angezeigt ist jeweils der prozentuale Anteil an Spermien für den entsprechenden Parameter.

4.5 Kombinationen der Versuchsvariablen Verdünner, Verdünnungsprotokoll und Einfriermethode in den TG-Samenproben

4.5.1 Einfluss der Versuchsvariablen auf die Motilität nach dem Auftauen

Der durchschnittliche prozentuale Anteil motiler Spermien lässt sich nach subjektiver lichtmikroskopischer Einschätzung der Proben aller Versuchsansätze vergleichend wie folgt darstellen:

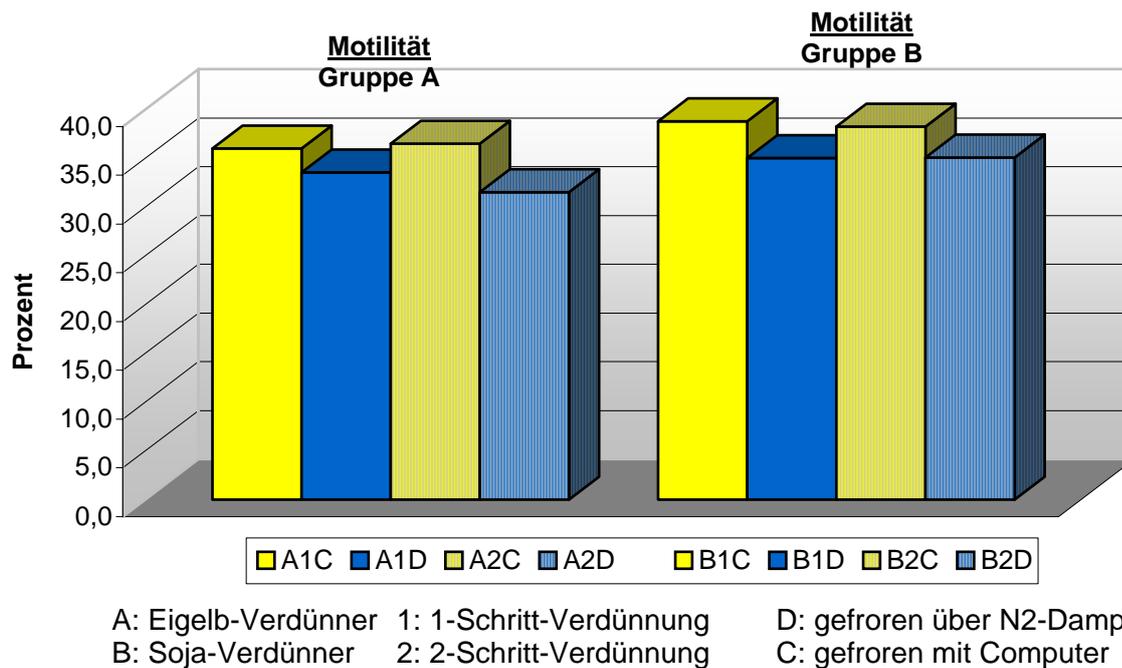


Abb. 7: Vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils motiler Spermien in allen Versuchsansätzen

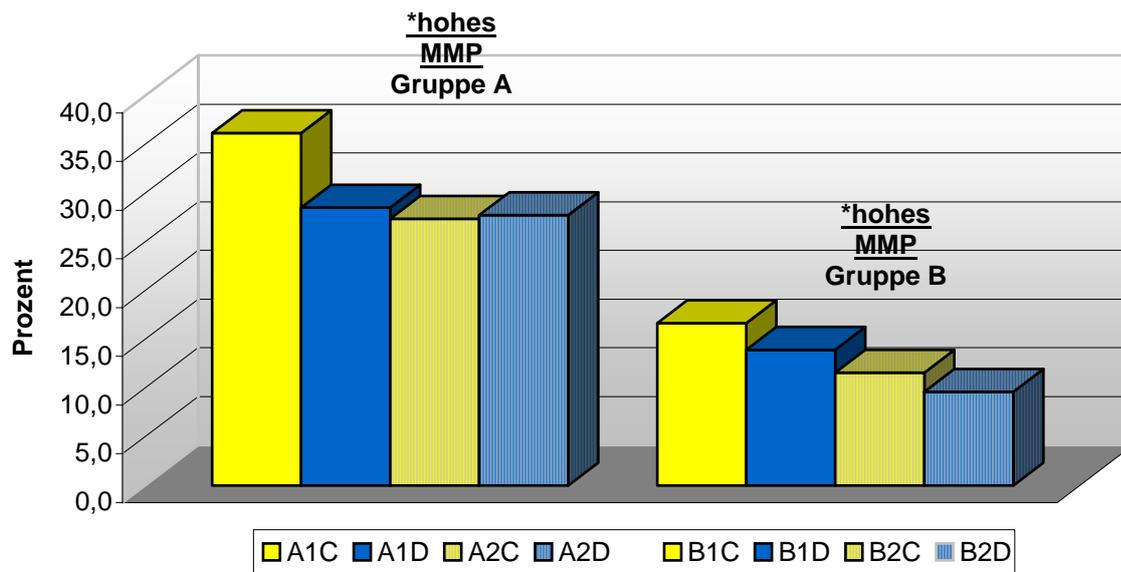
Die Motilität der Spermien in Proben der mit Verdünner A (Eigelb) kombinierten Versuchsgruppe zeigte mit der Methode A2C mit $36,5 \% \pm 4,4\%$ im Durchschnitt den höchsten prozentualen Wert. Die prozentual niedrigste Motilitätsrate dieser Gruppe wiesen Spermien der Versuchsreihe A2D mit einem durchschnittlichen Wert von $31,5\% \pm 7,5\%$ auf. Die Proben der Versuchsreihe B1C weisen mit $38,8\% \pm 4,9 \%$ den größten prozentualen Anteil motiler Spermien im Durchschnitt auf. Demgegenüber standen Proben der Versuchsmethode B1D, die mit $35,0\% \pm 1,2 \%$ im Durchschnitt die niedrigste Motilitätsrate dieser Gruppe repräsentierten.

Bei den mit Verdünner B (Soja) kombinierten Versuchsansätzen lag der prozentuale Anteil motiler Spermien insgesamt oberhalb der Werte für die Versuchsgruppe A.

Signifikante Unterschiede ergaben sich in den Ergebnissen der Versuchsreihe B1C gegenüber den Methoden A1D und A2D. Bei den Messergebnissen innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe zeigten sich keine statistischen Signifikanzen ($p < 0,05$).

4.5.2 Einfluss der Versuchsvariablen auf das Mitochondrienmembranpotential (MMP) nach dem Auftauen

Der durchschnittliche prozentuale Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential lässt sich nach durchflusszytometrischer Untersuchung der mit JC-1 gefärbten Proben aller Versuchsansätze vergleichend wie folgt darstellen:



A: Eigelb-Verdünner 1: 1-Schritt-Verdünnung D: gefroren über N₂-Dampf
 B: Soja-Verdünner 2: 2-Schritt-Verdünnung C: gefroren mit Computer

Abb.8: Vergleichende Darstellung der Anteile von Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (*hohes MMP) in allen Versuchsansätzen

Die Abbildung zeigt signifikante Unterschiede in den Ergebnissen der Versuchsgruppen A und B zugunsten der Versuchsgruppe A ($p < 0,05$).

In der Versuchsgruppe A dominierten Proben der Methode A1C mit einem prozentualen Anteil von $36,2\% \pm 20,3\%$ an hohem MMP. Die niedrigsten Ergebnisse hoher Mobilitätsraten wurde in der Versuchsreihe A2C mit einem Prozentsatz von durchschnittlich $27,4\% \pm 18,2\%$ gemessen. In den Versuchsansätzen, die mit Verdünner B kombiniert wurden, zeigten Spermien der Versuchsreihe B1C mit einem prozentualen Wert von $16,6\% \pm 6,7\%$ den größten Anteil an hohem MMP. In Proben der Versuchsmethode B2D war die Rate an hoher Motilität mit $9,6\% \pm 4,6\%$ im Durchschnitt am niedrigsten. Innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe gab es keine signifikant unterschiedlichen Resultate ($p > 0,05$).

4.5.3 Einfluss der Versuchsvariablen auf die Vitalität nach dem Auftauen

Der durchschnittliche prozentuale Anteil vitaler Spermien lässt sich nach subjektiver lichtmikroskopischer Einschätzung der Proben aller Versuchsansätze vergleichend wie folgt darstellen:

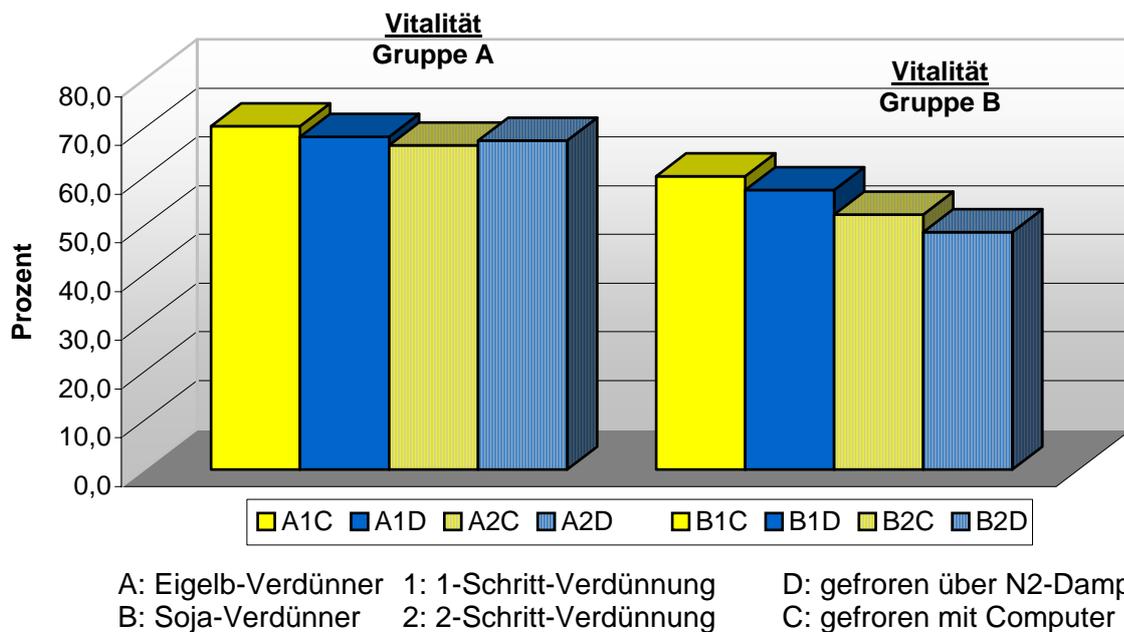


Abb. 9: Vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils vitaler Spermien in allen Versuchsansätzen

Der prozentuale Anteil vitaler Spermien ergab zwischen den Proben der Versuchsgruppe A und Versuchsgruppe B signifikante Unterschiede zugunsten der Versuchsgruppe A ($p < 0,05$). Die Vitalität der Spermien in Proben der mit Verdünner A kombinierten Versuchsreihen wies innerhalb der Methode A1C mit $70,5 \% \pm 8,6\%$ im Durchschnitt den höchsten prozentualen Wert auf. In dieser Versuchsgruppe wurde der niedrigste Anteil vitaler Spermien mit einem durchschnittlichen prozentualen Wert von $66,5\% \pm 12,4\%$ in der Versuchsreihe A2C ermittelt. Die Versuchsansätze mit Verdünner A zeigten untereinander keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse ($p > 0,05$). In der Versuchsgruppe B dominierte die Methode B1C mit einem durchschnittlichen prozentualen Anteil an vitalen Spermien von $60,1\% \pm 4,6\%$. Hier zeigte die Versuchsmethode B2D mit $48,7\% \pm 6,2\%$ die niedrigste Vitalitätsrate. Innerhalb dieser Versuchsgruppe war die Methode B2D signifikant schlechter als die Methoden B1C und B1D ($p < 0,05$).

4.5.4 Einfluss der Versuchsvariablen auf die Plasmamembranintegrität nach dem Auftauen

Der durchschnittliche prozentuale Anteil an Spermien mit erhaltener Plasmamembranintegrität lässt sich nach durchflusszytometrischer Untersuchung der mit FITC-PNA/PI gefärbten Proben aller Versuchsansätze vergleichend wie folgt darstellen:

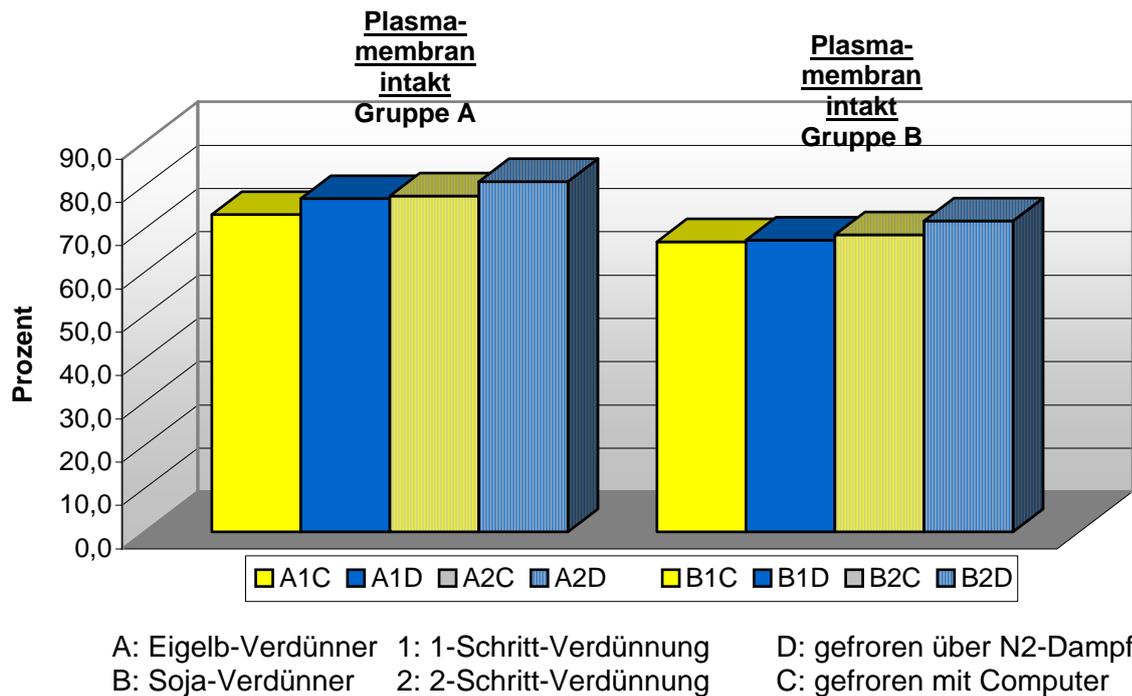


Abb.10: Vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils an Spermien mit erhaltener Plasmamembran in allen Versuchsansätzen

Die Abbildung zeigt signifikante Unterschiede bezüglich der Plasmamembranintegrität zwischen den Methoden der Versuchsgruppen A und B zugunsten der Versuchsgruppe A ($p < 0,05$). In den mit Verdünner A kombinierten Proben betrug der höchste prozentuale Anteil an Spermien mit intakter Plasmamembran durchschnittlich $80,9\% \pm 7,4\%$ und fiel der Versuchsreihe A2D zu. In dieser Gruppe wies die Methode A1C mit $73,3\% \pm 8,5\%$ den niedrigsten prozentualen Durchschnitt an erhaltener Plasmamembranintegrität auf.

In den mit Verdünner B kombinierten Versuchsmethoden betrug der höchste prozentuale Anteil an Spermien mit intakter Plasmamembran durchschnittlich $71,7\%$

$\pm 11,4\%$ und wurde in Proben der Versuchsreihe B1D gemessen. Die Methode B1C dieser Gruppe wies mit einem durchschnittlichen Wert von $67,0\% \pm 10,8\%$ den niedrigsten Prozentsatz an erhaltener Plasmamembranintegrität auf.

4.5.5 Einfluss der Versuchsvariablen auf den akrosomalen Status nach dem Auftauen

Der durchschnittliche prozentuale Anteil an Spermien mit reagiertem Akrosom lässt sich nach durchflusszytometrischer Untersuchung der mit FITC-PNA/PI gefärbten Proben aller Versuchsansätze vergleichend wie folgt darstellen:

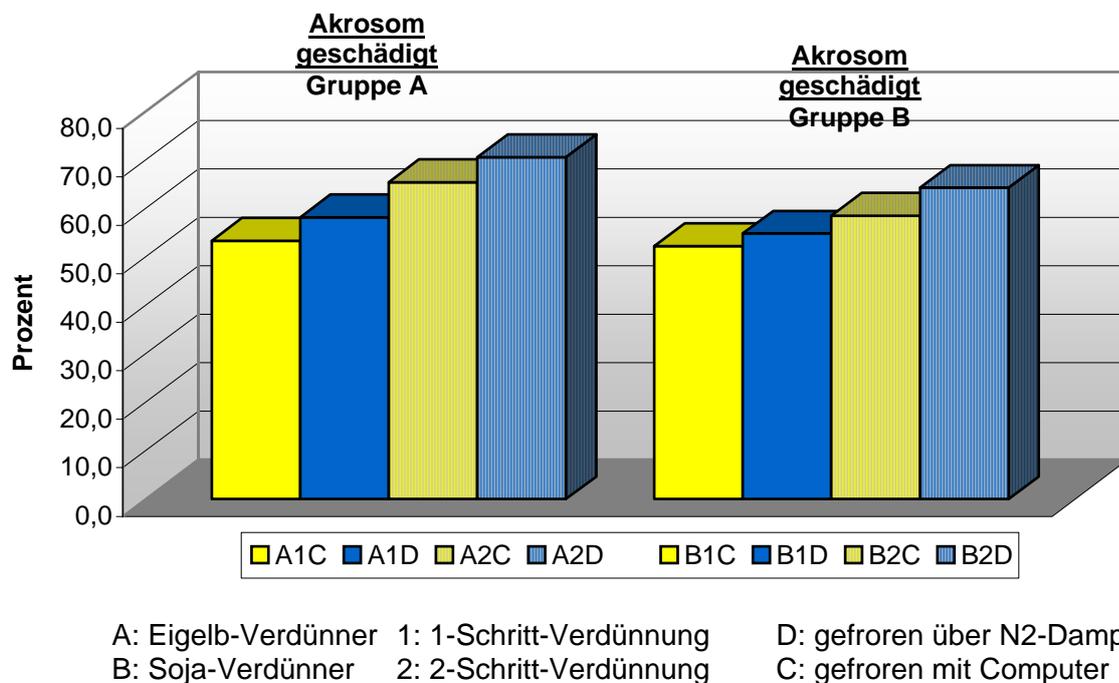


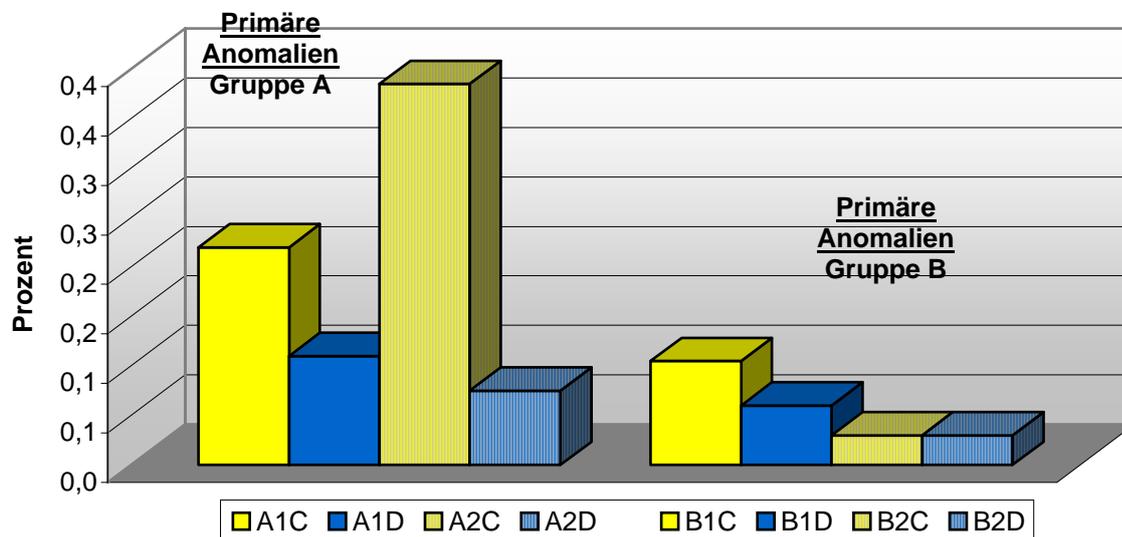
Abb. 14: Vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils an Spermien mit geschädigtem Akrosom in allen Versuchsansätzen

Die Abbildung zeigt z. T. signifikante Unterschiede in den Ergebnissen der Versuchsgruppen A und B zugunsten der Versuchsgruppe B. In der Versuchsgruppe B fiel der höchste prozentuale Anteil an Spermien mit reagiertem Akrosom der Versuchsreihe B2D mit einem durchschnittlichen Wert von $64,3\% \pm 14,5\%$ zu. Den geringsten prozentualen Anteil an akrosomenreagierten Spermien wies im

Durchschnitt die Versuchsreihe B1C auf. Diese Methode unterscheidet sich damit signifikant von den Methoden A2C, A2D und B2D. Es zeigte sich eine Signifikanz innerhalb der Versuchsgruppe B ($p < 0,05$). In den mit Verdünner A kombinierten Versuchsansätzen zeigten die Proben der Methode A2D mit einem durchschnittlichen Wert von $70,6\% \pm 11,8\%$ den größten prozentualen Anteil an akrosomengeschädigten Spermien. In dieser Gruppe wies die Versuchsreihe A1C den durchschnittlichen Wert von $53,4\% \pm 16,1\%$ auf und gab damit den niedrigsten Wert vor. Innerhalb der Versuchsgruppe A war die Differenz der Versuchsergebnisse nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.5.6 Einfluss der Versuchsvariablen auf die Morphologie nach dem Auftauen

Die prozentualen Anteile an primären und sekundären Anomalien sowie an Zytoplasmotropfen lassen sich nach lichtmikroskopischer Auszählung von Bromphenolblau-Nigrosin-Ausstrichen wie folgt darstellen:



A: Eigelb-Verdünner 1: 1-Schritt-Verdünnung D: gefroren über N₂-Dampf
 B: Soja-Verdünner 2: 2-Schritt-Verdünnung C: gefroren mit Computer

Abb. 11: Vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils an Spermien mit primären Anomalien in allen Versuchsansätzen

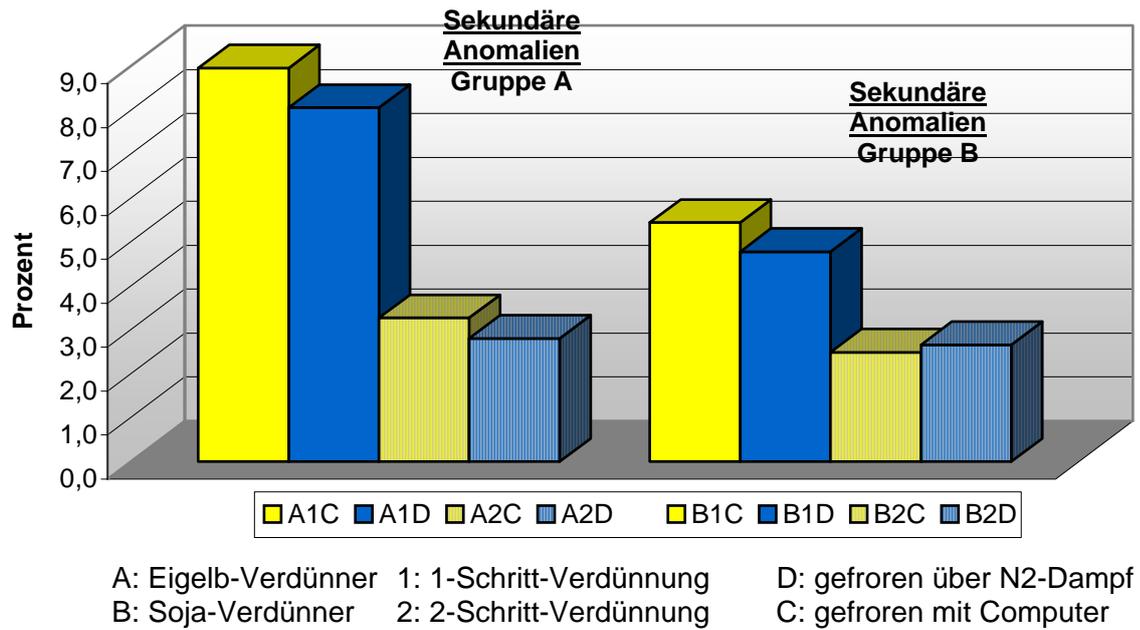


Abb. 12: Vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils an Spermien mit sekundären Anomalien in allen Versuchsansätzen

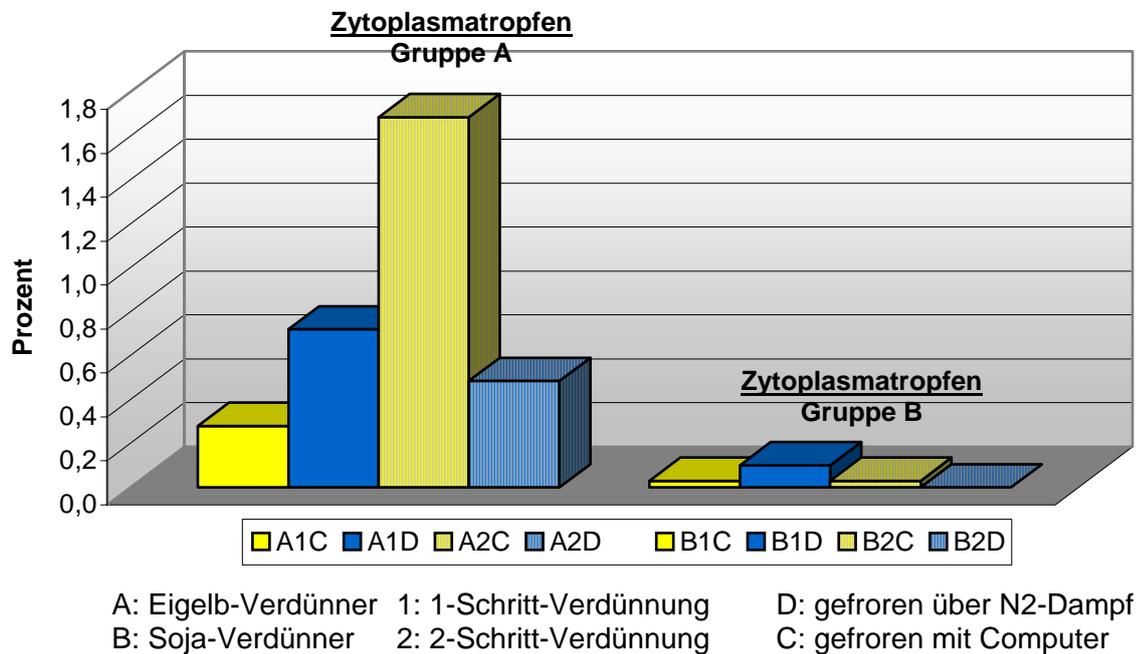


Abb. 13: Vergleichende Darstellung des prozentualen Anteils an Spermien mit Zytoplasmatrophen in allen Versuchsansätzen

In den Abbildungen 11, 12 und 13 zeigen sich deutliche Unterschiede der Parameter zwischen den Versuchsgruppen A und B; sie sind jedoch nur teilweise signifikant.

Proben der mit Verdünner A kombinierten Versuchsansätze wiesen sowohl in den Kategorien primäre und sekundäre Anomalien wie auch in der Kategorie Zytoplasmotropfen insgesamt höhere prozentuale Anteile auf. Den größten prozentualen Anteil an primär missgebildeten Spermien zeigte die Versuchsreihe A2C mit einem durchschnittlichen Wert von $0,4 \% \pm 0,6\%$. Die niedrigsten Durchschnittswerte dieser Kategorie fielen den Versuchsansätzen B2C und B2D mit jeweils $0,0\% \pm 0,1\%$ zu. Der Versuchsansatz A2C zeigte gegenüber der Methode B2D einen signifikant höheren Anteil an primären Anomalien ($p < 0,05$). Den größten Anteil an sekundär missgebildeten Spermien wies die Versuchsreihe A1C mit einem durchschnittlichen Wert von $9,0\% \pm 5,1\%$ auf. In der Versuchsmethode B2C betrug der prozentuale Anteil sekundär missgebildeter Spermien durchschnittlich $2,5\% \pm 1,5\%$ und gab den insgesamt niedrigsten Wert vor. In dieser Kategorie zeigte sich eine deutliche Signifikanz der Methoden A1C und A1D gegenüber allen übrigen Versuchsansätzen ($p < 0,05$).

Den größten prozentualen Anteil an Spermien mit Zytoplasmotropfen zeigte die Versuchsreihe A2C mit einem Wert von $1,7\% \pm 2,4\%$. In der Versuchsgruppe B waren mit Ausnahme der Methode B1D im Durchschnitt $0,0\%$ Spermien mit Zytoplasmotropfen nachzuweisen.

5 DISKUSSION

Mit der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene bei der Tiefkühlkonservierung von Bullenspermien etablierte Verfahren vergleichend auf ihre Anwendbarkeit beim Schafbock überprüft werden. Es wurden ein eidotterhaltiges Medium (OviPro[®], Minitüb, Tiefenbach, Germany) und ein Verdünner auf Sojabohnen-Lecithin-Basis (AndroMed[®], Minitüb, Tiefenbach, Germany) sowie zwei verschiedene Abkühl- und Einfrierverfahren getestet.

Die Samenwerte der für diese Untersuchungen selektierten Böcke lagen sämtlich im physiologischen Bereich. Da nur zwei von 22 Ejakulaten die vorgegebenen Mindestgrenzen nicht erfüllten, kann man davon ausgehen, dass es sich hier um geschlechtsgesunde Böcke handelte. Darauf weisen auch die Ergebnisse der Chromatin-Strukturanalyse hin. Die getesteten Ejakulate wiesen insgesamt nur einen niedrigen Anteil an denaturierter DNA auf ($\leq 8,6\%$). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung ergaben keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den Ejakulaten der 4 Schafböcke. Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen der Spermienchromatinstruktur und anderen Spermienqualitätsparametern erbrachten unterschiedliche Resultate. KENNEY et al. (1995) konnten bei Ejakulaten von Hengsten einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der DNA-Denaturierung und der Spermienmotilität und Morphologie feststellen. DIGRASSI (2000) beobachtete ebenfalls an Hengstspermien eine positive Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an toten Spermien und dem Auftreten geschädigter Chromatinstruktur, fand aber keinen Einfluss der SCSATM-Ergebnisse auf die Motilität und Morphologie der Spermien. In einer Studie an Schafspermien war ein Zusammenhang zwischen Spermienchromatinstruktur und den klassischen Spermienqualitätsparametern zu erkennen (PERIS et al., 2004). Der SCSATM-Test kann als eine gute zusätzliche Information über die Qualität der verwendeten Samenproben herangezogen werden.

In diesen Untersuchungen konnte das Befruchtungsvermögen der TG-Samenproben nicht bestimmt werden. Ebenso lagen keine Informationen über das Befruchtungsvermögen des Schafböcke vor. Verschiedene Studien an Samenproben von Bullen (BALLACHEY et al., 1987 und 1988), Hengsten (KENNEY et al., 1995;

EVENSON et al., 1995; DIGRASSI, 2000) und Ebern (EVENSON et al., 1994) zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen den Fertilitätsdaten der Tiere und den Ergebnissen des SCSATM-Tests der untersuchten Ejakulate. SAACKE et al. (1994) beschrieben die Spermienchromatinstruktur als nicht-kompensierbaren Faktor, während Mängel bei anderen Spermienqualitätsparametern durch Erhöhung der Besamungsdosis ausgeglichen werden könnten. Die vorliegenden Daten zur Qualität der verwendeten Ejakulate geben keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung des Befruchtungsvermögens dieser Böcke.

5.1 Effekte der Verdünner

Nach subjektiver lichtmikroskopischer Einschätzung war der prozentuale Anteil motiler Spermien in den mit Soja-Verdünner konservierten Proben statistisch absicherbar höher. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von GIL et al. (2000) und AIRES et al. (2003), die in vergleichbaren Studien mit Bullenspermien eine bessere Richtung und Intensität der Spermienbewegung beobachteten. MÜLLER-SCHLÖSSER et al. (1995) und THUN et al. (2002) ermittelten jeweils eine höhere Durchschnittsgeschwindigkeit und einen größeren Anteil linearmotiler Spermien bei Soja-verdünnten Proben. Auch GIL et al. (2003b) verglichen in einer Studie an Schafspermien einen Milch-Eidotter-Verdünner mit einem Soja-Lecithin-Verdünner und erhielten mit dem sojahaltigen Medium einen höheren Anteil motiler Spermien, jedoch war die Differenz der Ergebnisse statistisch nicht signifikant. Es wird angenommen, dass diese verbesserte Motilität der Spermien in einem eidotterfreien Medium mit der niedrigeren Viskosität in Zusammenhang steht. Zusätzlich können die im Eidotter enthaltenen Komponenten wie Lecithin, Phospholipide und Lipoproteinfraktionen einerseits die Bewegungsfähigkeit der Samenzellen durch Bildung von Agglutinationen einschränken und andererseits die mikroskopische Beurteilung erschweren.

In die Beurteilung der durchflusszytometrischen Messergebnisse des MMP konnten bei den mit sojahaltigem Verdünner konservierten Proben nur die Populationen mit hohem MMP, d. h. hoher Beweglichkeit, einbezogen werden, weil solche mit niedrigem MMP trotz der Kombinationsfärbung mit dem PI-Farbstoff (siehe 3.6.3 und 2.3.1) nicht eindeutig von toten Spermien unterschieden werden konnten. Ähnliches

beobachteten GARNER und THOMAS (1999) bei Untersuchungen an Bullenspermien mit einem eidotterhaltigen Verdünner, bei denen sich in Proben mit J-Aggregaten (hohes MMP) die roten PI-Populationen mit den JC-1-gefärbten Populationen im Verlauf der durchflusszytometrischen Messung aus bisher ungeklärten Gründen miteinander verbanden. Bei dem hier verwendeten Eigelb-Verdünner konnten Populationen mit niedrigem MMP besser differenziert werden. Trotzdem wurden ebenso nur der Anteil von Spermien mit hohem MMP ausgewertet, um die Ergebnisse mit denen der Soja-verdünnten Proben vergleichen zu können. Die Proben mit sojahaltigem Verdünner hatten im Gegensatz zu den mit eigelbhaltigem Medium behandelten Proben einen niedrigeren Anteil an Spermien mit hohem Potential. Der Widerspruch zu den mikroskopisch ermittelten Werten (höhere Motilität in mit Soja-verdünnten Proben) könnte damit erklärt werden, dass die oben beschriebene Akkumulation der gefärbten Populationen beim Soja-Verdünner stärker ausgeprägt ist als beim Eidotter-Verdünner. Dadurch wurde die Population von Spermien mit hohem MMP bei Soja-verdünnten Proben eventuell stärker dezimiert. Der Einfluss des Verdünners auf die Bestimmung des MMP-Potentials bedarf aber weiterer Untersuchungen.

Der prozentuale Anteil lebender Spermien war nach subjektiver lichtmikroskopischer Beurteilung in Eidotter-verdünnten Proben signifikant höher als in Soja-konservierten Ejakulaten. Gegenüber den unverdünnten Frischejakulaten (Mindestvitalität $\geq 80\%$; siehe 3.3) war die Vitalität beim Eigelb- und beim Soja-Verdünner nach der Kryokonservierung um mindestens 12% bzw. 23% reduziert. Die Ergebnisse dieser Studie stimmen mit der von WATSON (2000) angegebenen Überlebensrate von 50-60% für kryokonservierte Spermien überein. Die mikroskopisch ermittelten Werte stehen in positivem Zusammenhang mit den durchflusszytometrischen Ergebnissen der Plasmamembranintegrität. Die in Eidotter-Verdünner konservierten Proben wiesen, verglichen mit den Soja-konservierten Ejakulaten, einen signifikant höheren Anteil an Spermien mit erhaltener Plasmamembran auf. In einer Studie an Bullenspermien war ein eigelbhaltiger Verdünner den sojahaltigen Verdünnern in ihren kryoprotektorisches Eigenschaften überlegen (THUN et al., 2002). Die Autoren führten die stärkere Beeinträchtigung der Plasmamembran von Soja-konservierten Spermien auf eine verminderte osmotische Resistenz zurück. GIL et al. (2003b) fanden in einer Untersuchung mit Schafspermien für den Parameter

Plasmamembranintegrität bei Eidotter-verdünnten Ejakulaten ebenfalls höhere Werte als bei Soja-konservierten Spermien. Insgesamt scheint ein eidotterhaltiger Verdünner aufgrund seiner biochemischen Komponenten einen besseren Membranschutz zu bieten als ein sojahaltiges Medium (siehe 2.2.3).

Der akrosomale Status der Spermien nach der Kryokonservierung stellt einen wichtigen Parameter für das Befruchtungsvermögen solcher Samenproben dar. Die durchflusszytometrische Bestimmung des akrosomalen Status ergab für Soja-konservierte Spermien einen signifikant niedrigeren Anteil an Zellen mit geschädigtem Akrosom, als für Eigelb-konservierte. Laut GIL et al. (2003b), die in ihrer Studie zu vergleichbaren Ergebnissen kamen, gilt Eigelb trotz seiner einerseits membranstabilisierenden Funktionen gleichzeitig als kapazitationsfördernder Faktor. Sie stützten ihre Aussage auf Studien von WATSON und MARTIN (1973a und 1976), SMITH et al. (1979) und IJAZ et al. (1989), die eine positive Beziehung zwischen der Anwesenheit bzw. der Konzentration von Eidotter im Verdünner und dem Auftreten von Akrosomenschäden beobachten konnten. Andere Untersuchungen fanden bei einem Vergleich der Effekte eigelb- und sojahaltiger Verdünner auf Bullenspermien keine Unterschiede bezüglich des akrosomalen Status (AIRES et al., 2003). Allerdings ist in der Literatur mehrfach die aufgrund ihrer Membranbeschaffenheit erhöhte Empfindlichkeit von Schafbockspermien beschrieben worden (HEALY, 1969; WARNAWSKI, 1971; JONES, 1973, BAILEY et al., 2000).

In Proben, die mit dem Eidotter-Verdünner konserviert worden waren, lag nach lichtmikroskopischer Auszählung jeweils ein signifikant höherer prozentualer Anteil an Spermienanomalien der Kategorien primäre Anomalien, sekundäre Anomalien und Zytoplasmotropfen vor, als in den Soja-verdünnten Proben. Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass sich die gefärbten Ausstriche aufgrund der hohen Konsistenz der eidotterhaltigen Proben schwieriger auszuwerten waren. Da die spezifische Entstehung primärer Anomalien durch die Kryokonservierung kaum vorstellbar ist, könnte der höhere Anteil an primären Missbildungen auf Artefakte zurückzuführen sein, die durch die Interaktion der Eidotterpartikel mit den Komponenten der für die Mikroskopie verwendeten Fixationslösung entstanden sind (THUN et al., 2002). Die Induzierung sekundärer Anomalien (z.B. Schwanzverkrümmungen) kann hingegen sehr wohl während des

Konservierungsprozesses durch inadäquate Konservierungsmedien entstehen. Über die Einflüsse von Verdünnermedien auf das Auftreten von Zytoplasmotropfen liegen aber bisher keine Erkenntnisse vor.

5.2 Effekte des Verdünnungsprotokolls

Der Modus der Glycerin-Zugabe (1- oder 2-Schritt) hatte keinen signifikanten Einfluss auf den prozentualen Anteil motiler Spermien. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erkenntnissen von MATTOS (1982) sowie MORRIER et al. (2001) überein, die vergleichbare Studien an Schafspermien unternahmen. Andere Untersuchungen (BLACKSHAW, 1960; COLAS, 1975) sahen eine 2-Schritt-Verdünnung für Schafspermien als verträglicher an, weil die Spermien der Toxizität des Glycerins mit dieser Verdünnungsmethode über einen kürzeren Zeitraum ausgesetzt sind. Auch GIL et al. (2003a) zufolge ist die Glycerinzugabe durch einen 2. Verdünnungsschritt bei 5°C beim Schaf vorteilhafter. Die Widersprüchlichkeit der Erkenntnisse könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Empfindlichkeit der Spermien gegenüber der Glycerintoxizität eher durch andere Faktoren wie beispielsweise die Verdünnerkomposition beeinflusst wird, als durch die Dauer der Exposition.

Nach subjektiver lichtmikroskopischer Beurteilung war der durchschnittliche Anteil lebender Spermien in 1-Schritt-verdünnten Proben signifikant höher als in Ejakulaten, die nach 2-Schritt-Verdünnung konserviert wurden. Demgegenüber stehen Ergebnisse von MORRIER et al. (2001), die keine Einflüsse der Verdünnungsmethode auf die Vitalität beobachteten. BLACKSHAW (1960) und COLAS (1975) ermittelten zwar einen Unterschied bezüglich des Anteils lebender Spermien zwischen der 1-Schritt- und der 2-Schritt-Verdünnung, stellten letztere aber als die überlegene Methode heraus. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Kryobiologische Aspekte (siehe 2.2.) würden eher die Erkenntnisse von BLACKSHAW und COLAS unterstützen, denen zufolge die toxischen Eigenschaften des Glycerins bei längerer Exposition der Spermien zu erheblichen Zellschädigungen führen können. Andererseits könnten geeignete Verdünnermedien die schädigenden Wirkungen des Glycerins durch einen optimierten Membranschutz kompensieren.

Die durchflusszytometrischen Messergebnisse der Plasmamembranintegrität ergaben einen signifikanten, positiven Einfluss der 2-Schritt-Verdünnung. Diese Ergebnisse bestätigen Resultate einer analogen Studie von GIL et al. (2003a), in der sich die 2-Schritt-Verdünnung als verträglicher für Schaf spermien erwies, als die 1-Schritt-Methode. Die Autoren erklärten dies mit der kapazitationsfördernden Wirkung des Glycerins und dem toxischen Effekt auf den Metabolismus der Spermien.

Die durchflusszytometrische Bestimmung des akrosomalen Status ergab für 1-Schritt-verdünnte Spermien einen signifikant geringeren Anteil an Zellen mit geschädigtem Akrosom, als für Proben, die der 2-Schritt-Verdünnung unterzogen wurden. Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Erkenntnissen von GIL et al. (2003a), die bei Ejakulaten, die nach 2-Schritt-Verdünnung konserviert wurden, weniger akrosomale Schädigungen beobachteten. Sie führten dies darauf zurück, dass die Spermien bei dieser Verdünnungsmethode den toxischen Wirkungen des Glycerins nicht so lange ausgesetzt sind wie bei einer 1-Schritt-Verdünnung. Warum in der vorliegenden Arbeit gegenteilige Ergebnisse erzielt wurden, kann nicht abschließend erklärt werden. Möglich wäre zum Beispiel, dass bei den Manipulationen im Rahmen der zweiten Verdünnung Temperaturschwankungen in den Proben auftreten, die sich negativ auf die akrosomale Integrität auswirkten.

In Proben, die nach der 1-Schritt-Verdünnung konserviert wurden, ergab sich bei der lichtmikroskopischen Auszählung ein signifikant höherer prozentualer Anteil an sekundären Anomalien, als in den sequentiell verdünnten Proben. Ursächlich für das vermehrte Auftreten sekundärer Anomalien bei den Spermien, die nach 1-Schritt-Verdünnung konserviert wurden, könnte eine Reaktion der Spermienmembranen auf die toxische Wirkung des Glycerins sein.

5.3 Effekte der Einfriermethode

Die Einfriermethode (N_2 -Dampf oder Tiefgefriercomputer) zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den prozentualen Anteil motiler Spermien. Insgesamt war die Motilität bei allen untersuchten Ejakulaten im Durchschnitt um mindestens 32% gegenüber den unverdünnten Frischejakulaten (siehe. 3.3) reduziert. Die Ergebnisse stimmen

mit Beobachtungen von PONTBRIAND et al. (1989) überein, nach denen Schaf spermien eine große Toleranz gegenüber unterschiedlichen Kühlraten aufweisen. Die lichtmikroskopische Auszählung zeigte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss der Einfrier methode auf die Vitalität der Spermien.

Lineare Kühlraten, wie sie mit computergesteuerten Geräten erzielt werden können, (z.B. 30°C/min), gelten als vorteilhaft für das Überleben von Schaf spermien (siehe 2.2.4). Die vorliegenden Ergebnisse ergaben keinen signifikanten Einfluss der unterschiedlichen Gefrier methoden. Entweder konnte auch durch die manuell erzeugte Gefrier rate eine für Schaf spermien verträgliche Kühlgeschwindigkeit erreicht werden oder die Defizite einer Methode wurden durch die weite Kryotoleranz der Spermien ausgeglichen. KUMAR et al. (2003) erzielten mit der oben genannten Kühlrate stets bessere Werte für die Vitalität als für die Motilität. Dieses Ergebnis konnte auch in den eigenen Untersuchungen verifiziert werden.

Die mikroskopisch ermittelten Befunde bezüglich der Vitalität stimmten nicht mit den durchflusszytometrischen Messergebnissen der Plasmamembranintegrität überein. Die manuell konservierten Proben zeigten verglichen mit den computerkonservierten Ejakulaten einen signifikant höheren Anteil an Spermien mit intakter Plasmamembran. Demgegenüber stehen Erkenntnisse, die einen maschinellen Einfrierprozess aufgrund der konstanten Gefrieraten als vorteilhafter für Schaf spermien beurteilten (ANEL et al., 2003; KUMAR et al., 2003). Andere Autoren wiederum sahen keine signifikanten Unterschiede zwischen der N₂-Dampf-Methode und der Computermethode (PONTBRIAND et al., 1989; JANUSKAUSKAS et al., 1999).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung des akrosomalen Status ergaben keinen signifikanten Einfluss der Einfrier methode auf diesen Parameter. Dies stimmt überein mit Ergebnissen von PONTBRIAND et al. (1989). Auch in Untersuchungen beim Bullen wurde kein signifikanter Einfluss auf diesen Parameter durch die Gefrier methode gefunden (JANUSKAUSKAS et al., 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen also nicht die in der Literatur oft beschriebene Überlegenheit der Gefriercomputer gegenüber den manuellen Einfrier methoden.

Auch das Auftreten primärer und sekundärer Anomalien wurde nicht signifikant durch die Einfrieremethode beeinflusst. Der Anteil an Zytoplasmatropfen war hingegen bei den manuell konservierten Proben signifikant niedriger, als in maschinell eingefrorenen Ejakulaten. Dieser Parameter ist jedoch erfahrungsgemäß sehr von den spezifischen Bedingungen abhängig.

5.4 Interaktionen von Verdünner, Verdünnungsprotokoll und Einfrieremethode

Durch die Kombination der zuvor besprochenen Versuchsvariablen sollte anhand der vorliegenden Versuchsergebnisse die für Schafspemien geeignetste Konservierungsmethode ermittelt werden. Tabelle 5.1 bietet eine Übersicht über die Eignung der durchgeführten Versuchsansätze im Hinblick auf die untersuchten Spermienqualitätsparameter. Die Versuchsansätze wurden gemäß der Versuchsergebnisse in einer Rangfolge dargestellt. Es ist angegeben, ob der Einfluss der entsprechenden Variablen auf die Parameter eine Signifikanz zeigte.

Tab. 5.1 Übersicht über die Eignung der Versuchsansätze im Hinblick auf die untersuchten Spermienqualitätsparameter

Parameter	Eignung Versuchsansätze (Rangfolge)								Verdüner: Signifikanz	Verdünnungs- Protokoll: Signifikanz	Einfriermethode: Signifikanz
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.			
motile Spermien	B1C	B2C	A2C	A1C	B2D	B1D	A1D	A2D	ja	nein	nein
MMP	A1C	A1D	A2D	A2C	B1C	B1D	B2C	B2D	ja	nein	nein
lebende Spermien	A1C	A1D	A2D	A2C	B1C	B1D	B2C	B2D	ja	ja	nein
Plasmamembran intakt	A2D	A2C	A1D	A1C	B2D	B2C	B1D	B1C	ja	nein	ja
Akrosom geschädigt	B1C	A1C	B1D	A1D	B2C	B2D	A2C	A2D	ja	ja	nein
sekundäre Anomalien	B2C	B2D	A2D	A2C	B1D	B1C	A1D	A1C	ja	ja	nein

A: Eidotter-Verdüner
B: Soja-Verdüner

1: 1-Schritt-Verdünnung
2: 2-Schritt-Verdünnung

C: Computer-Protokoll
D: N₂-Dampf-Protokoll

Für den Parameter Motilität erzielten die Versuchsansätze der Versuchsgruppe B (Soja-Verdünner) zum Teil bessere Ergebnisse als die der Vergleichsgruppe A (Eidotter). Der Vorteil des Soja-Verdünners liegt vermutlich in seiner niedrigeren Viskosität begründet (siehe 5.1.1). Obwohl der Einfluss des Verdünners beim Vergleich der Methoden statistisch signifikant war, war bei anderen Parametern die Überlegenheit des Soja-Verdünners nicht zu beobachten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Einschätzung der Motilität subjektiv erfolgte und durch die Beschaffenheit der Probenpräparate beeinflusst wurde. Die Tendenz zu besseren Motilitätswerten mit dem maschinell durchgeführten Konservierungsverfahren entspricht der in der Literatur diskutierten Überlegenheit der computergestützten Spermienkonservierung (siehe 2.2.4). Die Anwendung einer 1-Schritt- oder 2-Schritt-Verdünnung hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Motilität der Spermien.

Bezüglich des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) zeigten die Versuchsergebnisse eine Überlegenheit der mit Eidotter kombinierten Versuchsmethoden gegenüber der Vergleichsgruppe Soja. Der signifikante Einfluss des Verdünnermediums bei diesem Parameter bedarf aber einer weiteren Abklärung.

Der prozentuale Anteil vitaler Spermien war bei mit Eidotter-Verdünner kombinierten Versuchsansätzen stets signifikant größer als bei der Vergleichsgruppe. Dies könnte mit den besseren kryoprotektiven Eigenschaften des Eidotters zusammenhängen (THUN et al., 2002). Entgegen früherer Erkenntnisse (BLACKSHAW, 1960 und COLAS, 1975) waren innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe die 1-Schritt-Verdünnungs-Methoden statistisch absicherbar überlegen. Möglicherweise wird die Toleranz der Spermien gegenüber den schädigenden Einflüssen des Glycerins bei längerer Exposition durch den guten Membranschutz des Eidotters positiv beeinflusst. Obwohl statistisch nicht signifikant, waren die maschinell eingefrorenen Versuchsansätze in Kombination mit der 1-Schritt-Verdünnung in beiden Versuchsgruppen gegenüber den manuellen Methoden überlegen.

Die Plasmamembranintegrität war im Verdünner mit Eidotter signifikant besser erhalten als mit Sojaverdünner. Die Anwendung der 1-Schritt- oder 2-Schritt-Verdünnung ergab tendenziell bessere Werte für die Methode mit Nachverdünnung

bei 5 Grad Celsius. Der bessere Membranschutz des Eidotter-Verdünners kombiniert mit der vergleichsweise kurzen Expositionsdauer der Spermien gegenüber den toxischen Eigenschaften des Glycerins bei der 2-Schritt-Verdünnung könnten dafür verantwortlich sein. Die manuell über Stickstoffdampf (N₂-Dampf) konservierten Versuchsansätze erzielten signifikant bessere Resultate innerhalb der Versuchsgruppen A und B. Offensichtlich sind die Reaktionen der Schafspermien auf die Einfriergeschwindigkeiten von den Einflussfaktoren Verdünner und Verdünnungsmethode abhängig.

Die Untersuchung des akrosomalen Status der Spermien ergab nur zum Teil eine Dominanz des Soja-Verdünners gegenüber dem eidotterhaltigen Medium, obwohl der Einfluss der Variablen statistisch als signifikant beurteilt wurde. Eine eindeutige Begründung für diese Erkenntnis kann ohne weitere Nachforschungen nicht gegeben werden. Eventuell wurden die in 5.1.4 beschriebenen Nachteile des Eidotters durch die Kombination der Versuchsvariablen in gewissem Maße kompensiert. Entgegen den Erkenntnissen vergleichbarer Studien (siehe 5.2.4) zeigten Versuchsansätze mit 1-Schritt-Verdünnung gegenüber den 2-Schritt-verdünnten Methoden eine signifikante Überlegenheit. Es besteht wiederum die Möglichkeit, dass die Toleranz der Spermienakrosomen gegenüber schädigenden Einflüssen durch die verwendeten Verdünner positiv beeinflusst wurde. Bei 1-Schritt-verdünnten Versuchsvarianten waren die computergestützten Konservierungsprotokolle überlegen, wenn auch nicht signifikant. Wahrscheinlich sind die in der Literatur beschriebenen Vorzüge des maschinellen Einfrierens (siehe 2.2.4) für das Zustandekommen der vorliegenden Ergebnisse verantwortlich.

Die morphologischen Parameter „primäre Anomalien“ und „Zytoplasmotropfen“ spielen für die Beurteilung der Versuchsansätze vermutlich eine untergeordnete Rolle, da sie von der grundsätzlichen Qualität des Spermas abhängig sind. Bezüglich des Auftretens sekundärer Anomalien war teilweise ein signifikanter Einfluss der getesteten Verdünner zu erkennen. Die Überlegenheit der 2-Schritt-Verdünnung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Spermien den toxischen Eigenschaften des Glycerins nur für relativ kurze Zeit ausgesetzt waren, so dass weniger schädigende Reaktionen der Membranen eintreten konnten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die Tiefgefrierkonservierung von Schaf spermien offenbar ein breites Spektrum von Einfriermethoden zur Verfügung steht. Dabei ist der Verwendung von Eidotter-basierten Verdünnern wegen seiner besseren kryoprotektiven Eigenschaften der Vorzug zu geben. Die nachteiligen Auswirkungen der vergleichsweise hohen Konsistenz des eidotterhaltigen Mediums auf die Motilität der Spermien sind eventuell ein reiner in vitro Effekt, der keine Rückschlüsse auf die Situation in vivo zulässt. Andererseits kann der sojahlaltige Verdünner im Hinblick auf hygienische Aspekte und Standardisierbarkeit (BOUSSEAU et al., 1998) als akzeptable Alternative angesehen werden. Die 1-Schritt-Verdünnung sollte wegen ihrer geringeren Fehleranfälligkeit empfohlen werden. Die computergestützte Variante hatte in diesen Untersuchungen zwar keinen signifikanten Einfluss, ihre Reproduzierbarkeit spricht aber für deren Anwendung. Die Anwendung einer bestimmten Methodik zur Kryokonservierung kann also nach den Bedingungen des Labors ausgewählt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene bei der Tiefkühlkonservierung von Bullenspermien etablierte Verfahren vergleichend auf ihre Anwendbarkeit für Schaf spermien zu überprüfen.

Für die Untersuchungen wurden von 4 Schafböcken jeweils 5 qualitativ gleichwertige Samenproben herangezogen. Die Ejakulate wurden in 4 Teilproben unterteilt, je zwei für jede Versuchsreihe. Die Proben der ersten Versuchsreihe wurden entweder durch eine 1-Schritt-Verdünnung oder durch eine 2-Schritt-Verdünnung mit einem eidotterhaltigen Medium (OviPro[®], Minitüb, Tiefenbach, Germany) verdünnt. Die Proben der zweiten Versuchsreihe erfuhren die gleiche Behandlung mit einem Medium auf Sojabohnen-Lecithin-Basis (AndroMed[®], Minitüb, Tiefenbach, Germany). Die verdünnten Ejakulate wurden in Pailletten (Volumen 0,5 ml) abgefüllt und diese z. T. manuell über Stickstoffdampf (N₂-Dampf) und der andere Teil mithilfe eines Gefriercomputers (Icecube, Minitüb, Germany) eingefroren. Dadurch entstanden 8 Versuchsansätze für jedes Ejakulat. Anschließend wurden die gefrorenen Pailletten in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen der kryokonservierten Ejakulate erfolgte im Wasserbad bei 37°C in 30 Sekunden. Als Spermienqualitätsparameter wurden bei allen Proben unmittelbar nach dem Auftauen Motilität, Vitalität und Morphologie (primäre und sekundäre Anomalien, Zytoplasmatropfen) subjektiv mit dem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Zusätzlich wurden das Mitochondrienmembranpotential (MMP), die Plasmamembranintegrität und der akrosomale Status nach objektiver Messung im Durchflusszytometer (FACScan[™], Fa. Becton Dickinson) beurteilt. Es wurde der Einfluss der Einzelfaktoren Verdünner, Verdünnungsmethode und Einfrierprotokoll sowie deren Kombinationen auf den jeweiligen Parameter bestimmt.

Mit dem Eigelb-Verdünner wurden bei den Parametern Motilität, Vitalität und Plasmamembranintegrität signifikant bessere Ergebnisse erzielt als mit dem Soja-Verdünner. Demgegenüber wiesen Soja-verdünnte Proben signifikant weniger Anomalien und eine signifikant bessere Akrosomenintegrität auf. Auch das Mitochondrienmembranpotential zeigte bei diesen Proben signifikant höhere Werte. Die 1-Schritt-Verdünnung erbrachte verglichen mit den 2-Schritt-verdünnten Proben

einen höheren prozentualen Anteil an motilen und vitalen Spermien. Auch das MMP zeigte hier höhere Werte. Die Plasmamembran hingegen war in den 2-Schritt-verdünnten Ejakulaten bei einem größeren prozentualen Anteil an Spermien erhalten. Auch traten hier weniger sekundäre Anomalien und Zytoplasmotropfen auf. Primäre Anomalien konnten bei beiden Verdünnungsvarianten ungefähr zu gleichen Anteilen beobachtet werden. Der akrosomale Status ergab für Proben der 2-Schritt-Verdünnung bessere Werte. Signifikanzen zeigten sich bezüglich der Parameter Vitalität, Plasmamembranintegrität, sekundäre Anomalien und akrosomaler Status.

Die maschinelle Einfrieremethode ergab für die Parameter Motilität, MMP, Vitalität und akrosomaler Status bessere Ergebnisse als das manuelle N₂-Dampf-Verfahren. Lediglich die Beurteilung der Morphologie und der Plasmamembranintegrität erzielte für die manuell eingefrorenen Proben signifikant günstigere Werte.

Bei der Bewertung der kombinierten Versuchsansätze erwies sich keine der 8 getesteten Methoden als eindeutig überlegen für die Kryokonservierung von Schafspermien. Die Verwendung von Eidotter-Verdüner ist grundsätzlich als empfehlenswert anzusehen, obgleich der Soja-Verdüner als akzeptable Alternative betrachtet werden kann. Die 1-Schritt-Verdünnung erwies sich im vorliegenden Versuch als einfache Methode mit weitgehend guten Ergebnissen. Die Resultate der computergestützten Einfrierverfahren ließen eine tendenzielle Überlegenheit gegenüber den manuellen Methoden beobachten. Die Kryokonservierung kann dabei den Bedingungen des jeweiligen Labors und den verschiedenen technischen Möglichkeiten angepasst werden.

7 SUMMARY

An examination of cryopreservation of ram spermatozoa with special consideration on the effect of extender, dilution protocol and freezing method on sperm quality parameters

The aim of the present work was to compare different cryopreservation protocols already established for bull semen for their applicability in ram spermatozoa.

For the examination 5 ejaculates of equivalent quality each of 4 rams were used. The samples were split in 4 equal portions to process two test series with each 2 aliquots. In the first series the samples were diluted either with a 1-step- or a 2-step-dilution with an extender containing egg yolk (OviPro[®], Minitüb, Tiefenbach, Germany). The extended ejaculates were filled into straws (volume 0,5 ml) and were frozen either manually above liquid nitrogen (LN₂) or by using a programmable LN₂ freezing unit (Icecube, Minitüb, Germany). Hence 8 experiments for each ejaculate were implemented. Afterwards the frozen straws were plunged into LN₂. The cryopreserved samples were thawed at 37°C for 30 seconds in a water bath. Immediately after thawing the semen parameters motility, vitality and morphology (primary and secondary defects, distal droplets) were subjectively analysed by phase contrast microscopy. Additionally mitochondrial membrane potential (MMP), plasma membrane integrity and the acrosomal status were objectively measured by flow cytometry (FACScan[™], Fa. Becton Dickinson). The effect of the single factors (extender, dilution method, freezing protocol) on each parameter and their combinations were determined.

Significant better results were obtained for motility, vitality and plasma membrane integrity with the egg yolk extender. In contrast soybean-extended samples showed less morphological defects and a significant better acrosomal integrity. In addition the parameter mitochondrial membrane potential obtained higher values.

The 1-step-dilution obtained a higher percentage of motile and viable spermatozoa when compared with the 2-step procedure. However spermatozoa extended with the 2-step-dilution had higher percentage of intact plasma membrane. These samples showed also less secondary defects and distal droplets. The 2-step-dilution provided

better results for acrosomal integrity. Statistical significances were ascertained at the parameters vitality, plasma membrane integrity, secondary defects and acrosomal status.

The computer assisted freezing method yielded better results for the parameters motility, MMP, vitality and acrosomal status than the manual method. The assessment of morphology and plasma membrane integrity exhibited significant better values for the manual freezing protocol.

None of the 8 examined methods were definitely superior for the cryopreservation of ram spermatozoa. The use of an egg yolk-based extender is generally recommendable, although the soybean extender could be regarded as an acceptable alternative. In the present study the 1-step-dilution was proved to be a simple method with largely good results. The computerized freezing method provided slightly better results than the manual procedure. We conclude that the technique for cryopreservation of ram spermatozoa can be adjusted according to the equipment in the given laboratory.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ABDELHAKEM, A.A., E.F.GRAHAM, I.A.VASQUEZ und K.M.CHALONER (1991):
Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen.
Cryobiology **28**, 43-49

ABOU-HAILA, A und D.R.P.TULSIANI (2000):
Mammalian sperm acrosome: formation contents and function.
Arch. Biochem. Biophys. **379**, 173-182

AEHNELT, E. (1953):
Prüfungsergebnisse neuer Verdünnungsflüssigkeiten für das Bullensperma.
Dtsch. tierärztl. Wschr. **60**, 52-55

AIRES, V.A., K.D. HINSCH, F. MUELLER-SCHLOESSER, K. BOGNER, S.
MUELLER-SCHLOESSER und E. HINSCH (2003):
In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based
extenders for cryopreservation of bovine semen.
Theriogenology **60**, 269-279

AMANN, R.P. und B.W. PICKETT (1987):
Principles of cryopreservation and a review of the cryopreservation of stallion
spermatozoa.
Equine Vet. Sci. **7**, 145-173

ANDERSEN, K, J. AAMDAL und J.A. FOUIGNER (1973):
Intra-uterine and deep cervical insemination with frozen semen in sheep.
Zuchthygiene **8**, 113-118

ANEL, L., P. DE PAZ, M. ALVAREZ, C.A. CHAMORRO, J.C. BOIXO, A. MANSO, M.
KAABI und E. ANEL (2003):
Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen.
Theriogenology **60** (7), 1293-1308

BAG, S., A. JOSHI, S.M. NAQVI, P.S. RAWAT und J.P. MITTAL (2002):
Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on
the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa.
Anim. Reprod. Sci. **72**, 175-183

BAILEY, J.L., J.F. BILODEAU und N. CORMIER (2000):
Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating
phenomenon.
J. Androl **21**, 1-6

BALLACHEY, B.E., W.D. HOHENBOKEN und D.P. EVENSON (1986):
Sperm head morphology and nuclear chromatin structure evaluated by flow
cytometry in a diallel cross in mice.
Can. J. Genet. Cytol. **28**, 954-966

- BALLACHEY, B.E., W.D. HOHENBOKEN und D.P. EVENSON (1987):
Heterogeneity of sperm nuclear chromatinstructure and its relationship to fertility of bulls.
Biol. Reprod. **36**, 915-925
- BALLACHEY, B.E., R.G. SAACKE und D.P. EVENSON (1988):
The sperm chromatin structure assay: Relationship with alternate tests of sperm quality and heterospermic performance of bulls.
J. Androl. **9**, 109-115
- BEISKER, W. (1994):
A new combined integral-light and slit-scan data analysis system (DAS) for flow cytometry.
Computer Methods and Programs in Biomedicin **42**, 15-26
- BERNDTSON, W.E. und R.H. FOOTE (1972):
The freezability of spermatozoa after minimal prefreezing exposure to glycerol or lactose.
Cryobiology **9**, 57-60
- BLACKSHAW, A.W. (1954):
The prevention of temperature shock of bull and ram spermatozoa.
Aust. J. Biol. Sci. **7**, 573-582
- BLACKSHAW, A.W. (1960):
The effects of milk diluents on the viability of ram spermatozoa and their revival after freezing.
Aust. Vet. J. **36**, 432-435
- BLOTTNER, E.L., I. WEGENER, H. ROELANTS und K. JEWGENOW (1998):
Durchflusszytometrische Bestimmung des akrosomalen Status von Bullen- und Hengstspemien nach Markierung mit FITC-konjugiertem PNA.
Tierärztliche Umschau **53**, 441-447
- BOUSSEAU S., J.P: BRILLARD, B. MARQUANT-LE GUIENNE, B. GUERIN, A. CAMUS und M. LECHAT (1998):
Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. Theriogenology **50**, 699-706
- BUCKINGHAM, J.H und L.A. STAEHLIN (1969):
The effect of glycerol on the structure of lecithin membranes; a study by freeze-etching and X-ray diffraction.
J. Microsc. **90**, 83-106
- BWANGA, C.O. (1991):
Cryopreservation of boar semen: A literature-review.
Acta Vet. Scand. **32**, 431-453

- BYRNE, G.P., P. LONERGAN, M. WADE, P. DUFFY, A. DONOVAN, J.P. HANRAHAN und M.P. BOLAND (2000):
Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro.
Anim. Reprod. Sci. **62**, 265-275
- CHENG, F.P., A. FAZELLI, W.F. VOORHOUT, A. MARKS, M.M. BEVERS und B. COLLENBRANDER (1996):
Use of PNA to assess the acrosomal status and zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa.
J. Androl. **17**, 674-682
- CHOONG, C.H. und R.G. WALES (1962):
The effect of cold shock on spermatozoa.
Aust. J. Biol. Sci. **15**, 543-551
- CHOONG, C.H. und R.G. WALES (1963):
The use of various diluents for deep freezing bull spermatozoa.
Aust. J. Biol. Sci. **16**, 896-904
- COLAS, G (1975):
Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and freezing ability of deepfrozen ram semen.
J. Reprod. Fertil. **42**, 277-285
- COLAS, G (1981):
A new method for thawing frozen semen.
Theriogenology **16**, 623-630
- COOPER, T.G. und C.-H. YEUNG (1998):
A flow cytometric technique using Peanut Agglutinin for evaluating acrosomal loss from human spermatozoa.
J. Androl **19**, 542-550
- COSSARIZZA, A., M. BACCARANI-CONTRI, G. KALASHNIKOVA und C. FRANCESCHI (1996):
A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5, 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1).
Biochem. Biophys. Res. Comm. **197**, 40-45
- CURRY, M.R., J.D. MILLAR und P.F. WATSON (1994):
Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations.
Biol. Reprod. **51**, 1014-1021
- D'ALESSANDRO, A.G. und G. MARTEMUCCI (2003):
Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese rams.
Anim. Reprod. Sci. **79**, 93-102

DARZYNKIEWICZ, Z., F. TRAGANOS, T. SHARPLESS und M. MELAMED (1975):
Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and
automated cytofluorometry.
Exptl. Cell. Res. **90**, 411-428

DE LAMARINDE, E., A. HARAKAT und C. GAGNON (1998):
Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by
NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion.
J. Androl. **19**, 215-225

DIGRASSIE, W.A (2000):
Evaluation of stallion frozen-thawed semen using conventional and flow cytometric
assays.
Vet. Med. Diss., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg

ERICSSON, S.A., D.L. GARNER, C.A. THOMAS, T.W. DOWNING und C.E.
MARSHALL (1993):
Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical
semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa.
Theriogenology **39**, 1009-1024

EVANS, G. (1991):
Application of reproductive technology to the australien livestock industries.
Reprod. Fert. Dev. **3**, 627-650

EVANS, G. und W.M.C. MAXWELL (1987):
Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goats.
Butterworth, Sydney, 194

EVENSON, D.L. und L. JOST (2000):
Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.
Methods in cell Science **0-0**, 1-20

EVENSON, D.L., Z. DARZYNKIEWICZ und M. MELAMED (1980):
Comparison of human and mouse sperm chromatin structure by flow cytometry.
Chromosoma **78**, 225-238

EVENSON, D.P., L.K. JOST, R.K. BAER, TW. TURNER und S.M. SCHARDER
(1991):
Individuality of DNA denaturation pattern in human sperm as measured by sperm
chromatin structure assay
Reprod. Toxicol. **5**, 115-125

EVENSON, D.P., L. THOMSON und L.K. JOST (1994):
Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as
related to cryopreservation and fertility.
Theriogenology **41**, 637-651

- EVENSON, D.P., B.L. SAILER und L.K. JOST (1995):
Relationship between stallion sperm deoxyribonucleic acid (DNA) susceptibility to denaturation in situ and presence of DNA strand breaks: Implications for fertility and embryo viability
Biol. Reprod. Mono **1**, 655-659
- FAHY G.M. (1986):
The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology.
Cryobiology **23**, 1-13
- FIRST, N.L, H.A. HENNEMANN, W.T. MAGEE und J.A. WILLIAMS (1961):
The frozen storage of ram semen.
J. Anim. Sci. **20**, 74-78
- FISER, P. S. und R.W. FAIRFULL (1984):
The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws.
Cryobiology **21**, 542-551
- FISER, P.S. und R.W. FAIRFULL (1986a):
Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa.
Theriogenology **25**, 473-484
- FISER, P.S. und R.W. FAIRFULL (1986b):
The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing.
Cryobiology **23**, 518-524
- FISER, P.S., R.W. FAIRFULL und G.J. MARCUS (1986):
The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws.
Cryobiology **23**, 141-149
- FOULKES, J.A. (1977):
The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa.
J. Reprod. Fert. **49**, 277-284
- GADELLA, B.M., R. RATHI, J.F. BROUWERS, T.A. STOUT und B. COLENBRANDER (2001):
Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm.
Anim. Reprod. Sci. **68**, 249-265
- GAO, D., P. MAZUR und J.K. CRITSER (1997):
Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa.
Academic Press 1997, 263-327

- GARNER, D.L. und C.A.T HOMAS (1999):
Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm.
Mol. Reprod. Dev. **53**, 222-229
- GARNER, D.L., L.A. JOHNSON, S.T. YUE, B.L.ROTH und R.P. HAUGLAND (1994):
Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide.
J. Androl. **15**, 620-629
- GARNER, D. L., C.A. THOMAS und C.G. GRAVANCE (1999):
The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa.
Reprod. Dom. Anim. **34**, 399-404
- GARNER, D.L., C.A. THOMAS, H.W. JOERG, J.M. DEJARNETTE und C.E. MARSHALL (1997):
Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.
Biol. Reprod. **57**, 1401-1406
- GIL, J., L. SODERQUIST und H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (1999):
Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen.
Theriogenology **54**, 93-108
- GIL, J., L. SODERQUIST und H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (2000):
Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen.
Theriogenology **54**, 93-108
- GIL, J., A. JANUSKAUSKAS, M.C. HAARD, M.G. HAARD und L. SÖDERQUIST (2001):
Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos[®]-Plus and Triladyl[®].
Reprod. Dom. Anim. **35**, 69-77
- GIL, J., N. LUNDEHEIM, L. SODERQUIST und H. RODRIIUEZ-MARTINEZ (2003a):
Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen.
Theriogenology **59**, 1241-1255
- GIL, J., M. RODRIGUEZ-IRAZOQUI, N. LUNDEHEIM, L. SODERQUIST und H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (2003b):
Fertility of ram semen frozen in Bioexcell[®] and used for cervical artificial insemination. Theriogenology **59**, 1157-1170
- GRAHAM, E.F., B.G. CRABO und M.M. PACE (1978):
Current status for semen preservation in the ram, boar and stallion.
J. Anim. Sci. **47**, 80-119

- GRAHAM, J.K., E. KUNZE und R.H. HAMMERSTEDT (1990):
Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry.
Biol. Reprod. **43**, 55-64
- GROGAN, W. und J. COLLINS (1990):
Guide to flow cytometry methods.
Marcel Dekker, Inc., New York
- HAMMERSTEDT, R. H., A.D. KEITH, W. SNIPES, R.P. AMANN, D. ARRUDA und L.C. GRIEL (1978):
Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolarity on sperm.
Biol. Reprod. **18**, 686-696
- HAMMERSTEDT, R.H. und J.K. GRAHAM (1992):
Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol.
Cryobiology **29**, 26-38
- HAMMERSTEDT, R.H., J.K. GRAHAM und J.O. NOLAN (1990):
Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive.
J. Androl **11**, 73-88
- HARESIGN, W (1992):
Manipulation of reproduction in sheep.
J. Reprod. Fert. **45**, 127-139
- HARRISON, R.A.P. und S.E. VICKERS (1990):
Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa.
J. Reprod. Fertil. **88**, 343-352
- HEALY, P. (1969):
Effects of freezing on the ultra structure of the spermatozoon of some domestic animals.
J. Reprod. Fert. **18**, 21-27
- HEROLD, F.C., J.E. AURICH und D. GERBER (2003):
Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed[®] and with Triladyl[®] but the addition of bovine seminal plasma is detrimental.
Theriogenology **61**, 715-724
- HINSCH, E., K.D. HINSCH, J.G. BOEHM, W.B. SCHILL und F. MÜLLER-SCHLÖSSER (1997):
Functional parameters and fertilisation success of bovine semen cryopreserved in egg yolk free and egg yolk containing extenders.
Reprod. Dom. Anim. **32**, 143-149
- HOLT, W.V. (2000):
Basic aspects of frozen storage of ram semen.
Anim. Reprod. Sci. **62**, 3-22

- HOLT, W.V. (2000):
Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences.
Theriogenology **53**, 47-58
- HOLT, W.V., M.F. HEAD und R.D. NORTH (1988):
Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope.
J. Exp. Zool. **246**, 305-314
- HOLT, W.V., M.F. HEAD und R.D. NORTH (1992):
Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy.
Biol. Reprod. **46**, 1086-1094
- IJAZ, A., A.G. HUNTER und E.F. GRAHAM (1989):
Identification of the capacitating agent for bovine sperm in egg yolk-TEST semen extender.
J. Dairy Sci. **72**, 2700-2706
- IPATOVA, O.M., N.N. PROZOROVSKAIA, T.I. TORKOHOVSKAIA, V.S. BARANOVA und D.A. GUSEVA (2004):
Biological effects of the soybean phospholipids.
Biomed. Khim. 2004, Sept.-Oct., **50**(5), 436-450
- JANUSKAUSKAS, A., J. GIL, L. SODERQUIST, M.G. HAARD, M.C. HAARD, A. JOHANNISSON und H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (1999):
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 **52**, 641-658
- JEYENDRAN, R.S. und E.F. GRAHAM (1980):
An evaluation of cryoprotective compounds on bovine spermatozoa.
Cryobiology **17**, 458-464
- JEYENDRAN, R.S., H.H. VAN DER VEN, B.G. GRABO, M. PEREZ-PELAEZ und L.J. ZANEFELD (1984):
Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.
J. Reprod. Fert. **70**, 219-225
- JONES, R.C. (1969):
Studies on the suitability of preparations of ewe and cow milk for storing ram spermatozoa.
Aust. J. Biol. Sci. **22**, 983-994
- JONES, R.C. (1973):
The plasma membrane of ram, boar and bull spermatozoa.
J. Reprod. Fert. **33**, 179-183

- KASYMOV, K.T (1984):
A progressive method of storing semen.
Ovtsevodstvo **7**, 17-18
- KENNEY, R.M., D.P. EVENSON, M.C. GARCIA und C.C. LOVE (1995):
Relationships between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate.
Biol. Reprod. Mono **1**, 647-653
- KRIENKE, M. (2003):
Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstsperma.
Vet. Med. Diss. München
- KUMAR, S., J.D. MILLAR und P.F. WATSON (2003):
The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines.
Cryobiology **46**, 246-253
- LANGLAIS, J. und K.D.A. ROBERTS (1985):
A molecular model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa.
Gamete Res. **12**, 183-224
- LAPWOOD, K.R., I.C.A. MARTIN und K.W. ENTWISTLE (1972):
The fertility of merino ewes artificially inseminated with semen diluted in solutions based on skim milk, glucose, or ribose.
Aust. J. Agric. Res. **23**, 457-466
- LECLERC, P., E. DE LAMARINDE und C. GAGNON (1997):
Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives.
Free Radic Biol. Med. **22**, 643-656
- LIGHTFOOD, R.J. und S. SALOMON (1969):
Freezing ram semen by the pellet method II. The effect of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration and duration of storage at 5°C prior to freezing on survival of spermatozoa.
Aust. J. Biol. Sci. **22a**, 1547-1560
- LIN, Y. und F.K.W. KAN (1996):
Regionalisation and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation.
Biol. Reprod. **55**, 1133-1146
- LOVE, C.C. und R.M. KENNEY (1998):
The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion.
Theriogenology **50**, 955-972

- LOVELOCK, J.E. und C. POLGE (1954):
The immobilisation of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol.
Biochem. J. **58**, 618-622
- MAGISTRINI, M., E. GUITTON, Y. LEVERN, J.CL. NICOLLE, M. VIDAMENT, D. KERBOEUF und E.PALMER (1997):
New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry.
Theriogenology **48**, 1229-1235
- MARTIN, I.C.A. (1966):
Diluents for the preservation of ram spermatozoa.
Aust. J. Biol. Sci. **19**, 645-653
- MATTOS, R.C. (1982):
Untersuchungen über den Einfluss verschiedener kryobiologischer Faktoren auf die Qualität von gefrorenem Schafesperma.
Vet. Med. Diss., Hannover
- MAXWELL, W.M., G.R. WELCH und L.A. JOHNSON (1996):
Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma.
Reprod. Fert. Dev. **8**, 1165-1178
- MAXWELL, W.M. und P.F. WATSON (1996):
Recent progress in the preservation of ram semen.
Anim. Reprod. Sci. **42**, 55-65
- MAXWELL, W.M. und L.A. JOHNSON (1997):
Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation.
Mol. Reprod. Dev. **46**, 408-418
- MAZUR, P. (1965):
Causes of injury of frozen and thawed cells.
Fed. Proc. **24**, 175-182
- MAZUR, P. (1970):
The freezing of biological systems.
Science **168**, 939-949
- MAZUR, P., S.P. LEIBO und E.H.Y. CHU (1972):
A two-factor hypothesis of freezing injury.
Exp. Cell. Res. **71**, 345-355
- MAZUR, P. (1985):
Freezing of living cells: mechanisms and implications.
Am. J. Physiol. **247**, C125-C142

- MAZUR, P. und K.W. COLE (1985):
Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes.
Cryobiology **22** (6), 509-536
- MAZUR, P. und N. RIGOPOULOS (1983):
Contributions of unfrozen fraction and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes: influence of warming rate.
Cryobiology **20** (3), 274-289
- McGANN, L.E. (1978):
Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents.
Cryobiology **15**, 382-390
- MEDEIROS, C.M.O., F. FORELL, A.T.D. OLIVEIRA und J.L. RODRIGUEZ (2002):
Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?
Theriogenology **57**, 327-344
- MERYMAN, H.T (1968):
Modified model for the mechanism of freezing injury in erythrocytes.
Nature **218**, 333-336
- MERYMAN, H.T (1971):
Osmotic stress as a mechanism of freezing injury.
Cryobiology **8**, 489-500
- MERYMAN, H.T, R.J. WILLIAMS und M. DOUGLAS (1977):
Freezing injury from "solution effects" and its prevention by natural or artificial cryoprotection.
Cryobiology **14**, 287-302
- MILOVANOV, V.K., V.A. VARNAVSKAJA und I.N. SHAJDULLIN (1985):
Medium for deep freezing of semen.
Zhivotnovodstvo **7**, 39-41
- MIYAZAKI, R., M. FUKUDA und H. TAKEUCHI (1990):
Flow cytometry to evaluate acrosome reacted sperm.
Arch. Androl. **25**, 243-251
- MOLINIA, F.C., G. EVANS, P.I. CASARES und W.M. MAXWELL (1994):
Effect of monosaccharides and disaccharides in TRIS-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa.
Anim. Reprod. Sci. **36**, 113-122
- MORRIER, A., F. CASTONGUAY und J.L. BAILY (2001):
Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa.
Can. J. Anim. Sci. **83**, 347-356
- MORTIMER, D., E.F. CURTIS und R.G. MILLER (1987):
Specific labelling of peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon.
J. Reprod. Fertil. **81**, 127-135

MÜLLER-SCHLÖSSER, F., E. HINSCH, J. BÖHM, W.B. SCHILL und K.D. HINSCH (1995):

Untersuchungen an einem eidotterfreien Verdünnungsmedium für die Tiefgefrierkonservierung von Bullensperma.

Tierärztliche Praxis **23**, 363-366

MYTZKA, C. (1988):

Vergleichende Untersuchungen von Verdünnern zur Spermakonservierung bei Bulle, Schafbock und Ziegenbock unter besonderer Berücksichtigung von pH-Wert und Osmolalität.

Vet. Med. Diss. München

NAGASE, H. und E.F. GRAHAM (1964):

Pelleted semen: comparison of different extenders and process on fertility of bovine spermatozoa.

Proc. 5th Int. Cong. Anim. Reprod. A.I., Trento **4pp**, 387-389

NEUBERT, L. und H. MENGER (1981):

Probleme der Tieftemperaturkonservierung von Schafbockspermien. 1. Mitteilung: Der Einfluss verschiedener Kryoprotektiva auf die Spermien.

Arch. Exp. Vet. Med. **35**, 51-56

NEVES, J.P. (1980):

Untersuchungen zur Samenübertragung beim Schaf unter besonderer Berücksichtigung der Spermatiefgefrierkonservierung.

Vet. Med. Diss. Hannover

OBANDO, H. und E. LUCENA (1984):

Comparative study of two extenders: glycine vs. TES-TRIS in cryopreserving human sperm.

10th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. **2**, 203

OKAMURA, N. S. ONOE, Y. SUGITA, M. PAQUINON, F. DACHEUX und J.L.

DACHEUX (1991):

Water insoluble fraction of egg yolk maintains porcine sperm motility by activating adenylate cyclase.

Mol. Reprod. Dev. **28**, 136-142

OLAR, T.T. und B.W. PICKETT (1980):

Fertility of bovine spermatozoa frozen in chemically defined extender.

Proc. 8th. Tech. Conf. NAAB 1980, 89-91

OLLERO, M., R. PEREZ-PE, T. MUINO-BLANCO und J. A. CEBRIAN-PEREZ (1998):

Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis.

Cryobiology **37**, 1-12

O'NEILL, D.J. (1998):

Studies on the cryopreservation of ram spermatozoa.

Thesis, National University of Ireland

- PARKS, J.E. und J.K. GRAHAM (1992):
Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes.
Theriogenology **38**, 209-222
- PAULENZ, H., L. SODERQUIST, T. ADNOY, A. NORDSTOGA, B. GULBRANDSEN und K.A. BERG (2004):
Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws.
Theriogenology **61**, 1719-1727
- PÉREZ, L.J., A. VALCAREL, M.A. DE LAS HERAS und D. MOSES (1996):
Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay.
Theriogenology **46**, 131-140
- PERIS, S.I., A. MORRIER, M. DUFOUR und J.L. BAILEY (2004):
Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay.
J. Androl **25**, 224-233
- PETER W.: (1991):
Kryobiologische Aspekte der Spermakonservierung.
In: BUSCH, W., K. Löhle und W. PETER: Künstliche Besamung bei Nutztieren.
Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, 237-248
- PETERS, J. (1953a):
Vergleichende Untersuchungen über die Brauchbarkeit des Eidottermilchverdünners.
Dtsch. tierärztl. Wschr. **60**, 14-15
- PETERS, J. (1953b):
Vergleichende Untersuchungen über die Brauchbarkeit des Eidottermilchverdünners.
Dtsch. tierärztl. Wschr. **60**, 17-20
- PHILLIPS, P.H. und H.A. LARDY (1940):
A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen.
J. Dairy Sci. **23**, 399-404
- PONTBRIAND, D., J.G. HOWARD, M.C. SCHIEWE, L.D. STUART und D.E. WILDT (1989):
Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa.
Cryobiology **26**, 341-354
- PURSEL, V.G. und C.S. PARK (1985):
Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa.
Proc. 1st Int. Cong. Deep Freez. Boar Semen, Uppsala, 147-166
- QUINN, P.J. und I.G. WHITE (1969):
Osmotic shock of ram spermatozoa.
J. Reprod. Fert. **18**, 375-377

- RATHI, R., B. COLENBRANDER, M.M. BEVERS und B.M. GADELLA (2001):
Evaluation of in-vitro capacitation of stallion spermatozoa.
Biol. Reprod. **65**, 462-470
- REERS, M. T.W. SMITH und L.B. CHEN (1991):
J-aggregate formation of a carbocyanide as a quantitative fluorescent indicator of
membrane potential.
Biochem. **30**, 4480-4486
- RITAR, A.J und P.D. BALL (1992):
The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at high density of
spermatozoa on cell viability and fertility after insemination.
Anim. Reprod. Sci. **31**, 249-262
- ROWE, A.W. (1966):
Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing.
Cryobiology **3**, 12-18
- ROYCHOUDHURY, P.N. und M.L. DUBAY (1977):
Survival of bull spermatozoa in ewe milk.
Zbl. Vet. Med. A. **24**, 591-596
- SAACKE, R., S. NADIR und R. NEBEL (1994):
Relationship of semen quality to sperm transport, fertilisation and embryo quality in
ruminants.
Theriogenology **41**, 45-50
- SALOMON, S. (1968):
Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and
comparison with other methods.
Aust. J. Biol. Sci., **21**, 355-360
- SALOMON, S. (1970):
The survival of ram spermatozoa following pellet freezing below -79°C.
Aust. J. Biol. Sci., **23**, 459-468
- SALOMON, S. (1971):
Fertility of ram spermatozoa following the pellet freezing on dry ice at -79°C and -
140°C.
Aust. J. Biol. Sci. **24**, 183-185
- SALOMON, S. (1972):
Fertility of ram spermatozoa frozen-stored for three years.
Proc. 7th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Munich **2**, 1493-1495
- SALOMON, S. (1976):
Artificial insemination in sheep.
Publicity Press, Chippendale, N.S.W

- SALOMON, S. (1977)
Fertility following deposition of equal numbers of frozen-thawed ram spermatozoa by single and double insemination.
Aust. J. Agric. Res., **28**, 477-479
- SALOMON, S. und R.J. LIGHTFOOD (1969):
Freezing ram semen by the pellet method I.
Aust. J. Biol. Sci. **22**, 1527-1546
- SALOMON, S. und R.J. LIGHTFOOD (1970):
Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method III. The effects of insemination technique, oxytocin and relaxin on lambing.
J. Reprod. Fertil., **22**, 409-423
- SALOMON, S. und W.M.C. MAXWELL (1995a):
Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination.
Anim. Reprod. Sci. **37**, 185-249
- SALOMON, S. und W.M.C. MAXWELL (1995b):
Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement.
Anim. Reprod. Sci. **38**, 1-36
- SALOMON, S. und W.M.C. MAXWELL (2000):
Storage of ram semen.
Anim. Reprod. Sci. **62**, 77-111
- SANCHEZ-PARTIDA, L.G., B.P. SETCHELL und W.M. MAXWELL (1998):
Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm.
Reprod. Fert. Dev. **10**, 347-357
- SCHRAMM, G.P. und K. LÖHLE (1976):
Einfluss der Kryoprotektiva Glycerin, DMSO und Äthylenglykol sowie der Glycerinadaptionszeit auf die In-vitro-Qualität des Hahnenspermas vor und nach der Tiefgefrierkonservierung.
Arch. Tierz. **19**, 295-305
- SHERMAN, J.K. (1964):
Low temperature research on spermatozoa and eggs.
Cryobiology **1**, 103-129
- SIRIVAIYAPONG, S., F.P. CHENG, A. MARKS, W.F. VOORHOUT, M.M. BEVERS und B. COLENBRANDER (2000):
Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm.
Theriogenology **53**, 789-802

- SMILEY, S.T., M. REERS, C. MOTTOLA-HARTSHORN, M. LIN, A. CHEN, T.W. SMITH, G.D STEELE und L.B.CHEN (1991):
Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by J-aggregate forming lipophilic cation JC-1.
Proc. Nat. Acad. Sci. **88**, 3671-3675
- SMITH, R.L, W.E. BERNDTSON, M.B. UNAL und B.W. PICKETT (1979):
Influence of percent egg yolk during cooling and freezing on survival of bovine spermatozoa.
J. Dairy Sci. **62**, 1297-1303
- SÖDERQUIST, L., N. MADRID-BURY und H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (1997):
Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures.
Theriogenology **48**, 1115-1125
- SPANO, M., A.H. KOLSTAD, S.B. LARSEN, E. CORDELLI, G. LETER, A. GIWERCMAN und J.P. BONDE (1998):
The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies.
Asclepios. Hum. Reprod. Fert. **13**, 2495-2505
- STOJANOV, V.K. (1980):
An experiment on deep-cervical insemination of sheep with frozen semen.
Zhivotnovodstvo **1**, 45-46
- STOLLA, R. (1984):
Ursachen und Bedeutung der Teratozoospermie.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- TEKIN, N. (1982):
Untersuchungen zur Samenübertragung beim Schaf mit Tiefgefriersperma: Einfluss verschiedener Verdüner auf Motilität, Kopfkappenintegrität und Saphadex-Inf. von in Minitüb konfektioniertem Sperma.
Vet. Med. Diss. Hannover
- THOMAS, C.A., D.L. GARNER, J.M. DEJARNETTE und C.E. MARSHALL (1997):
Fluorometric assessment of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.
Biol. Reprod. **56**, 991-998
- THUN, R., M. HURTADO und F. JANETT (2002):
Comparison of Biociphos-Plus[®] and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen.
Theriogenology **57**, 1087-1094
- VARNAVSKIJ, A.N. und V.A. VARNAVSKAJA (1976):
Results of artificial insemination with frozen semen.
Ovtsevodstvo **9**, 19-20

VISSER, D und S. SALOMON (1974):

Fertility following inseminations with frozen-thawed reconcentrated and unconcentrated ram semen.

Aust. J. Biol. Sci. **27**, 423-425

WARNAWSKI, A.N. (1971):

Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchung von Kälteschäden an Bullen- und Schafbocksperma.

Fortpfl. Haust. **7**, 15-33

WATSON, P.F. (1975):

The interaction of egg yolk and ram spermatozoa studied with a fluorescent probe.

J. Reprod. Fert. **42**, 105-111

WATSON, P.F. (1976):

The protection of ram and bull spermatozoa by the low density protein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep freezing.

J. Therm. Biol. **1**, 137-141

WATSON, P.F. (1979):

The preservation of semen in mammals.

Oxford Reviews of Reproductive Biology **1**, 283-350

WATSON, P.F. (1995):

Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function.

Reprod. Fert. Dev. **7**, 871-891

WATSON, P.F. (2000):

The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.

Anim. Reprod. Sci. **60-61**, 481-492

WATSON, P.F. und I.C. MARTIN (1972):

A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa.

J. Reprod. Fert. **28**, 99-101

WATSON, P.F. und I.C. MARTIN (1973a):

The influence of fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C.

J. Reprod. Fert. **32**, 310

WATSON, P.F. und I.C. MARTIN (1973b):

The response of ram spermatozoa to preparations of egg yolk in semen diluents during storage at 5 or -196 degrees C.

Aust. J. Biol. Sci. **26**, 927-935

WATSON, P.F. und I.C. MARTIN (1974):

Regions of the freezing curve causing changes in structure and viability of ram sperm.

Nature **251**, 315-316

- WATSON, P.F. und I.C. MARTIN (1975):
Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa.
Aust. J. Biol. Sci. **28**, 153-159
- WATSON, P.F. und J.C. MARTIN (1976):
Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluents containing egg yolk during cooling and freezing on the fertility of ram semen.
Theriogenology **6**, 559-564
- WEISS, K. (1953):
Spermaverdünnung mit Milch.
Wien. Tierärztl. Mschr. **39**, 668-672
- WEITZE, K. F. (1977):
Gefrierschädigung und Gefrierschutz im Rahmen der Tiefgefrierkonservierung lebenden Materials unter besonderer Berücksichtigung der Säugersamenzelle.
Dtsch. tierärztl. Wschr. **84**, 402-484
- WEITZE, K.F., D: RATH und G: BARON (1987):
Neue Aspekte der Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma in Plastikrohren.
Dtsch. tierärztl. Wschr. **94**, 484-488
- WILMUT, I. und C POLGE (1977):
The low temperature preservation of boar spermatozoa. I. Motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating protective agents.
Cryobiology **14**, 471-478
- WINDSOR, D.P (1992):
Variation in fertility of frozen semen at AI.
Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol. **24**, Abstract

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Braun danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für die stets freundliche, jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung und Korrektur dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Frank Weber, der sich immer Zeit für mich nahm und mir stets geduldig mit Rat und Tat zur Seite stand. Für seine unerschütterliche Nervenstärke bei diversen Einführungen in die Interpretation durchflusszytometrischer Messergebnisse zolle ich ihm höchsten Respekt.

Den Tierpflegern am Oberwiesenfeld – insbesondere Alfred – danke ich herzlich für die Hilfe bei der Probennahme, die trotz oder gerade wegen kleinerer Missgeschicke meinerseits immer wieder für Erheiterung sorgte.

Bei Alex und Heidi möchte ich mich für die immer freundliche und geduldige Unterstützung und Beratung bei allen labortechnischen Belangen bedanken.

Meiner Mitstreiterin Martina danke ich für zahlreiche wertvolle Ratschläge und Bemühungen, mit denen sie ihre eigenen Erfahrungen selbstlos an mich weitergab.

Bei Herrn Prof. Dr. Küchenhoff und Benjamin Hofner bedanke ich mich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Frau Rotmann war mir eine große Hilfe bei der Beschaffung der benötigten Literatur für meine Arbeit. Dafür bin ich ihr sehr dankbar.

Der Fa. Minitüb (Tiefenbach, Germany) und Herrn Dr. Müller-Schlösser danke ich für die zügige Anfertigung und Bereitstellung der Verdünnermedien für meinen Versuch.

Meinem Ehemann Benji bin ich unendlich dankbar für seine allzeit geduldige Unterstützung und liebevolle Fürsorge und für den Respekt, den er mir als Doktorandin und werdender Mutter entgegen brachte.

Meiner ganzen Familie danke ich für ihren unerschütterlichen Glauben an mich und für die moralische Unterstützung, die mich immer wieder ermutigen und in meinem Handeln bestärken.