

Aus der
Chirurgischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. Ulrike Matis
Betreuer: Prof. Dr. Joachim Braun

Angefertigt am
Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V.
und dem Besamungsverein Neustadt/Aisch e.V.
(Dr. H. Nehring)

Untersuchungen zum Einsatz modifizierter Medien und Bedingungen bei der Konservierung von
Bullensperma

INAUGURAL-DISSERTATION
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Rebekka Sehner
aus
Zagreb / Kroatien

München 2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. A. Scholz

Tag der Promotion: 10. Februar 2006

Meiner Familie gewidmet

Untersuchungen zum Einsatz modifizierter Medien und Bedingungen bei der Konservierung von Bullensperma

Inhaltsverzeichnis

<u>I. Einleitung</u>	1
<u>II. Literatur</u>	2
1. Moderne Methoden bei der Beurteilung der Spermivitalität	2
2. Flüssigkonservierung	4
3. Gefrierkonservierung	6
4. Vergleich von Gefrier- und Flüssigkonservierung	9
6. Einsatz von Antioxidanzien in der Spermakonservierung	11
7. Bedeutung des Seminalplasmas bei der Spermakonservierung	17
<u>III. Material und Methoden</u>	23
1. Auswahl der Bullen	23
2. Spermagewinnung	23
3. Beurteilung des originären Spermas	23
4. Untersuchung des flüssig- oder gefrierkonservierten Spermas	24
4.1. Schätzung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien	24
4.2. Computergestützte Motilitätsanalyse (CMA)	24
4.3. Beurteilung der Akrosomenmorphologie	25
4.4. Eosin-Nigrosin-Färbung nach BLOM	26
4.5. Differenzierung lebender und toter Spermien durch Vitalfärbung mit SYBR/Propidiumiodid und fluoreszenzmikroskopischer Auswertung	27
4.6. Flowzytometrische Differenzierung lebender und toter Spermien nach Vitalfärbung mit Rhodamin 123/ Propidiumiodid	28
5. Durchführung von Versuchen zur Konservierung von Bullensperma	31
5.1. Vergleich von zwei Varianten des Caprogen-Verdünners für die Flüssigkonservierung	31
5.1.1. Bereitstellung des „selbst hergestellten“ Caprogen-Verdünners	31
5.1.2. Fertigstellung des kommerziellen Caprogen [®] - Verdünners	32
5.1.3. Auswahl der Bullen	32
5.1.4. Spermakonservierung und – aufbewahrung	32
5.1.5. Untersuchung der flüssigkonservierten Proben	33
5.2. Caprogen-Feldversuch	33
5.2.1. Auswahl der Bullen	33
5.2.2. Spermakonservierung	33
5.2.3. Kontrolluntersuchung der flüssigkonservierten Proben	34
5.2.4. Einsatz in der künstlichen Besamung	34

5.3. Untersuchungen zum Einsatz von N-Acetylcystein in einem eidotterfreien und einem eidotterhaltigem Tiefgefrierverdünner	34
5.3.1. Verwendete Verdünnermedien	34
5.3.2. Auswahl der Bullen	35
5.3.3. Verdünnung und Gefrierkonservierung	36
5.3.4. Untersuchung der aufgetauten Proben	36
5.4. Besamungsversuch mit N-Acetylcystein-Zusatz in einem eidotterfreien und einem eidotterhaltigem Verdünner	36
5.4.1. Auswahl der Bullen	36
5.4.2. Spermakonservierung	36
5.4.3. Untersuchung der aufgetauten Proben	36
5.4.4. Einsatz in der Künstlichen Besamung	37
5.5. Laborversuch I zum Thema „Coating-Effekt“	37
5.5.1. Auswahl der Bullen	37
5.5.2. Verdünnung und Gefrierkonservierung	37
5.5.3. Beurteilung der aufgetauten Proben	38
5.6. Laborversuch II zum Thema „Coating-Effekt“	38
5.6.1. Auswahl der Bullen	38
5.6.2. Verdünnung und Gefrierkonservierung	38
5.6.3. Beurteilung der aufgetauten Proben	39
6. Statistik	39
<u>IV. Ergebnisse</u>	40
1. Vergleich von zwei Varianten des Caprogen-Verdünners für die Flüssigkonservierung	40
1.1. Laborversuch	40
1.2. Feldversuch	45
2. Untersuchungen zum Einsatz von N-Acetylcystein in einem eidotterfreien und einem eidotterhaltigen Tiefgefrierverdünner	48
2.1. Laborversuch	48
2.2. Feldversuch	53
3. Untersuchungen zum „Coating- Effekt“	57
3.1. Coating- Effekt- Versuch I	57
3.2. Coating- Effekt- Versuch II	61
<u>V. Diskussion</u>	67
<u>VI. Zusammenfassung</u>	73
<u>VII. Summary</u>	75
<u>VIII. Literaturverzeichnis</u>	77
<u>IX. Anhang</u>	93

I. Einleitung

Wer im Zeitalter einer modernen und effektiven Landwirtschaft in der Rinderzucht und -haltung wirtschaftliche und züchterische Erfolge erzielen und konkurrenzfähig bleiben will, kann auf eine Anwendung der künstlichen Besamung (KB) nicht verzichten. Mittlerweile beträgt in Mitteleuropa der Anteil der KB in der Milchviehhaltung annähernd 100%. Trotz zunehmender Entwicklung weiterer biotechnischer Verfahren wird die KB auch in Zukunft das wichtigste zuchtfördernde Verfahren bleiben.

Für die Konservierung von Bullensamen stehen seit Jahren erfolgreich genutzte Technologien zur Verfügung (MEDEIROS CMO et al. 2002; VISHWANATH R 2003; VISHWANATH R u. SHANNON P 2000; WATSON PF 2000). Zuchtfortschritt und Konkurrenzdruck auf nationaler und internationaler Ebene erfordern es jedoch, neue Möglichkeiten zur weiteren Effektivierung der Konservierungsverfahren zu prüfen und durch technische Weiterentwicklung nutzbar zu machen. Für das Besamungsunternehmen und den landwirtschaftlichen Betrieb ist Qualitätssicherung kombiniert mit höchst möglichem Befruchtungserfolg von größter Wichtigkeit. Zudem sollte die Spermaaufbereitung mit verträglichem arbeitstechnischen und finanziellem Aufwand möglich sein und gleichzeitig hohe Portionsausbeuten sowie maximale Spermiovitalität sichern.

In Zusammenarbeit mit dem Besamungsverein Neustadt a. d. Aisch war Ziel dieser Arbeit, Wege zu finden, einige dieser Ansprüche zur größeren Zufriedenheit des Spermaproduzenten und seiner Kunden in der Tierzuchtpraxis zu erfüllen. Unter Zuhilfenahme moderner spermatologischer Methoden wurde die Überlebens- und Befruchtungsfähigkeit von Bullenspermien getestet, die unter Routinebedingungen gewonnen, jedoch nicht nur nach dem herkömmlichen Verfahren des Besamungsvereines verarbeitet wurden. Dabei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Sowohl in einem Labor- also auch einem Feldversuch wurde der Konservierungserfolg bei Nutzung eines kommerziellen „Frischsamen“- Verdünners (Caprogen®) im Vergleich zu einer selbst hergestellten, kostengünstigeren Variante getestet.
- Ebenfalls unter Labor- und Feldbedingungen wurde ein eigelbloser Tiefgefriererdünnner (Bioxcell®) im Vergleich zu einer herkömmlichen eigelhaltigen Variante (Triladyl®) auf seine spermienkonservierenden Fähigkeiten überprüft. Diesen Proben wurde ein Antioxidanz in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt, um einen eventuell zellschützenden Effekt zu erkennen und Grenzwerte für eine maximale Wirkung festlegen zu können.
- Außerdem wurden noch zwei weitere in vitro Versuche durchgeführt, in welchen bei verschiedenen Verdünnungsgraden überprüft wurde, ob das derzeit übliche Zeitmanagement bei der Routineverarbeitung einen ausreichenden Besatz der Spermienoberfläche mit Seminalplasmae Proteinen (Coating-Effekt) gewährleisten kann.

Alle Versuche wurden unter praxisnahen Bedingungen durchgeführt, um nicht nur einer generellen Lösung der oben genannten Fragestellungen näher zu kommen, sondern auch einen Beitrag zur Optimierung der stationsinternen Arbeitsabläufe zu leisten.

II. Literatur

1. Moderne Methoden bei der Beurteilung von Spermiovitalität

Computergestützte Motilitätsanalyse (CMA)

Zur Beurteilung der Spermienbewegung ist es im Routinebetrieb von Besamungsstationen bisher meist üblich, nur die subjektive Motilitätsschätzung anzuwenden, welche – da sie immer durch erfahrenes Personal durchgeführt wird - auch eine realistische und ohne großen Aufwand durchzuführende Beurteilungsmethode darstellt, die seit vielen Jahrzehnten praktiziert wird.

Für eine objektive und tiefer gehende Analyse des Motilitätsverhaltens von Spermien bestand jedoch seit langem großes Interesse, nicht nur die Spermienpopulation als Ganzes zu betrachten, sondern hinsichtlich verschiedener Parameter jede Spermienzelle einzeln zu beschreiben und anhand einer Vielzahl von Ergebnissen die Qualität der untersuchten Probe möglichst objektiv zu beurteilen. Schon vor über 25 Jahren begannen Dott und Foster (1979) mit der Entwicklung einer computergesteuerten Motilitätsanalyse, die seitdem fortwährend verbessert wurde. Wie diese Systeme funktionieren wird im Folgenden dargestellt.

Die zu untersuchenden Spermaproben müssen für die Messung - je nach Dichte - zunächst mit physiologischem und transparentem Medium verdünnt werden. Die Spermiovitalität darf durch diese Lösung nicht beeinflusst werden und enthaltene Partikel könnten das Messergebnis, besonders in Bezug auf Konzentrationsangaben, verfälschen. Der Hersteller gibt außerdem Hinweise dazu, wie hoch die Dichte von Ejakulaten in etwa sein sollte, um optimale Messergebnisse zu erzielen. Im nächsten Schritt erfolgt die Befüllung einer Messkammer, die ein definiertes Volumen aufnehmen kann. Dazu sind Kammern mit unterschiedlichen Schichtdicken im Handel erhältlich. Die Angaben zur verwendeten Kammer können je nach CMA-Modell in der Software gespeichert werden und sind für eine exakte Konzentrationsbestimmung essentiell. Die Messkammer wird an einem Mikroskop auf dem Objektträgtisch mittels einer Rastermechanik oder bei neueren Modellen mit einem Scannertisch bewegt, so dass mehrere Felder pro Probe gemessen werden können (VERSTEGEN J et al. 2002). Auch hier ist zu beachten, dass erst ab einer bestimmten Anzahl von gemessenen Spermien ein exaktes Messergebnis resultieren kann. Diese Mindestanzahl ist speziesspezifisch (BUDWORTH PR et al. 1987; BUDWORTH PR et al. 1988). Das mikroskopische Bild wird von einer Kamera auf die Videokarte eines daran gekoppelten Computers übertragen. Dieser ist mit einer speziellen Software zur Mikroskopbildanalyse ausgestattet.

Der Parametersatz, nach welchem die Eigenschaften der beweglichen Spermien beurteilt werden, kann nutzerorientiert angepasst, oder die vom Hersteller empfohlenen Einstellungen verwendet werden. Auch die durchschnittliche Größe der Spermienköpfe wird dabei definiert, da in vielen CMA-Systemen die Spermienerkennung durch diese Angaben gewährleistet wird. Partikel der gleichen Größe können hier das Ergebnis verfälschen, weshalb die Aufbereitung der Proben – falls notwendig - unbedingt mit transparentem, spermienverträglichem Medium durchgeführt werden sollte. Von den identifizierten Zellen werden die zurückgelegte Wegstrecke, ihre Grundformen und die entsprechenden Geschwindigkeiten registriert (VERSTEGEN J et al. 2002). Je nach verwendetem System erfolgt die Einteilung der Spermien in verschiedene Hauptklassen wie „non- motil“, „lokal motil“ und „progressiv motil“. Bei dem Sperm-VisionTM-System der Firma Minitüb können die motile und die progressive Gruppe zum Beispiel wahlweise noch in Unterklassen unterteilt werden: „curvilinear motile“, „non- linear motile“, „hyperactive motile“ und „linear motile“ (Bedienungsanleitung „Sperm Vision“ #12049/0586, Minitüb). Im Gegensatz zur Humanmedizin gibt es für Ejakulate landwirtschaftlicher Nutztiere keine WHO-Richtlinien für Motilitätswerte. Lediglich die Population der nicht-beweglichen Spermien entspricht einer festen Parametervorgabe (ZAIMI A et al. 1985). Um das länderübergreifende Verständnis zu erleichtern, werden die Parameter nach den englischen Bezeichnungen abgekürzt (BOYER SP et al. 1989):

- AOC: average orientation change of the head = durchschnittlicher Richtungswechsel des Kopfes (°)
- DSL: distance straight line = geradlinige Strecke in µm

- VCL: velocity curved line = Geschwindigkeit Kurvenstrecke ($\mu\text{m}/\text{sec}$)
- LIN: linearity = Geradlinigkeit (VSL/VCL)
- ALH: amplitude of lateral head displacement = seitlicher Ausschlag des Kopfes (μm)
- STR: straightness = kräftige Geradlinigkeit (VSL/VAP)
- DAP: distance average path = durchschnittliche Strecke (μm)
- VAP: velocity average path = Geschwindigkeit Durchschnittsstrecke ($\mu\text{m}/\text{sec}$)

Auch wenn mit der computergesteuerten Motilitätsanalyse mittlerweile eine Methode entwickelt worden ist, die eine „Objektivierung“ von Ergebnissen gewährleistet, die durch die Motilitätsschätzung einer Person nicht erreicht werden kann (RIEMKE P et al. 1986), so muss sich der Benutzer dieses Systems dennoch der Tatsache bewusst sein, dass durch die subjektive Festlegung des Messbereiches ein Vergleich der in verschiedenen Laboratorien ermittelten Messergebnisse nicht möglich ist (KNUTH et al. 1987). Eine dafür notwendige Standardisierung existiert für Ejakulate landwirtschaftlicher Nutztiere noch nicht. Dennoch stellt die computergesteuerte Motilitätsanalyse ein „Werkzeug“ dar, mit welchem man effizient und zuverlässig das Befruchtungsvermögen von männlichen Individuen objektiv beurteilen kann. Deshalb ist der Einsatz dieser Technologie mittlerweile nicht nur in Forschungseinrichtungen sondern in zunehmendem Maße auch in Besamungsstationen verbreitet (VERSTEGEN J et al. 2002).

Auf Fluoreszenz basierende Tests zur Ermittlung des Anteils lebender Spermien

Untersuchungen zur Farbstoffpermeabilität von Zellmembranen und –organellen können in vielfältiger Weise so spezifiziert werden, dass zusätzlich funktionelle Aussagen möglich sind. Solche Verfahrensweisen nutzt man insbesondere bei der Flowzytometrie. Ursprünglich wurde diese Methode zur Zählung und Analyse von Blutzellen entwickelt. Seit Beginn der 80er Jahre wird sie in zunehmendem Maße auch in der Fortpflanzungsforschung eingesetzt (MATZK F et al. 2000).

Traditionelle „Lebend-Tot-Färbungen“ wurden beispielsweise hinsichtlich der Differenzierbarkeit der unterschiedlich angefärbten Zellen verbessert, indem man Fluoreszenzfarbstoffe einsetzt und die Auswertung mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie oder flowzytometrischen Techniken erfolgt. Dabei werden Zellen mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert, die unterschiedliche Anregungs- und Emissionsspektren besitzen. Die gefärbten Zellen werden somit bei der Auswertung in verschiedenen Farben dargestellt und so im Falle einer mikroskopischen Auswertung durch das menschliche Auge oder bei der Flowzytometrie durch entsprechende Technik differenziert (GRAHAM JK et al. 1990).

Wendet man in der Spermatologie Fluoreszenzfarbstoffe zur Ermittlung des Anteils lebender Spermien mit anschließender fluoreszenzmikroskopischer Auswertung an, so sind die markierten toten Spermien auf dem dunklen Untergrund meist sehr gut zu erkennen. Die nicht markierten lebenden Zellen können aber z. T. im Untergrund „verschwinden“ und so einer Bewertung entgehen. In solchen Fällen kann man primär alle, d. h. lebende und tote Spermien mit einem speziellen Farbstoff I markieren und anschließend einen anderen Farbstoff II zur Markierung der toten Spermien einsetzen. Beide Farbstoffe müssen unterschiedliche Anregungs- und vor allem Emissionsspektren aufweisen. Die Emission des Farbstoffs II sollte dabei die des Farbstoffs I überdecken (GARNER DL et al. 1997).

Im Vergleich zur Fluoreszenzmikroskopie liegt der Vorteil der Flowzytometrie darin, dass Mehrfachmarkierungen möglich sind und differenziert ausgewertet werden können und dass innerhalb kürzester Zeit eine große Anzahl von Zellen vermessen werden kann. In Form eines sehr feinen Flüssigkeitsstroms passieren die mit Farbstoff beladenen Zellen einen Messbereich. Basierend auf Lichtstreuungseffekten und Fluoreszenz können einzelne Zellen individuell analysiert und deren spezifischen Funktionen bestimmt werden. Die sensitive Zone ist dabei der Bereich, wo ein fokussierter Lichtstrahl (z. B. Laser, Quecksilberlampe) auf die durchfließende Zellsuspension trifft. Diese Lichtquellen eignen sich deshalb besonders, weil sie eine hohe Lichtintensität auf einen sehr kleinen Punkt richten können und nur Licht einer bestimmten Wellenlänge aussenden, um Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch anzuregen. Durch jedes einzelne Partikel werden optische Signale sequentiell generiert, die mit farbstoffselektiven Filtern

aufgespalten, durch Photodetektoren gesammelt und von Photonenimpulsen in elektrische Signale umgewandelt werden. Mit dieser Methode ist eine spezifische reproduzierbare Messung möglich. Die Ergebnisse werden danach weiter verarbeitet und grafisch dargestellt (GRAHAM JK et al. 1990; GARNER DL u. JOHNSON LA 1995).

2. Flüssigkonservierung

Seit Beginn des 20. Jahrhunderts gab es viele Berichte über die Entwicklung von Verdünnermedien für eine Flüssigkonservierung von Sperma landwirtschaftlicher Nutztiere, wobei ein Großteil dieser Arbeiten in der ehemaligen Sowjetunion geleistet wurde (ANDERSON J 1945). Grundsätzlich sollte diese Art der Konservierung eine minimale Haltbarkeit des verdünnten Spermas von 2- 4 Tagen gewährleisten, um innerhalb dieser Zeit einfach zum Ort der Inseminierung transportiert werden zu können. Indem anfangs die Lagerung bei 5°C stattfand, wurde die Stoffwechselrate gesenkt und das Überleben der Spermien mit möglichst geringem Energieverlust gesichert (VISHWANATH R u. SHANNON P 2000). Hinzu kam eine Verringerung des Keimwachstums.

In den Jahren 1964 und 1965 wurde von Shannon ein neuartiger Verdünner mit dem Namen Caprogen® entwickelt (SHANNON P 1964; SHANNON P 1965), der noch heute der häufigste genutzte Verdünner für die Flüssigkonservierung von Bullensperma ist. Dieses Medium enthielt einen einfachen Zucker (z.B. Glucose, Fruktose) zur Einstellung des osmotischen Druckes und als Energiequelle, eine geeignete Pufferlösung, die mögliche pH- Schwankungen (pH 6-7) ausgleichen konnte, und die hier in Form eines Citrat- Puffers (andere z.B. Tris, HEPES-, MOPS- oder Bicarbonat- Puffer) eingesetzt wurde. Ein weiterer Zusatzstoff war Glycerin, das als intrazelluläres „Kryoprotektivum“ Spermien vor möglichen temperaturbedingten Schäden schützt (BUSCH W u. HOLZMANN A 2001). Weiterhin ist Eidotter enthalten, von dem seit 1940 bekannt war, dass es einen positiven Effekt auf die Spermienüberlebensrate in den damals verwendeten Verdünnern hatte (PHILLIPS P u. LARDY AL 1940). Auch im Caprogen® konnte man beobachten, dass ein Zusatz dieser Komponente von 5- 20% von Vorteil ist. Diese makromolekulare Substanz hat nicht nur eine Gefrierschutzwirkung, sondern auch einen protektiven Charakter durch seine Bindung an einzelne Fraktionen von im Seminalplasma enthaltenen spermenschädlichen Proteinen.

Da jedes gewonnene Ejakulat natürlicherweise mehr oder weniger mit Keimen belastet ist und auch das Eigelb geringfügig kontaminiert sein kann, war und ist es auch immer noch üblich, dem Verdünner eine Kombination von verschiedenen Antibiotika (z.B. Streptomycin, Lincomycin und Penicillin) zuzufügen.

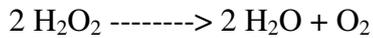
Der Grund, warum auch Glycin in einem Verdünnermedium für die Flüssigkonservierung enthalten ist, ist bis heute noch nicht ganz geklärt (VISHWANATH R u. SHANNON P 2000). Shannon führte 1964 einen Feldversuch mit einem 20% Eigelb-Citrat-Glucose- Verdünner durch, der 1% Glycin enthielt und im Befruchtungserfolg ein um 2,1% verbessertes Ergebnis erzielte als ohne Glycin und Glucose (SHANNON P 1964), wobei der positive Effekt möglicherweise in direktem Zusammenhang mit dem Glukose- Glycin- Mengenverhältnis stehen könnte. Auch die in der Natur zu beobachtende generell proteinschützende Eigenschaft des Glycins sollte hier erwähnt werden (ASPINALL D u. PALEG LG 1981; HEBER U et al. 1971; PALEG LG et al. 1981; YANCEY PH u. SOMERO GN 1979).

Fettsäuren in Verdünnern haben unterstützende Wirkung beim Erhalt der Membranintegrität und – fluidität von Zellen (SHANNON P 1962). Z. T. können sie auch als Stoffwechselsubstrate dienen und die respiratorische Aktivität von Spermien zu verlängern (MANN T u. LUTWAK-MANN C 1981b). Aus diesem Grund enthält Caprogen® auch die für die Namensgebung mitverantwortliche Capronsäure, die vor allem die Befruchtungsraten für Samen, der einen Tag nach der Produktion zur Insemination verwendet wurde, signifikant (+ 1,3%) verbesserte (SHANNON P 1962).

Während in der Frühphase der Flüssigkonservierung die Samenportionen bei 5°C gelagert und transportiert wurden, fanden Shannon und Curson heraus, dass es optimal war, das so verdünnte Sperma bei Raumtemperatur zwischen 15°C und 24°C zu lagern (SHANNON P u. CURSON B 1984). Bei diesen höheren Temperaturen kommt es jedoch zur vermehrten Bildung von zelltoxischen reaktiven Sauerstoffspezies, wie zum Beispiel das Superoxid-Anion (O_2^-), Peroxid (H_2O_2) oder das

Hydroxylradikal (OH[•]). Diese reaktiven Gruppen werden vor allem durch oxidative Desaminierung von aromatischen Aminosäuren mit Hilfe der membrangebundenen aromatischen Aminosäureoxidase gebildet. Wasserstoffperoxid stellt bei weitem das gefährlichste der genannten Spezies dar, weshalb Caprogen® als weiteren Zusatz das Enzym Catalase erhielt, die in einer enzymatischen Reaktion die im Medium enthaltenen Peroxide minimieren kann:

Catalase



Ein weiteres Mittel, um den Sauerstoffdruck zu erniedrigen und somit auch die Bildung von reaktiven Gruppen herabzusetzen war die Begasung des Verdünners mit Stickstoff (N₂). Dies senkte auch die in diesem relativ hohen Temperaturbereich erhöhte Stoffwechsel- und Motilitätsrate der Spermien. Zusätzlich stellte sich heraus, dass mit der N₂-Einleitung auch der negative Verdünnungseffekt verringert wurde, der bei hohen Verdünnungsraten auftritt (VISHWANATH R u. SHANNON P 2000). Somit konnten nun sogar mit nur 2,5 x 10⁶ Spermien pro Besamungsportion sehr gute Befruchtungsraten ermöglicht werden, was bisher mit keinem anderen Verdünnern für Flüssigkonservierung oder Gefrierkonservierung denkbar war (SHANNON P et al. 1984). Die Zusammensetzung von kommerziellem Caprogen® ist relativ komplex, so dass eine Eigenherstellung mit gewissem Aufwand verbunden, jedoch prinzipiell möglich ist (Pkt. III.5.1.1.)

Diese Art der Samenkonservierung kommt weltweit am häufigsten in Neuseeland, und in geringerem Maße auch in Frankreich, den Niederlanden und Australien zur Anwendung. Im Jahre 1995 waren mehr als 200 Millionen Spermaportionen produziert worden, wovon 95% kryokonserviert waren. Die 4 Millionen, die flüssig konserviert waren, stammten vorwiegend aus Neuseeland (VISHWANATH R u. SHANNON P 2000). Insemination von Kühen findet dort überwiegend saisonal in den Monaten September bis Dezember statt. In dieser Inseminationsperiode, die ungefähr 17 Wochen dauert, besteht extrem hoher Bedarf an Sperma, so dass die Ausbeute von einem Ejakulat möglichst hoch sein muss, weshalb sich hier auch diese Art der Konservierung anbietet. Aus diesem Grund wurde in Neuseeland auch die dafür notwendige Logistik fortwährend optimiert. Aber auch die Gefrierkonservierung wird dort praktiziert, wobei diese jedoch in weniger großem Ausmaß durchgeführt wird und vor allem dem Export von Spermachargen und zur Erhaltung genetischen Materials dient (SHANNON P 1968; SHANNON P et al. 1984; VISHWANATH R et al. 1996).

Wie die folgenden Zahlen aus dem ADR- Bericht (2004) belegen, bleibt der Frischspermaeinsatz in Deutschland begrenzt, weil hier die Vorteile des Einsatzes von gefrierkonserviertem Sperma überwiegen:

	<u>Jahr</u>	<u>% der EB</u>
	1999	3,04
Deutschland	2000	4,03
	2001	3,35
	2002	3,52
	2003	2,85

2003: 135.913 EB mit FK 4.634.040 mit GK

Somit wurden diesem Bericht zufolge im Jahr 2003 in Deutschland nur 135.913 Erstbesamungen mit flüssigkonserviertem Bullensamen durchgeführt. Gefrierkonservierter Samen hingegen wurde hier im Gegensatz zu den Verhältnissen in Neuseeland um ein Vielfaches häufiger zur Besamung eingesetzt.

3. Gefrierkonservierung

Einer der größten Vorteile von künstlicher Besamung ist, dass man wertvolle Genetik eines männlichen Individuums nutzen kann, ohne dass seine Anwesenheit erforderlich ist oder, dass es notwendigerweise noch am Leben ist. Die Verarbeitung mit Tiefgefrierverdünner ermöglicht eine Langzeitkonservierung. Nur diese kann im weltweiten Spermahandel genutzt werden.

Erst mit Entdeckung des Glycerins als wirksames Kryoprotektivum durch Polge im Jahre 1949, konnte diese Art der Konservierung durchgeführt werden (POLGE C et al. 1949). Dies wurde zum ersten Mal durch die Entwicklung von Techniken des Tiefgefrierens ermöglicht, bei denen der Samen bei -196°C in flüssigem Stickstoff so gelagert wird, dass praktisch alle thermodynamischen Vorgänge unterbrochen und Zellschäden nur noch von kosmischer Hintergrundstrahlung bewirkt werden können. Man geht davon aus, dass mehrere 1000 Jahre notwendig sind, bevor 50% der Spermien in diesem Zustand der Anbiose getötet werden können (MAZUR P 1980).

Obwohl die grundsätzlichen Bedingungen für die Gefrierkonservierung von Bullesperma gut untersucht und immer weiter perfektioniert worden sind, können beim Einfrier- und Auftauvorgang erhebliche Schäden verursacht werden. Selbst mit modernster Technik muss man damit rechnen, dass als bestmögliches Auftauergebnis etwas mehr als 50% der Zellen überleben (VISHWANATH R u. SHANNON P 2000), so dass Verluste von 30-50% durchaus auftreten können.

Während des Abkühlens und Gefrierens sind die Spermien einigen Belastungen ausgesetzt, wie zum Beispiel mechanischen Belastungen durch Eiskristallbildung oder osmotischen Schäden durch Veränderung der intra- und extrazellulären Salzkonzentrationen. Eine mehrstündige so genannte Äquilibrierungsphase zwischen circa 20° und 4°C ist notwendig, damit sich die Spermien dem ungewohnten Verdünnermilieu anpassen können und damit es durch Wechselwirkung mit den vorhandenen Komponenten zu einer Stabilisierung der Zellmembran kommen kann. Die ermittelte optimale Gefriereschwindigkeit liegt zwischen 10°C und 100°C pro Minute, wobei schnellere und langsamere Geschwindigkeiten die Überlebensraten senken können. Bei einer Gefriereschwindigkeit oberhalb des Optimums tritt der Zelltod durch intrazelluläre Kristallbildung ein, unterschreitet man jedoch diese Geschwindigkeit, dann sind so genannte Lösungseffekte für den Untergang von Zellen verantwortlich. Letzteres bedeutet ein Abnehmen von intrazellulärem Wasser und damit verbundenen steigenden Konzentrationen von Stoffen innerhalb der Zelle bis hin zum Ausfallen von Komponenten bei Überschreitung der Löslichkeit. Demzufolge muss ein erprobtes Temperaturregime exakt eingehalten werden, so dass suboptimale Bedingungen so weit wie möglich vermieden werden bis der eutektische Punkt erreicht ist. Dieser definiert den Zustand, in dem eine Lösung in einen anderen Aggregatzustand übergeführt wird, ohne dass sich ihre Zusammensetzung dabei verändert (BUSCH W u. HOLZMANN A 2001; HOFFMANN B 2003).

Die grundlegenden Verdünnerkomponenten entsprechen denen in der Flüssigkonservierung genannten Inhaltsstoffe. Auch hier ist ein Puffer notwendig, der mögliche pH-Schwankungen in Grenzen hält. Zum Schutz vor Kälteschock werden lipoproteinhaltige Komponenten oder solche mit hohem Molekulargewicht eingesetzt, wie zum Beispiel Eigelb oder Milch. Das Erstgenannte wirkt zusammen mit Glycerin als hervorragender Gefrierschutz. Glukose oder Fruktose dienen zur Einstellung des osmotischen Drucks, zur Zellmembranstabilisierung und als Energiequelle. Außerdem sind noch Antibiotika notwendig (VISHWANATH R u. SHANNON P 2000), was in II.1. genauer erläutert wurde. Die meisten in Europa benutzten Tiefgefrierverdünner sind auf einer Basis von Tris-Puffer und Eigelb oder Milch aufgebaut.

Neuerdings versucht man, aus mehreren Gründen vom Einsatz des Eidotters als Verdünnerbestandteil abzurücken und letztendlich ein Medium einzusetzen, das gänzlich frei von tierischen Produkten und bezüglich seiner chemischen Zusammensetzung genau definiert ist. Wichtiger Gesichtspunkt ist dabei die Angst vor einer möglichen Kontamination des Eigelbs mit Bakterien, Mykoplasmen oder anderen Krankheitserregern (BOUSSEAU S et al. 1998), die nicht nur eine erfolgreiche Befruchtung verhindern, sondern weitaus größere Schäden verursachen können. Da für Besamungsstationen Import und Export

von Samen eine ständig wachsende wirtschaftliche Rolle spielen, sind seuchenhygienische Aspekte die Hauptargumente für den Ersatz tierischer Eiweiße durch nicht-tierische. Aber auch die starken Variationen in der Zusammensetzung des Eigelbs und die damit verbundene Problematik der Standardisierung sollten hier genannt werden (AIRES VA et al. 2003; GIL J et al. 2000).

Hinzu kommt, dass L-Phenylalanin ein erheblicher Bestandteil der Eidotterproteine ist und der aromatischen Aminosäure-Oxidase (AAAO) als Substrat dient und somit die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies unterstützt (VISHWANATH R u. SHANNON P 2000). Dasselbe gilt für das enthaltene Eisen, das für die chemische Reaktion notwendig ist, um Hydroxylradikale hervorzubringen (VISHWANATH R u. SHANNON P 1997).

Obwohl Eigelb schon seit 60 Jahren in der Kryokonservierung eingesetzt wird, ist die genaue Schutzwirkung noch nicht vollständig erforscht. Es ist jedoch bekannt, dass es noch immer eines der effektivsten Mittel gegen Kälteschock ist und die lebenswichtigen Funktionen des Spermiums, die für eine erfolgreiche Befruchtung notwendig sind, aufrechterhält. Bezüglich Kälteschock und Gefrierschäden ist die „low-density lipoprotein“ Fraktion (LDF) derjenige Anteil, der hauptsächlich Schutz bietet. Man vermutet, dass es zu einer Verbindung zwischen Spermienmembran und LDF kommt und so einen Teil der Schutzwirkung entfaltet wird. Eine weitere Hypothese stützt sich darauf, dass die Eigelb- LDF einen Verlust von Phospholipiden aus der Membran verhindert und somit auch Kälteschock besser toleriert wird. In einer weiteren Studie geht man davon aus, dass es zwischen LDF und BSP- Proteinen des Seminalplasmas (BSP-A1/A2, BSP-A3 und BSP-30-kDa; siehe auch in Pkt. II.5.) zu Interaktionen kommt, die auch nach dem Auftauen noch bestehen. Bei der Ejakulation und der damit verbundenen Seminalplasma-Sekretion werden diese BSP-Proteine an die Spermienoberfläche gebunden und stimulieren einen Cholesterin- und Phospholipid-Efflux aus der Spermienmembran. Dies kann die Motilität und später die Befruchtungsfähigkeit beeinträchtigen und wird durch LDF verhindert. Interessanterweise konnte man bei eigelbhaltigen Verdünnern den umgekehrten Effekt beobachten, so dass es zu einer Zunahme an Cholesterin und Phospholipiden in der Zellmembran kam und weniger BSP an die Spermienoberfläche gebunden wurden (BERGERON A et al. 2004). Aus der Humanmedizin gibt es jedoch auch Studien, die aufgetretene anaphylaktische Reaktionen mit LDF in Beziehung setzen, da diese Proteine eine geringe antigene Wirkung haben können (BUSCH W u. HOLZMANN A 2001).

In den letzten Jahren wurden einige neuartige Verdüner entwickelt, die als Ersatz des Eidotters pflanzliches Lecithin - ein Sojabohnen-Extrakt - enthalten. In einer Arbeit von BOUSSEAU S (1998) konnte nachgewiesen werden, dass - egal aus welcher Quelle das Eigelb für den Verdüner stammte, von ganzen Eiern aus landwirtschaftlichen Betrieben (100 – 200 Colony forming units/ ml) oder industriell ($>10^5$ CFU/ml) verarbeitet in flüssiger oder pulverisierter Form - immer eine gewisse bakterielle Kontamination vorhanden ist, die bei dem Verdüner ohne tierische Produkte, in diesem Fall Biociphos Plus® (0 CFU/ml; IMV, L'Aigle, France), nicht entdeckt werden konnten. Trotz der Anwesenheit von Antibiotika konnte die Keimbelastung nicht vollständig beseitigt werden, wobei der eigelbhaltige Verdüner Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) als antibakterielle Zusätze Gentamicin (250 µg/ml), Tylosin (50µg/ml) Lincomycin (150µg/ml) und Spectinomycin (300µg/ml) in praxisüblichen Konzentrationen enthielt.

In einer weiteren Studie (THUN R u. HURTADO M 2002) verglich man Tris-Eigelb-Verdüner auf Citrat-Puffer-Basis mit dem gleichen lecithinhaltigen Verdüner (Methode C) wie in dem vorher genannten Experiment. Dabei wurde bei dem eigelbhaltigen Medium noch unterschieden zwischen Pailletten, die bei 5°C (Methode A) und bei Raumtemperatur (Methode B) abgefüllt worden waren. Die untersuchten Qualitätsparameter waren Motilität, Anteil morphologisch normaler Spermien, sekundäre Spermenschäden und hypoosmotischer Schwelltest. Daraus ging hervor, dass Methoden A und B einen signifikant besseren Schutz der Spermien gewährleisteten als die dritte Methode mit Lecithin als Eigelbersatz. In Bezug auf progressive Motilität war auffällig, dass diese ebenfalls für A und B signifikant besser war als für C. Bei einer subjektiven Beurteilung derselben schätzte man die Geschwindigkeit der in Biociphos Plus® verdünnten Probe höher ein und die Sichtbarkeit der Spermien war in diesem Medium wesentlich besser als in dem anderen. Die schnellere Bewegung könnte auf die

niedrigere Viskosität des Verdünners zurückzuführen sein und wird auch so von anderen Studien bestätigt (DUMONT P et al. 1995; MÜLLER-SCHLÖSSER F et al. 1995). Außerdem scheint Eigelb einige spezifische Komponenten wie Lecithin, Phospholipide und Lipoprotein-Fractionen zu enthalten, die dazu beitragen, dass es zu Zusammenlagerungen von Eigelbanteilen kommt, die bei der mikroskopischen Beurteilung der Spermienbewegung das Ergebnis negativ beeinflussen können. Bei dem eigelblosen Verdünner konnte man im hypoosmotischen Schwelltest nach dem Einfrier- und Auftauvorgang eine Beeinträchtigung der Membranintegrität feststellen. Aus den genannten Gründen kam man in dieser Studie zu dem Ergebnis, dass der auf Sojabohnenextrakt basierende Verdünner die Spermien weniger effektiv vor Schäden bewahren kann, die bei der Verarbeitung von Ejakulaten auftreten können. Am besten schnitt dabei die Verdünnung mit Tris-Eigelb ab, die bei Raumtemperatur abgefüllt worden war. Bezüglich der Befruchtungsergebnisse gab es nur signifikante Unterschiede, wenn man die beteiligten Rassen getrennt betrachtete. Die Methode A war für Simmental-Samen und Methode C für Holstein am besten geeignet (THUN R u. HURTADO M 2002).

Eines der größten Probleme beim Gebrauch von lecithinhaltigen Verdünnern war bis vor einiger Zeit, dass das Sojabohnen-Extrakt in wässrigen Lösungen nicht löslich ist und somit nur eine relativ instabile Suspension bildet. Wenn es nicht sehr gut gerührt wird, kann es teilweise ausfallen und eventuell Lysolecithin bilden, das spermientoxisch ist. In den aktuellen kommerziellen, eidotterfreien Verdünnern ist es mittlerweile gelöst enthalten, so dass keine spermientoxische Wirkung mit dieser Ursache zu erwarten ist (JONES RC 1976).

Was Biociphos Plus® angeht, wurden in verschiedenen Studien im Vergleich zu anderen Lecithinhaltigen und eigelbhaltigen Medien eher negative Erfahrungen gemacht (GIL J et al. 2000; THUN R u. HURTADO M 2002). In einem Laborversuch von IFN Schönow mit Biociphos Plus® und einem eidotterhaltigen Kontrollverdünner kam es bei der Testung höher verdünnter Spermachargen (5x10⁶ Spermien/ Paillette) zu einem stärker ausgeprägten Motilitätsverlust im erst genannten Medium nach 120-minütiger Inkubation im Thermoresistenztest. Der gleiche Verdünner ergab in einem Feldversuch, der von Holland Genetics mit ebenfalls verringerten Spermienzahlen durchgeführt wurde, schlechtere Befruchtungsergebnisse. Dies gilt jedoch nicht für lecithinhaltige Verdünnungsmedien im Allgemeinen (NEHRING H u. ROTHE L 2002). In einer weiteren Studie hingegen schnitt der eigelblose Verdünner AndroMed® (Minitüb, Landshut, Deutschland) zumindest im Feldversuch signifikant besser ab als der damit im Vergleich stehende TRIS- Eigelb-Verdünner (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW AM et al. 2000). Die dazu durchgeführten Untersuchungen im Labor ergaben nur in Bezug auf die Motilität eine verminderte Rate des eigelbhaltigen Verdünnungsmediums im Resistenztest. Als Ursache wurde auch hier auf die unterschiedlichen Viskositätsgrade hingewiesen, aber auch, dass eine Erhöhung derselben in Verbindung mit partikelförmigem Debris eine schlechtere Befruchtungsrate bewirken kann (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW AM et al. 2000). Demzufolge können auch physikalische Bedingungen des Mediums die Spermienfunktion und somit auch den Befruchtungserfolg beeinträchtigen (AIRES VA et al. 2003). Gil et al interpretierten das veränderte Bewegungsmuster der Spermien auf eine völlig andere Weise. In dieser Studie wurden für Versuchschargen, die einerseits mit Biociphos Plus® und andererseits mit Triladyl® verdünnt wurden und in einem 6-stündigen Thermoresistenztest (20-22°C) mit Computer-assistierter Technik untersucht wurden, für die eigelblose Variante durchwegs höhere Werte für alle analysierten Motilitätsparameter festgestellt. Hier geht man davon aus, dass dieses Phänomen auch mit einem beginnenden Hyperaktivierungsprozess der Spermien erklärt werden könnte (GIL J et al. 2000).

Einem anderen Bericht (HINSCH E et al. 1997) zufolge, wurden für aufgetaute Proben des gleichen eigelblosen Verdünners ein größerer Anteil an Spermien mit linearer Beweglichkeit nachgewiesen als in dem Medium, welches Eigelb enthielt (Triladyl®). In der gleichen Arbeit wurde im Resistenztest nach 5 und 8 Stunden Lagerzeit eine signifikante Verschlechterung der Motilität in dem Produkt mit tierischem Eiweiß im Gegensatz zum lecithinhaltigen Verdünner mit Hilfe von CMA-Einsatz dokumentiert.

Eine weitere Arbeit beschreibt einen Laborversuch, in dem man Nebenhodensperma mit dem synthetischen Samenverdünner AndroMed® und Triladyl® versetzte und außerdem teilweise 10% homologes Seminalplasma hinzugefügt wurde. Man kam zu dem Ergebnis, dass ein Trend zu besserer

Vorwärtsbeweglichkeit für das eigelblose Medium erkennbar war, wenn beide Verdüner ohne Seminalplasma verwendet wurden. Zwei Stunden nach dem Auftauen war die Motilität für die Variante Triladyl® mit Seminalplasma höher als für die gleiche Variante mit AndroMed®. Was die Anzahl lebender Spermien und die Unversehrtheit des Akrosoms anging, so gab es keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Varianten (HEROLD FC et al. 2002).

Im Rahmen der bovinen in-vitro Produktion führten Mahabir et al. (2002) ebenfalls Experimente zum Vergleich eigelhaltiger und eigelbloser Samenverdünner durch. Da es nach in-vitro Fertilisierung mit Sperma, welches mit den beiden zuletzt genannten Verdünnern verarbeitet worden war zu keinen Unterschieden in der Teilungs- und Blastozystenrate kam, wurde daraus gefolgert, dass der Einsatz beider Tiefgefriermedien zu qualitativ gleichwertigen Ergebnissen führt (MAHABIR E et al. 2002). Schneider et al. (2002) testeten die gleichen Medien, indem sie die Sensibilität der Spermien gegenüber kapazitationsauslösenden (spontan, Heparin) beziehungsweise Akrosomreaktion induzierenden (spontan, Heparin, Ca-Ionophor) Vorgängen. Dabei waren die Reaktion innerhalb einer Spermienpopulation auf die adäquaten Stimuli der genannten Vorgänge, sowie ihr Verhalten im homologen Zonabindungstest Endpunkte der Betrachtung. Auch hier kam man zu dem Ergebnis, dass im geschilderten in-vitro Laborversuch im Allgemeinen keine statistisch fassbaren Unterschiede sichtbar wurden, jedoch bullenindividuelle Abweichungen im Ergebnis möglich sind (SCHNEIDER H et al. 2002).

Jedes der aufgeführten Verdünnermedien hat demnach seine Vor- und Nachteile, und man ist nach wie vor damit beschäftigt, die optimale Variante für den Praxiseinsatz zu finden. Auch in den Besamungsstationen sind die Meinungen diesbezüglich gespalten, doch die Notwendigkeit einen Ersatz für Eigelb zu finden, ist offensichtlich. In Hinblick auf zukünftige Qualitäts-Standard-Bedingungen, erscheint eine Entwicklung von Verdünnern ohne Eigelb ebenfalls notwendig. Sowohl Feldversuche als auch spezifische in-vitro Spermientestverfahren unterschiedlicher eigelbfreier und eidotterhaltiger Medien gaben in den letzten Jahren wiederholt Hinweise auf die qualitative und funktionelle Vergleichbarkeit dieser verschiedenen Formulierungen (HURTADO MORALES MP 1998; MÜLLER-SCHLÖSSER F et al. 1995; MÜLLER-SCHLÖSSER F et al. 2000; MÜLLER-SCHLÖSSER F et al. 2001), und dass ein standardisierbares und sterilisierbares Produkt besonders im Hinblick auf weltweiten Spermahandel notwendig ist, darüber ist man sich mittlerweile einig. Ob der Einsatz von lecithinhaltigen Medien die letztendlich beste Lösung ist, wird sich zeigen. Die Tatsache, dass gentechnische Manipulation vor allem beim Sojaanbau eine wichtige Rolle spielt und diese Entwicklung in der Landwirtschaft nicht unumstritten ist, sollte man dabei nicht vergessen (GIL J et al. 2000).

4. Vergleich von Gefrier- und Flüssigkonservierung

Das durchschnittliche Ejakulat eines Bullen enthält zwischen 3,6 und 12x 10⁹ Spermien. Bei der Verarbeitung zu flüssig konservierten Samen ist ein Minimum von 2,5 Millionen Spermien pro Inseminationsportion notwendig. Somit könnte jedes Ejakulat theoretisch zwischen 1440 und 4800 Besamungsportionen hervorbringen. Wenn man ein Bullenejakulat jedoch in tiefgefrorenem Zustand konserviert, so bedeutet das nur eine Ausbeute von 180 bis höchstens 600 Portionen (SCHUH H 1992). Dies basiert auf der Tatsache, dass trotz modernster Einfriermethoden die Überlebensraten bei der Flüssigkonservierung viel höher sind, als bei der Gefrierkonservierung und man mit viel geringeren Spermienzahlen arbeiten kann als bei der letztgenannten Technik (VISHWANATH R u. SHANNON P 2000). Dies dürfte zweifellos der größte Vorteil der Flüssigkonservierung sein, da man den wirtschaftlichen Erfolg nicht außer acht lassen darf, den man mit Spitzenbullen, deren Samen in einer höheren Preisklasse vermarktet werden kann, erzielen kann. In Neuseeland geht man davon aus, dass man dank „Frischsamen“ die Samenproduktionskapazität eines Bullen während der Inseminationsaison zu über 90% ausnutzen kann. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Spermienzellen verschiedener Bullen mehr oder weniger empfindlich auf den Einfrier- und Auftauvorgang reagieren. Schon die Genetik alleine kann bewirken, dass – egal welche Art der Konservierung man wählt - einige Tiere Befruchtungsraten von 72% und andere von nur 62% erzielen. Als optimale Spermienkonzentration würde man 2,5 Millionen für „Frischsamen“ bzw. 20 Millionen Samenzellen pro Inseminat für Tiefgefriersamen bezeichnen, während 0,5 bzw. 5 Millionen Spermien pro Besamungsdosis als suboptimal zu betrachten

wären (VISHWANATH R u. SHANNON P 2000). Interessant ist dabei, dass bei so genannten sub-optimalen Spermienkonzentrationen das Befruchtungsergebnis aller Tiere um etwa 7% abfällt. Durchschnittlich fällt die Fertilitätsrate bei gefrierkonserviertem Sperma um 7,9%, bemerkenswerterweise aber bei einigen Bullen um 20%, während diese Rate bei anderen Tieren unverändert hoch bleibt. Es ist somit als ein Problem anzusehen, dass der Samen einiger Bullen schon aufgrund seiner Genetik besser oder weniger gut für Kryokonservierung geeignet ist (VISHWANATH R 2000; VISHWANATH R u. SHANNON P 2000). Dazu kommt natürlich auch die Tatsache, dass die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Befruchtung mit reduzierten Spermienzahlen ebenfalls sinkt. Beim Einsatz von gefrierkonserviertem Sperma geht man davon aus, dass das „Überlebensmuster“ der Spermien sich von dem flüssigkonservierten Samens unterscheidet und auch deshalb die Befruchtungsraten etwas weniger hoch sind (SHANNON P u. VISHWANATH R 1995). Möglicherweise könnte auch das für alle Bullen – im Routinebetrieb normalerweise übliche- einheitliche Einfrierprotokoll dafür mitverantwortlich sein, dass die Fertilität einiger Bullen bei Kryokonservierung stark abfällt. Eine individuelle Anpassung an einzelne Tiere wäre eventuell sinnvoll und müsste im einzelnen Fall erforscht werden.

Die Aufbewahrungskosten für flüssigkonservierten Samen sind vergleichsweise sehr gering, wenn man mit Anschaffungskosten für Stickstoffbehälter und den ständigen Bedarf an flüssigem Stickstoff rechnet, der nicht nur für die Besamungsstation sondern auch für die Außenstellen benötigt wird. Wenn dieser nicht regelmäßig gewährleistet wird, können große Mengen wertvollen Samens rasch unbrauchbar werden und einen enormen wirtschaftlichen Verlust bedeuten (VISHWANATH R u. SHANNON P 2000). Aus diesem Grund ist die Verbreitung kryokonservierten Spermias in weniger entwickelten Ländern noch immer relativ begrenzt, da die häufig mangelhafte Infrastruktur eine regelmäßige Versorgung mit N₂ nicht immer zulässt (SCHUH H 1992). Auch für die Besamungstechniker ist der Umgang mit flüssigkonserviertem Samen viel unkomplizierter, da der Auftauvorgang wegfällt, welcher für die Samenqualität von großer Bedeutung ist.

Man kann zwar davon ausgehen, dass der wirtschaftliche Vorteil eines „Frischsamen“-Einsatzes signifikant ist, wenn innerhalb der begrenzten Einsatzdauer die Nutzung der Besamungsportionen hoch ist. Gleichmaßen ist die limitierte Einsatzdauer aber auch dessen größter Nachteil. Diese ist für kryokonservierten Samen zeitlich nahezu unbegrenzt und stellt deshalb seine wichtigste positive Eigenschaft dar. Durch diese Methode kann die Genetik wertvoller Tiere nahezu unbegrenzt erhalten und für die Zucht genutzt werden. Vor allem heute, wo weltweiter Handel auch im landwirtschaftlichen Sektor eine immer größere Rolle spielt, wäre dies mit flüssigkonserviertem Sperma undenkbar. Der Aufwand für die Logistik eines sehr schnellen Transportes wäre nicht angemessen, besonders wenn man dies im Vergleich mit den Vorteilen tiefgefrorenem Samens betrachtet. Mit kryokonserviertem Samen kann eine nahezu unbegrenzte Haltbarkeit gewährleistet werden. Aus diesem Grund ist die weltweit am meisten genutzte Konservierungsmethode die der Gefrierkonservierung. Vor allem in einem europäischen Industriestaat wie Deutschland hat sich die Tiefgefriermethode schon seit langem durchgesetzt. Saisonale Besamungen sind hier nicht üblich und das Interesse am Weltmarkt teilzuhaben ist so stark ausgeprägt, dass hier nur Flüssigkonservierung von Sperma einiger weniger Spitzenbullen auf Bestellung rentabel ist. Auch der logistische Aufwand in Verbindung mit der nur auf wenige Tage begrenzten Haltbarkeit machen diese Konservierungsmethode für viele Besamungsorganisationen wirtschaftlich weniger interessant, da ja auch die Notwendigkeit durch eine extrem hohe Auslastung der Bullen in der Besamungssaison nicht wie in Neuseeland gegeben ist (SCHUH H 1992).

Um von den genannten Vor- und Nachteilen der beiden Produktionsmethoden möglichst nur die positiven Eigenschaften selektieren zu können, kann es für den wirtschaftlichen Erfolg einer Besamungsstation durchaus sinnvoll sein, beide Konservierungstechniken situationsbedingt je nach Bedarf anzuwenden. Besonders für den Samen von Elitebullen, für den eine außergewöhnlich große Nachfrage besteht, wäre diese Art der Spermakonservierung angebracht.

5. Einsatz von Antioxidanzien in der Spermakonservierung

Heutzutage leidet beim Menschen eines von sieben Paaren während ihrer reproduktiv aktiven Phase zeitweise unter Infertilität, wobei man die Ursache hierfür in bis zu 50% der Fälle beim männlichen Partner findet (SIKKA u. SURESH C 2004). Als einer der Gründe dafür wird die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species: ROS) innerhalb des männlichen Reproduktionstraktes diskutiert, da man bei Auftreten in hohen Konzentrationen mit toxischen Effekten auf Spermienqualität und Funktionen der Samenzellen rechnen muss. Es handelt sich bei ROS um hoch reaktive oxidierende Verbindungen, die in die chemische Klasse der freien Radikale eingeordnet werden (AITKEN RJ u. FISHER H 1994). Ein freies Radikal ist definiert als „ein Atom oder Molekül, das ein oder mehr ungepaarte Elektronen besitzt“ (WARREN JS et al. 1987).

Zu den zellulär produzierten reaktiven Sauerstoffmetaboliten gehören unter anderem das Superoxidanion (O_2^-), das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder das Hydroxylradikal (OH^\cdot) (GILLISSEN A 1995). Zu „oxidativem Stress“ kommt es dann, wenn oxidierende Verbindungen den Antioxidanzien gegenüber in der Überzahl auftreten (SIES H 1993), Peroxidationsprodukte entstehen (SPITTELER G 1993) und wenn dieses Phänomen wiederum pathologische Folgen hat (JANSSEN YM et al. 1993). Zahlreiche Krankheiten wie zum Beispiel Krebs, Infektionskrankheiten, Entzündungen, erworbenes Immunodefizienzsyndrom und Unfruchtbarkeit werden mit oxidativem Stress in Zusammenhang gebracht (AITKEN RJ et al. 1992; AITKEN RJ et al. 1995a; CLARK IA et al. 1986).

Interessanterweise geht man in der Humanmedizin davon aus, dass hohe Konzentrationen von ROS in den Ejakulaten von 25-40% aller unfruchtbaren Männer vorkommen (DE LAMIRANDE E et al. 1995; PADRON OF et al. 1997). Allerdings gibt es auch Beweise dafür, dass eine gewisse Menge dieser hochreaktiven Gruppen für eine physiologische Entwicklung der Samenzellen und das Erlangen ihrer Befruchtungsfähigkeit notwendig ist (AITKEN RJ 1999). Sobald jedoch das Gleichgewicht zwischen der Produktion und den unschädlich machenden Komponenten von ROS außer Kontrolle gerät, können normale Spermienfunktionen beeinträchtigt werden (DE LAMIRANDE E et al. 1997).

Vor allem bei der Kontrolle der Kapazitationsreaktion (DE LAMIRANDE E u. GAGNON C 1993a; DE LAMIRANDE E u. GAGNON C 1993b; GRIVEAU JF et al. 1994), der Hyperaktivierung (DE LAMIRANDE E u. GAGNON C 1993a; DE LAMIRANDE E u. GAGNON C 1993b), der Akrosomreaktion (DE LAMIRANDE E et al. 1993; GRIVEAU JF et al. 1995b) und der Fusion von Spermium und Oozyte (AITKEN RJ et al. 1995b; AITKEN RJ et al. 1998) scheinen reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle zu spielen. Auch in anderen Studien geht man davon aus, dass ROS in sehr geringer Anzahl das Fertilitätsgeschehen positiv beeinflussen (SIKKA u. SURESH C 2004). Physiologisch werden sie in den Mitochondrien im Rahmen des aeroben Stoffwechsels bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser gebildet. Sie funktionieren als Transmitter zur Einleitung der Kapazitation und Akrosomreaktion. So geht man beispielsweise davon aus, dass die zuletzt genannten beiden wichtigen Prozesse in der Reproduktion durch die Anwesenheit von H_2O_2 und O_2^- induziert werden, die in diesem Fall wahrscheinlich von Spermatozoen - und zwar extrazellulär und nicht intrazellulär - gebildet werden (DE LAMIRANDE E et al. 1997). Die gleichen für das Fortpflanzungsgeschehen unerlässlichen Reaktionen können aber durch die bei einem „oxidativen burst“ von Leukozyten freigesetzten unphysiologisch hohen ROS-Mengen wiederum beeinträchtigt werden. Laut einiger Studien sind peroxidase-positive Leukozyten die Hauptquelle für hohe ROS- Gehalte in Samen (AITKEN RJ et al. 1995b; RAJASEKARAN M et al. 1995; TOMLINSON MJ et al. 1993). Dazu gehören die polymorphkernigen Leukozyten, die 50% bis 60% aller Leukozyten im Seminalplasma darstellen und auch die Makrophagen, welche weitere 20% bis 30% davon ausmachen (FEDDER J et al. 1993; THOMAS J et al. 1997; WOLFF H u. ANDERSON DJ 1988). Peroxidase- positive Leukozyten gelangen vor allem aus der Prostata und den Seminalvesikeln in das Ejakulat (WOLFF H 1995). Aktivierte Leukozyten können 100 mal mehr ROS produzieren als inaktive (PLANTE M et al. 1994). In den aktiven Zustand gelangen sie durch vielerlei Stimuli, jedoch vor allem durch Entzündungs- oder Infektionsgeschehen (PASQUALOTTO FF et al. 2000). Allerdings fanden Sharma et al. heraus, dass oxidativer Stress von Leukozyten in Seminalplasma ausgehen kann, obwohl die von der WHO

festgesetzte Grenze für eine Leukozytospemie ($<1 \times 10^6$ Peroxidase-positive Leukozyten/ ml Samen) noch nicht überschritten wurde (SHARMA RK et al. 2001).

Eine erhöhte ROS-Bildung im Ejakulat wird mit einer erhöhten DNA-Oxidation in den Spermatozoen, Motilitätsverlust, verminderte Fähigkeit zur Spermium-Oozytenfusion und Infertilität assoziiert (OCHSENDORF FR u. PODDA M 1999). Durch defekte Spermatozoen (AITKEN RJ et al. 1989b; AITKEN RJ et al. 1994a) oder die schon oben genannten kontaminierenden Leukozyten (AITKEN RJ et al. 1994b; AITKEN RJ et al. 1995a; AITKEN RJ u. WEST KM 1990) kann es zu einer Zunahme der ROS kommen, die den Samenzellen funktionelle Schäden zufügen können. De Lamirande et al. führten folgende Schäden an, die durch ROS bedingt sein können: ATP- Abbau, was unzureichende axonemale Phosphorylierung mit sich bringt, Lipidperoxidation und Motilitätsverlust, aber auch vermehrt totes Zellmaterial (DE LAMIRANDE E et al. 1997). In der gleichen Studie wird beschrieben, dass die Auswirkungen abhängig sind von der Balance zwischen ROS- Produktion und dagegen eingesetzte Abwehrmechanismen. Es ist berichtet worden, dass das Seminalplasma von fertilen Männern eine höhere antioxidative Gesamtkapazität aufweist als das Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen unfruchtbarer Männer (LEWIS SEM et al. 1995). Allerdings ist es eher wahrscheinlich, dass der pathologisch erhöhte ROS- Spiegel der zweiten Gruppe das Ergebnis gesteigerter ROS- Produktion und nicht das einer eingeschränkten antioxidativen Kapazität ist (ZINI A et al. 1993b).

Aber auch der Zeitpunkt und die Lokalisation der Spermien, an denen es zum Kontakt mit ROS kommt, bestimmen den Einfluss, den diese auf die Fertilität haben. Kleine Mengen an ROS, die gering genug sind, die Motilität von Spermien während einer 6-stündigen Inkubation nicht zu verschlechtern, bedingen eine reduzierte Fähigkeit der Samenzellen in den Zustand der Hyperaktivierung zu gelangen und bewirken somit auch Probleme bei der mit Calcium-Ionophor (A23187) induzierten Akrosomreaktion (GRIVEAU JF et al. 1995a). Mittelgradige ROS- Konzentrationen haben einen reversiblen Motilitätsverlust und den oben schon genannten ATP-Abbau und insuffiziente axonemale Protein Phosphorylierung zur Folge (DE LAMIRANDE E u. GAGNON C 1992a; DE LAMIRANDE E u. GAGNON C 1992c). Durch letztere erklärt man sich auch die Immobilisierung vieler Spermien und eine reduzierte Membranfluidität, was wiederum die Spermien- Oozytenfusion beeinträchtigt.

In einer weiteren Hypothese geht man davon aus, dass H_2O_2 durch Membranen diffundieren und ins Zellinnere gelangen kann und dabei Enzyme wie zum Beispiel die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G_6PD) inhibieren kann, welche den Glukose-Fluss durch den Hexose-Monophosphat- Transportweg kontrolliert. Diese Transporteinrichtung ist auch für die Verfügbarkeit von Nikotin- Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) zuständig, welches den Spermatozoen auch als Elektronenquelle für die ROS-Produktion durch die NADPH- Oxidase dient (AITKEN RJ et al. 1997). Eine Hemmung von G_6PD führt zu einer verminderten NADPH- Verfügbarkeit und demzufolge auch zu einer Akkumulation von oxidiertem und reduziertem Glutathion, was die antioxidativen Verteidigungsmechanismen der Samenzellen beeinträchtigen kann und somit die Peroxidationsprozesse in der Zellmembran steigert (GRIVEAU JF et al. 1995a).

In einer anderen Studie führt man Strukturveränderungen vor allem in der akrosomalen Region, einen schnellen und – in diesem Fall - irreversiblen Motilitätsverlust, Veränderungen des Metabolismus und das Freisetzen von intrazellulären Komponenten auf peroxidative Prozesse zurück (JONES R u. MANN T 1977a).

Physiologisch wird Spermien-DNA durch ihre charakteristisch kompakte Form und die im Seminalplasma vorhandenen Antioxidanzien geschützt (TWIGG J et al. 1998a). Bei Kontakt mit künstlich erzeugten ROS konnte man signifikant höhere DNA-Schäden beobachten, wie zum Beispiel Modifikation aller Basen, das Auftreten von basenfreien Verbindungen, Deletionen, Frame- shifts, DNA-Cross-Links und chromosomale Veränderungen (DURU NK et al. 2000), wie auch DNA-Strangbrüche (AITKEN RJ u. KRAUSZ C 2001; TWIGG J et al. 1998a). In der Humanmedizin sieht man es nahezu als erwiesen an, dass ein hoher Druck durch reaktive Sauerstoffmetabolite DNA-Fragmentation bewirkt (KODAMA H et al. 1997; LOPES S et al. 1998). Besonders heute, wo der Einsatz von intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (Intracytoplasmatic sperm injection: ICSI) aus der humanen

Reproduktionsmedizin nicht mehr weg zu denken ist, stellt genau diese Art der assistierten Reproduktion ein Risiko dar, da man eine natürliche Selektionsbarriere umgeht, indem das genetische Material direkt in die Oozyte injiziert wird, ohne mögliche Schäden vorher ausschließen zu können, die das entstehende Lebewesen stark beeinträchtigen könnten oder gar die Lebensfähigkeit nicht zulassen. Beim Einsatz DNA – geschädigter Spermien in der intrauterinen Insemination oder in-vitro Fertilisation würden solche Samenzellen natürlicherweise durch damit verbundene Membranschäden von der Befruchtung ausgeschlossen werden und wären damit auch kein Grund zur Besorgnis (AITKEN RJ 1999; TWIGG J et al. 1998b).

Bei hohen Konzentrationen an ROS, die entweder durch Spermien selbst (AITKEN RJ u. CLARKSON JS 1987; ALVAREZ JG et al. 1987), durch Kombinationen von Xanthenen und Xanthine-Oxidase (AITKEN RJ et al. 1993), oder durch Eisen (Fe^{2+}) und Ascorbinsäure (AITKEN RJ et al. 1989a) produziert wurden, kam es in einem weiteren Experiment zum Auftreten von toxischen Lipidperoxiden.

In einer anderen humanmedizinischen Studie geht man außerdem davon aus, dass es eine Verknüpfung zwischen schlechter Samenqualität und gesteigerter ROS-Produktion und einem vermehrten Auftreten von Zytoplasmatröpfchen gibt, welche während der Nebenhodenpassage normalerweise abgeschnürt und abgestoßen werden, um überflüssiges Zytoplasma aus den reifen Spermien zu entfernen. Gehäuftes Auftreten weist auf unreife Spermien hin, die nicht voll funktionsfähig sind (HUSZAR G et al. 1997). In dieser Arbeit konnte eine positive Korrelation von Zytoplasmatröpfchen im Ejakulat mit ROS-Produktion beobachtet werden, was möglicherweise durch das Enzym G₆PD gesteuert wird (AITKEN RJ 1999).

Weil die Plasmamembran von Spermienzellen zu einem großen Anteil aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids: PUFAs; ALVAREZ JG u. STOREY BT 1995) aufgebaut ist, und ihr Zytoplasma nur geringe Konzentrationen von antioxidativen Enzymen enthält (AITKEN RJ u. FISHER H 1994; DE LAMIRANDE E u. GAGNON C 1995), sind diese Zellen besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress. Außerdem können intrazelluläre Antioxidanzien die Zellmembran, die das Akrosom und den Spermischwanz umgibt, nicht schützen, was die Zelle dazu zwingt, sich ganz auf die antioxidativen Eigenschaften des Seminalplasmas zu verlassen (IWASAKI A u. GAGNON C 1992).

Zusammen mit dem Seminalplasma sind Spermien natürlicherweise mit folgenden Abwehrmechanismen gegen ROS ausgestattet:

- Enzyme wie zum Beispiel Superoxiddismutase (SOD (ALVAREZ JG et al. 1987; NISSEN HP u. KREYSEL HW 1983), Catalase (JEULIN C et al. 1989) und das Glutathion- Peroxidase/ Reduktase-System (ALVAREZ JG u. STOREY BT 1989)
- eine Reihe von chemischen Verbindungen mit SOD- und Catalase-ähnlichen Aktivitäten (ZINI A et al. 1993a) wie zum Beispiel α - Tocopherol, Ascorbinsäure, Glutathion (HALLIWELL B u. GUTTERIDGE JMC 1989b), Pyruvat (DE LAMIRANDE E u. GAGNON C 1992b), Taurin, Hypotaurin und Albumin (ALVAREZ JG u. STOREY BT 1983)

Ohne Seminalplasma, zum Beispiel im Falle von Entzündungen des Hodens oder Nebenhodens sowie bei der Spermatozoenpräparation im Rahmen der assistierten Reproduktion, sind die Spermien den ROS deutlich ungeschützter ausgesetzt (OCHSENDORF FR u. PODDA M 1999). Falls zu dem Stress, der durch die Manipulation und die Verdünnung des Ejakulates normalerweise auftritt noch ein Kälteschock während des Abkühlens hinzu kommt, so wird die Sensibilität gegenüber Lipidperoxidation noch weiter erhöht (JONES R et al. 1978; JONES R u. MANN T 1976; JONES R u. MANN T 1977b).

Bilodeau et al. kamen zu dem Ergebnis, dass vor allem Bullenpermatozoen ohne den Schutz von Seminalplasma nur mit wenigen natürlichen Antioxidanzien ausgestattet sind. Die sehr geringen Konzentrationen an Glutathionperoxidase (GPx) und die vollständige Abwesenheit von Catalase in den Spermien könnten toxisches H_2O_2 nicht ausreichend unschädlich machen. Hinzu kommt noch, dass der Kryokonservierungsvorgang den GSH-Gehalt (reduziertes Glutathion) um 78% und die SOD-Aktivität um 50% reduziert (BILODEAU JF et al. 2000). In der gleichen Studie kam man außerdem zu dem Ergebnis, dass es bei einer 6-stündigen Inkubation (38,5°C) von frischen Spermien in Eigelbverdünner

unter aeroben Bedingungen zu einem stärkeren Abfall des intrazellulären GSH-Spiegels kommt, als unter begrenzter Sauerstoffverfügbarkeit. Die Arbeit macht deutlich, dass beim Einfrier- und Auftauvorgang oxidativer Stress auf die Samenzellen ausgeübt wird und hierbei besonders viele ROS freigesetzt werden, welche die Spermienfunktionen negativ beeinflussen. In einer anderen Arbeit wurde aufgezeigt, dass der im Routinebetrieb für die Gefrierkonservierung sehr häufig eingesetzte eigelbhaltige Tris-Verdünner (EYTG) nur sehr begrenzte antioxidative Eigenschaften besitzt. Dies wurde im Vergleich mit einem Medium festgestellt, welches üblicherweise in der in-vitro Inkubation von Bullensperma verwendet wird. Es handelt sich hierbei um TALP-Medium (PARRISH JJ et al. 1986). Es wurde beobachtet, dass in Eigelbverdünner die Spermienmotilität durch eine 20-fach geringere H₂O₂-Konzentration signifikant stärker abfiel, als in TALP-Medium. Ein Problem, das in EYTG verdünntem Samen auftritt ist, dass der Spiegel an reduziertem GSH nicht ausreichend aufrechterhalten werden kann. Man geht davon aus, dass NADPH, welches als Elektronenquelle für den Glutathion-Redoxzyklus fungiert, das fehlende Element sein könnte, welches GSSG (oxidiertes Glutathion) ermöglichen kann, eine gesteigerte Motilitätsrate der Spermien zu bewirken. Hinzu kommt, dass durch die Verdünnung mit EYTG der GSH-Gehalt des Seminalplasmas reduziert wird, was auch nicht durch den Verdünner kompensiert wird. Die Verarbeitung, der Umgang und die Lagerung des EYTG könnten ebenfalls dazu beitragen, das antioxidative Potential des Eigelbs zu verringern (BILODEAU JF et al. 2000). Eigelb enthält bekanntlich Lipoproteine mit antioxidativer Wirkung (YAMAMOTO Y u. OMORI M 1994), aber nur sehr wenige enzymatisch wirksame Substanzen wie α -Tocopherol und Carotinoide (GAAL T et al. 1995; SPEAKE BK et al. 1996; WILSON JX et al. 1992), welche nach ihrer Oxidierung nicht mehr regeneriert werden (BILODEAU JF et al. 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass die in Eileiterflüssigkeit enthaltene Catalase die Motilität von in EYTG konservierten Samen besser aufrechterhält als Catalase aus Rinderleberextrakt. Man konnte dabei eine spermenschützende Wirkung gegenüber Wasserstoffperoxid beobachten (BILODEAU JF et al. 2001).

Welche Vorteile könnte der Einsatz von Antioxidanzien mit sich bringen? Laut Sies bieten ihre Abwehrmechanismen Schutz auf dreierlei Ebenen (SIES H 1993):

1. Verhütung der ROS- Produktion
2. Unterbrechung der ROS- Bildungskaskade
3. Reparatur von Schäden

Was den ersten Punkt anbelangt, so bedeutet dies die Bindung von Metallionen, insbesondere Eisen- und Kupferionen, welche diese davon abhält als Cofaktoren eine Kettenreaktion in Gang zu setzen. Außerdem bilden bestimmte Antioxidanzien Chelatkomplexe mit Übergangsmetallen (transition metals), was ein Mittel zur Kontrolle von Lipidperoxidation und zur Vermeidung von DNA- Schäden darstellt. Übergangsmetalle können, wenn sie lose an Reduktionsprodukte gebunden sind, viel reaktivere Oxidanzien, wie zum Beispiel das Hydroxylradikal (OH \cdot), hervorbringen (HALLIWELL B 1990).

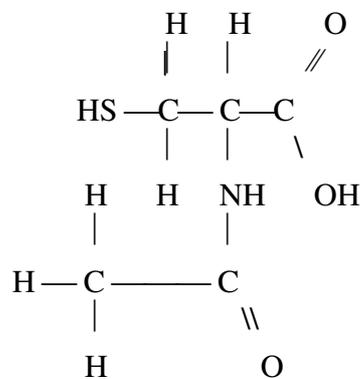
Zum zweiten Punkt der Abwehrmechanismen muss zunächst auf einige Eigenschaften von freien Radikalen hingewiesen werden. Träger eines ungepaarten Elektrons haben die Tendenz mit einer anderen Komponente zu reagieren, um wiederum Verbindungen mit ungepaarten Elektronen hervorzubringen und lösen dabei eine Kettenreaktion aus. Indem man diese Reaktion so lenkt, dass das Endprodukt keinen „Radikalcharakter“ aufweist, kann diese Kettenreaktion unterbrochen werden (SIES H 1993). Dies geschieht beispielsweise durch α - Tocopherol (Vitamin E), welches Membran-Lipidperoxidation durch das Beseitigen von Peroxyl- (RO \cdot) und Alkoxyl- (ROO \cdot) Radikalen verhindert. α -Tocopherol hat die Fähigkeit Peroxylradikal – Reduktion in der Zellmembran gemäßigt ablaufen zu lassen. Dabei ist es allerdings auf externe reduzierende Verbindungen wie Ascorbinsäure und Thiole angewiesen, die dieses recyceln (WEFERS H u. SIES H 1988). Das Peroxylradikal weist eine relative lange Halbwertszeit von mehreren Sekunden auf und kann deshalb im Gegensatz zum hochreaktiven Hydroxylradikal (10⁻⁹ Sec.) effizient bekämpft werden (SIES H et al. 1992; SIES H 1993).

In einigen Fällen können durch Antioxidanzien auch Schäden, die durch Oxidation entstanden sind, repariert werden. Aus Mangel an zytoplasmatischen Enzymen, die hierfür notwendig wären, können

Spermien diese Schäden nicht selbst beheben. Dies ist auch einer der Gründe, warum keine andere Zelle des Organismus für oxidativen Stress so empfänglich ist, wie die Samenzelle (AITKEN RJ et al. 1989a; ALVAREZ JG et al. 1987). Deshalb ist hier der Gedanke, Antioxidanzien von außen zuzuführen, besonders sinnvoll.

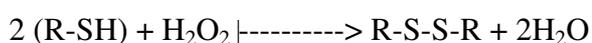
Die gleiche Forschergruppe, die herausfand, dass eine Verdünnung mit herkömmlichen Eigelb-Tris-Verdünnern den intrazellulären Gehalt an Thiolen stark reduziert, startete 2001 einen Versuch, in dem Vertreter dieser Klasse von Antioxidanzien in EYTG-Verdünnern eingesetzt wurden. Nach dem Auftauen wurde Bullensamen bei 38,5°C in luftdichten Tubes mit folgenden Thiolen für sechs Stunden inkubiert: Glutathion (GSH/GSSG), Cystein, N-acetyl-L-cystein (NAC) und 2-Mercaptoethanol (BILODEAU JF et al. 2001). Thiole sind Substanzen, die in ihrer Molekülstruktur eine SH-Gruppe besitzen. Diese SH-Gruppe wird durch freie Sauerstoffradikale leicht oxidiert, die ihrerseits zu unschädlicheren Reaktionsprodukten (O_2/H_2O) reduziert werden (HALLIWELL B u. GUTTERIDGE JMC 1989a).

Chemische Struktur des N-Acetylcystein:



Chemische Reaktion des Antioxidanz:

Oxidation



In dem genannten Versuch arbeitete man mit Varianten, denen teilweise oxidativer Stress zugefügt worden war, der durch den Einsatz von H_2O_2 (100µM) bewirkt wurde, während die Vergleichs-Varianten eine normale, möglichst schonende Behandlung erfahren hatten. Fügt man eines der Thiole in einer

Konzentration von über 0,5 mM hinzu, so konnte ohne oxidativen Stress über sechs Stunden eine hohe Motilitätsrate aufrechterhalten werden. In der Kontrollvariante ohne Antioxidanzzusatz nahm diese um das Neunfache ab. Beim Auftreten von oxidativem Stress war bei jeder Variante mit Antioxidanz 1 mMol notwendig, um effizienten Schutz zu bieten (BILODEAU JF et al. 2001). Weiterhin wurde festgestellt, dass die negative Wirkung von H_2O_2 auf die Spermienmotilität sich innerhalb von 15 Minuten nach Hinzufügen des Peroxids entfaltete und irreversibel war. So konnte man durch Entfernen der reaktiven Substanz nach dem genannten Zeitraum den Motilitätsverlust nicht verringern. NAC und Cystein waren in einer Konzentration von 1 mM hervorragend geeignet, in Anwesenheit von oxidativen Stress die Spermienmotilität zu erhalten. Sogar in einer niedrigeren Dosierung (0,2 mM) gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Zusätzen. Auch 2-Mercaptoethanol konnte den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies erfolgreich reduzieren. Die Autoren weisen jedoch darauf hin, dass noch weitere Studien notwendig sind, um verstehen zu können, wie hoch der intrazelluläre Spiegel von Thiolen für ein optimales Überleben und damit verbundener guter Motilität sein muss. Man vermutet außerdem, dass Spermienzellen die Fähigkeit haben, verschiedene Arten von Thiolen effizienter zu assimilieren als andere Zelltypen (BILODEAU JF et al. 2001).

Thiole sind eine große Gruppe von Antioxidanzien, zu denen unter anderem Cystein, N-Acetylcystein (NAC) und GSH gehören (VAN ZANDWIJK N 1995). NAC ist ein Analogon von Cystein, wird allerdings langsamer oxidiert und ist in wässrigen Lösungen stabiler und besser löslich als Cystein (BONANOMI L u. GAZZANIGA A 1980). Beide SH-Gruppenträger sind Vorläufer für die intrazelluläre GSH- Biosynthese, wobei letzteres ein in vielen Zellen ubiquitär vorkommendes Molekül ist, das mit einigen ROS direkt reagieren kann (MEISTER A 1994). Glutathion ist ebenfalls ein Cofaktor für die Glutathion- Peroxidase (GPx), welches die Reduktion von toxischem H_2O_2 und Hydroperoxiden katalysiert (Abb.4). Die oxidierte Form von Glutathion (GSSG) wird in vivo durch die Glutathion-Reduktase (GR) und NADPH regeneriert. NADPH wird normalerweise über den Hexose-Monophosphat-Transportweg geliefert (MEISTER A 1994).

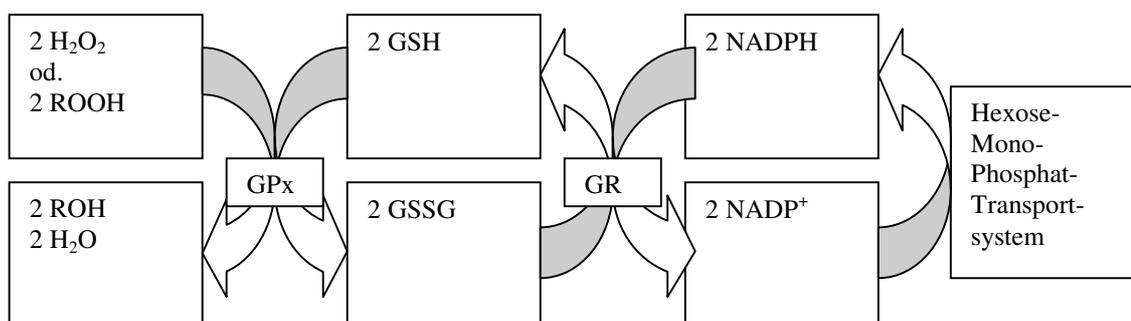


Abb. 4: Glutathion-Redoxzyklus (BILODEAU JF et al. 2001)

In einer weiteren Arbeit überprüfte man den Einfluss von Vitamin E und Vitamin C auf Tiefgefriersamen normaler Qualität und auf Spermien, die durch Kälteschock gezielt beschädigt worden waren. Die antioxidative Wirkung von Vitamin E (WITTING LA 1980) und Ascorbinsäure in hohen Konzentrationen (AFFRANCHINO MA et al. 1991; PRAT AG u. TURRENS JF 1990) bei der Lipidperoxidation ist bekannt, wie auch der protektive Effekt auf Plasmamembranen während des Tiefgefrierens und des Auftauvorganges (BECONI MT et al. 1991). Hier wird die Superoxiddismutase (SOD) als Schlüsselenzym gegen den möglichen toxischen Einfluss von Sauerstoff genannt, indem es die Dismutation von Superoxidanionen in Hydrogenperoxid und Sauerstoff katalysiert. SOD, Catalase und Glutathionperoxidase bekämpfen reaktive Sauerstoffspezies (WITTING LA 1980). Allerdings wird auch hier darauf hingewiesen, dass Spermien von Bulle, Schafbock und Eber nur sehr wenig - wenn überhaupt

- Catalase enthalten und somit zu wenig Schutz vor dem toxischen Potential des Hydrogenperoxids zu bieten haben (HOLLAND MK et al. 1982). In in-vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass Vitamin E als freier Radikalfänger fungiert, welches Zellmembranen gegen Lipidperoxidation bewahrt (LUCY JA 1972). Ascorbinsäure dagegen wirkt in niedrigen Konzentrationen als Oxidationsmittel und in hohen als Antioxidanz (AFFRANCHINO MA et al. 1991; MILLER MD u. AUST SD 1989). Bei dem genannten Versuch mit Tiefgefriersamen guter und mit Kälteschock behandelten Proben mit und ohne Zusatz von Vitamin E und Ascorbinsäure, kam man zu dem Ergebnis, dass beide Antioxidanzen einen signifikant protektiven Effekt auf die Proben mit guter Samenqualität ausübten, während dies bei den Samenproben schlechter Qualität nicht zu beobachten war. In den Proben guter Qualität war die anfängliche SOD-Aktivität höher als in den Kälteschock-behandelten Proben. Vitamin E und Ascorbinsäure bewirkten in den Proben guter Qualität, dass die Enzymaktivität besser aufrechterhalten wurde. Für die Proben schlechter Qualität konnte dies nicht im gleichen Maße beobachtet werden. Die Kontrollproben ohne antioxidativen Zusatz wiesen eine allgemein niedrigere SOD-Aktivität auf. Auch der Prozentsatz von Spermien mit intakter Akrosomregion war in Proben mit Vitamin E oder Ascorbinsäure signifikant höher, wobei die Ergebnisse der mit Kälteschock behandelten Proben signifikant schlechter waren als die der Proben mit Standardbehandlung. In dieser Studie kam man zu dem Ergebnis, dass in den Kälteschock-Proben der protektive Effekt der beiden Antioxidanzen auf die Plasmamembran nicht bestätigt werden konnte, weil es durch die bei der Verarbeitung eingesetzte rasante Abkühlung schon zu Membranveränderungen und zu Schäden der Mitochondrien gekommen war, ohne dass das protektive Agens überhaupt zugesetzt worden war (BECONI MT et al. 1993).

Bei der Flüssigkonservierung fand man heraus, dass auch allgemeine Veränderung der Bedingungen, die eine gesteigerte ROS-Produktion nach sich ziehen, so adaptiert werden können, dass Oxidationsvorgänge nicht gehäuft auftreten. Hier wären beispielsweise die Begasung mit Stickstoff (siehe auch Pkt. II.2.) und die damit verbundene Verdrängung des Sauerstoffs zu nennen (FOOTE R 1967; SHANNON P 1968; SHANNON P et al. 1984).

Ein Problem bei der Bekämpfung von oxidativem Stress ist sicherlich, dass das nötige Wissen darüber fehlt, wie hoch der ROS-Gehalt physiologischerweise in Samen ist. Nur wenn man hierzu ausreichend Erfahrung gesammelt hat, kann man auch Tests sinnvoll einsetzen, mit welchen man den ROS- Spiegel ermitteln und deren Ergebnisse dann in Relation zur antioxidativen Kapazität des Ejakulates setzen kann (RAMADAN A SALEH u. ASHOK AGARWAL 2002).

Eine mögliche Methode der Bekämpfung der Lipidperoxidation ist sicherlich der Zusatz von Antioxidanzen bei der Verarbeitung und Konservierung von Samen (BECONI MT et al. 1991; BILODEAU JF et al. 2001). Welche Konzentrationen welcher speziellen Zusatzstoffe jedoch notwendig sind, um einen optimalen Schutz vor ROS zu gewährleisten, ist zurzeit noch nicht ausreichend geklärt. Aus diesem Grund befasste man sich im experimentellen Teil dieser Arbeit mit dem Einsatz von N-Acetylcystein als Antioxidanz bei der Verarbeitung von Bullensamen.

6. Bedeutung des Seminalplasmas bei der Spermakonservierung

Jedes Ejakulat besteht nicht nur aus Spermien sondern auch aus dem Seminalplasma, d. h. aus weiteren Komponenten, die entweder ebenfalls aus den Hoden und Nebenhoden oder aber aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen stammen. Die Ergebnisse von Versuchen, bei denen man die sekundären Geschlechtsorgane entfernte, um die Notwendigkeit ihres Vorhanden seins zu testen, reichten von keinerlei Effekt auf die Fertilität im Falle von künstlicher Befruchtung, bis vollständiger Unfruchtbarkeit bei natürlichem Deckakt (DAVIS DC et al. 1975; PEITZ B u. OLDS-CLARKE P 1986; QUENN K et al. 1981).

Anatomisch betrachtet umlagern die akzessorischen Geschlechtsdrüsen die im Becken gelegene Harnröhre. Androgene aus dem Hoden steuern ihr prä- und postnatales Wachstum und ihre Sekretion. Der Wiederkäuer verfügt über vier Geschlechtsdrüsen: die Samenleiterpulle (Ampulla ductus deferentis), die Samenblasendrüse (Glandula Vesicularis), die Pars Disseminata der Prostata und die Harnröhrenzwiebelndrüse (Glandula Bulbourethralis). Es handelt sich bei allen um ein Drüsengewebe mit

tubuloalveolärem Charakter. Die Glandula Vesicularis produziert dabei den größten Teil des tierartspezifischen Sekrets. Die Pars Disseminata der Prostata wird erst durch die zu Beginn der Pubertät gesteigert einsetzende Androgensekretion voll ausgebildet. Sie bildet ein dünnflüssiges, farbloses Sekret, welches wichtige Enzyme wie zum Beispiel saure Phosphatase und Proteasen enthält. Dagegen produziert die Glandula Bulbourethralis eine schleimige Flüssigkeit, die saure und neutrale Mukopolysaccharide enthält.

Bezüglich des Volumens und der Inhaltsstoffe des Seminalplasmas gibt es eine biologisch bedingte große Variabilität, die keinerlei regulierenden Mechanismen unterliegt. Die Genetik des Einzeltieres spielt bei der Zusammensetzung eine wichtige Rolle (BUSCH W u. HOLZMANN A 2001). Die Durchschnittswerte beim Bullen liegen bei 4 ml mit einer Schwankungsbreite von 2 – 10 ml (KOLB E 1984; MANN T u. LUTWAK-MANN C 1981a). Der größte Teil des Seminalplasmas wird in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen gebildet, welche tierartlich unterschiedlich ausgebildet sind. Auch Sekret aus Epididymis und Rete-Testis ist am Seminalplasma beteiligt.

Im Allgemeinen besteht Seminalplasma aus folgenden Komponenten: Ionen und anorganische Bestandteile, kleine organische Moleküle, Steroide und Prostaglandine und Proteine, die meist als Enzyme ihre Wirkung entfalten (BUSCH W u. HOLZMANN A 2001). Zum Erhalt des osmotischen Gleichgewichtes dienen vor allem Natrium-, Kalium-, und Magnesium-Ionen, aber auch die zugehörigen Anionen und einige Kohlenhydrate. Fructose, Lactat und Pyruvat gehen auch als Substrate in den Stoffwechsel ein. Aus dem Epididymes stammt der Großteil an Mineralien und Spurenelementen (SCHEUNERT A u. TRAUTMANN A 1987).

Übersicht zu Konzentrationen (mMol) unterschiedlicher Substanzen im Seminalplasma von Bullen (nach SETCHELL BP u. BROOKS DE 1988):

Natrium	65 – 161
Kalium	13 – 97
Calcium	6 – 15
Magnesium	3,3
Chlorid	42 – 110
Phosphat	2,8
Bicarbonat	7
Fructose	17 – 56
Sorbitol	0,6 – 7,5
Inositol	1,3 – 2,6
Laktat	2,2 – 5,6
Pyruvat	0,6
Zitrat	18 – 52
Ascorbinsäure	0,3
Glycerophosphocholin	4 – 18
Glycerophosphoinositol	1,4
Ergothionein	Spuren

Hormonell wirksame Bestandteile stellen das Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und das Östrogen dar, wobei letzteres jedoch nur beim Eber in höherer Konzentration gebildet wird. Das $PGF_{2\alpha}$ kommt im Prostatasekret vor und zeigt eine kontraktile Wirkung auf glatte Muskulatur. Aus diesem Grund geht man davon aus, dass es auch in der Uterusmuskulatur seine Wirkung entfaltet und somit am Spermientransport im weiblichen Genitale beteiligt ist (HOFFMANN B 2003).

Auch zahlreiche neutrale—Aminosäuren (Alanin, Cystein, Glycin, Isoleucin und Leucin), saure Aminosäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) und basische Aminosäuren (Arginin, Histidin, Lysin) sind Teil des Seminalplasmas (SCHÜLKE B 1991). Zu den proteinischen Komponenten mit enzymatischer Wirkung zählen unter anderem nukleolytische Enzyme, wie Nukleasen, Nucleotide und Nuclosidasen, aber auch die saure Phosphatase, alkalische Phosphatase, verschiedene ATP-spaltende Enzyme und Glycosidasen. Nach Mann und Lutwak- Mann (1981), kann man diese als Indikator benutzen um die Sekretionsleistung der einzelnen Syntheseorte innerhalb des männlichen Genitaltraktes zu testen

Die Zusammensetzung des Seminalplasmas beim Bullen ist einzeltier-abhängig, und auch die Ejakulationsfrequenz und die Jahreszeit haben einen großen Einfluss. Zum Zeitpunkt der Ejakulation wird das Sekret den Samenzellen beigefügt und bewirkt durch eine Anlagerung von Blutgruppenantigenen, immunsuppressiven Faktoren und anderen Eiweißen (Coating-Proteine) eine Modifikation der Spermienmembran angelagert sind. Die Glandula Vesicularis wie auch die Ampulla ductus deferentis – diese allerdings in größeren Mengen - produzieren die für den Spermienenergiestoffwechsel benötigte Fruktose und auch das so genannte „major protein“. Das „major protein“ heftet sich an die Spermienmembran und bewirkt eine weitere Ausreifung der Samenzellen nach der Passage des Nebenhodens (BUSCH W u. HOLZMANN A 2001).

Man geht davon aus, dass der Spermientransport im weiblichen Genitale vorwiegend passiv durch Muskelkontraktionen des Uterus stattfindet (BAYARD T STOREY 1995). Im Eileiter und bei der Durchdringung der Eihüllen ist die aktive Bewegung der Samenzellen jedoch unbedingt erforderlich (STÄHR B u. NEHRING H 1997). Spermien, die im Nebenhoden nur zu bestenfalls unkoodinierten Bewegungen fähig sind, werden mit Kontakt zum Seminalplasma motil. Ursache ist vor allem das „sperm forward motility protein“, das die Bewegung der Samenzellen in eine zielgerichtete, effektive Bewegungsform umgewandelt (ACOTT TS u. HOSKINS DD 1978). Ähnliche Erkenntnisse für den Eber wurden von Tso WW et al 1980 veröffentlicht, wonach es einen Faktor im Seminalplasma zu geben scheint, dessen maximaler Effekt bei einem 10%igen Gehalt des akzessorischen Sekretes am Gesamtejakulat erreicht wird. Die Motilitätsverbesserung ist dabei nicht durch eine Veränderung der Viskosität oder durch die Bereitstellung einer Energiequelle zu erklären, sondern scheint auf Gruppen mit Proteinstruktur zurückzuführen sein (WUNG-WAI TSO u. WAI-MING LEE 1980).

Die Bedeutung des Seminalplasma für die Spermienmotilität scheint individualspezifisch und konzentrationsabhängig zu sein. In Versuchen mit Eberseminalplasma kamen Nehring et al. (1994) zu dem Ergebnis, dass heterologes im Vergleich zu homologem Sekret den Prozentsatz motiler Spermien und ihre Geschwindigkeit unterschiedlich beeinflussen und eine sowohl schwache Hemmung als auch starke Steigerung bewirken können. Eine Verbesserung konnte jedoch nur bei einer Kombination von Spermaproben mit schlechten Motilitätswerten und Seminalplasma proben erzielt werden, die aus Ejakulaten mit hohen Motilitätswerten stammten. Eine positive Beeinflussung von Bullen- und Schafbockspermien konnte dabei auch mit Eberseminalplasma erreicht werden, wenn die Ausgangsmotilität der bovinen und ovinen Proben schlecht bis mittelmäßig waren. Höhere Seminalplasmaanteile bedingen jedoch konzentrationsabhängig einen Motilitätsverlust (NEHRING H et al. 1994).

Bei der Routinekonservierung von Bullensperma in Besamungsstationen liegt der Anteil an Seminalplasma in einem verarbeiteten Ejakulat üblicherweise zwischen 5 und 7 %. In einem Versuch mit kryokonserviertem Samen (TRIS- Verdünner) konnte gezeigt werden, dass die Spermiovitalität nach dem Auftauen von Verdünnungsgrad bzw. Seminalplasmamenge weitestgehend unabhängig war, solange diese zwischen 3 und 10% gehalten wurde. War dies nicht der Fall, kam es zu Qualitätseinbußen. Um genauere Grenzwerte ermitteln zu können wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem

Verdünnungsgrade von 1: 5,4 bis 1: 150 erreicht wurden, kombiniert mit einem Seminalplasmagehalt von 18,7 bis 0,7%. Im Rahmen dieses Laborversuches konnte wiederum bestätigt werden, dass ein Seminalplasmagehalt von >10% oder <3% die Spermiovitalität negativ beeinflussen kann, dazwischen ein relativ gleich bleibendes, qualitativ gutes Ergebnis festzustellen war. Verdünnungsgrade über 1:37 und unter 1:9 führten in den meisten Fällen ebenfalls zu den oben genannten kritischen Seminalplasmaanteilen im verdünnten Sperma. Zu geringer Seminalplasmagehalt zeigte im Resistenztest insbesondere nach 125 Minuten eine beeinträchtigte Spermienmotilität. Da man hier mit einer relativ begrenzten Anzahl von Bullen arbeitete, konnte zu einer bullenspezifischen Reaktion keine Aussage gemacht werden, diese jedoch auch nicht ausgeschlossen werden (NEHRING H et al. 2004).

Dass der bei einer zu starken Verdünnung von Spermaproben auftretende Verdünnungseffekt durch den Seminalplasmagehalt ebenfalls beeinflusst werden kann, wurde auch von anderen Autoren bestätigt. Obwohl dieses Phänomen in einem Experiment auch in Proben zu beobachten war, die seminalplasmahaltig waren und mit konventionellem Verdüner verdünnt worden waren, so war der Verdünnungseffekt bei den Varianten von Bullensamen doch viel stärker ausgeprägt, wenn die Chargen kein Seminalplasma enthielten und nur mit Verdüner aufbereitet waren. Somit kann man davon ausgehen, dass das Hinzufügen von Seminalplasma zumindest dann einen positiven Effekt auf die Überlebensrate der Spermien hat, wenn Samen stark verdünnt wird (GARNER DL et al. 2000).

In den akzessorischen Sekreten sind Verbindungen enthalten, die nach Anheftung an die Spermienoberfläche als Oberflächenmoleküle, die auf der Zellmembran sitzen, wie Sensoren agieren, die Information aus ihrem Umfeld aufnehmen und Signale über Reaktionen, die auf der Zelloberfläche ablaufen an das Zytoplasma und den Zellkern weiterleiten. Damit kann eine zelluläre Antwort provoziert werden. Diese biophysikalischen Interaktionen machen es Zellen möglich, sich verändernden Bedingungen anzupassen. Dies ist besonders für Spermien von großer Bedeutung, die einer sich ständig verändernden Umwelt ausgeliefert sind von dem Zeitpunkt an, an dem sie den Hoden verlassen, bis zum Eizellkontakt in der Ampulla (CALVETE JJ et al. 1995). Mittlerweile konnte man mehr als 35 Proteine in bovinem Seminalplasma isolieren, die solche Funktionen haben könnten (EINSPANIER R et al. 1995). Zu einer neuartigen Familie von sekretorischen Proteinen, die im männlichen Genitaltrakt von Eber, Hengst und Bulle exprimiert werden, gehören die Spermienadhäsine. Sie gelangen mit dem Seminalplasma ins Ejakulat und lagern sich an die Spermienmembran an (TÖPFER- PETERSEN E et al. 1998). Solche Komponenten des Seminalplasmas können eine Reihe von Spermienfunktionen modulieren, unter anderem zelluläre Ca^{2+} - Aufnahme und Regulation von Akrosomreaktion und Fertilisierung (BABCOCK DF et al. 1979; CHANG MC 1957; ENG LE u. OLIPHANT G 1978; MCRORIE RA u. WILLIAMS WL 1974). Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen positiven und negativen regulierenden Elementen. Negativ regulierende Faktoren stabilisieren die Plasmamembran der Spermien. Sie verhindern prämatüre Akrosomreaktionen oder maskieren Zona-Pellucida-Bindungsstellen. Positiv regulierende Faktoren ermöglichen dagegen Interaktionen zwischen Spermium und Zona-Pellucida der Eizelle (CROSS NL 1993; FLORMAN HM u. FIRST NL 1988).

Außerdem enthält das akzessorische Sekret auch hemmende Verbindungen - „hemmend“ sowohl im positiven, wie auch im negativen Sinne. Zur letztgenannten Gruppe gehört ein Spermien-Motilitätshemmer, welcher nicht speziesspezifisch ist und den die meisten bisher erforschten Säugetierspezies besitzen (DE LAMIRANDE E et al. 1983; DE LAMIRANDE E et al. 1984). In humanmedizinischen Veröffentlichungen hingegen wird beispielsweise ein „Seminal Plasma motility inhibitor“ (SPMI) beschrieben, welcher von den Seminalvesikeln abgegeben wird und sowohl intakte als auch membrangeschädigte Spermien in ihrer Bewegung hindert. Die biologische Aktivität von SPMI sinkt nach Kontakt mit den aus dem Prostatasekret stammenden Proteasen innerhalb kürzester Zeit auf einen Bruchteil der Ausgangsaktivität (LINDHOLMER CH 1974; ROBERT M u. GAGNON C 1994).

Zu den im positiven Sinn „hemmenden“ Komponenten gehören Dekapazitationsfaktoren wie zum Beispiel das ASF-Protein (ENG LE u. OLIPHANT G 1978), welches als akrosomstabilisierender Faktor Akrosomreaktion und spontane Exozytose unter reaktionsbegünstigenden aber in diesem Fall

unerwünschten Bedingungen durch Dissoziierung des Moleküls unterbindet (CHANG MC 1957; ENGLE u. OLIPHANT G 1978; OLIPHANT G u. BRACKETT BG 1973).

Ein weiterer Dekapitationsfaktor ist das Caltrin, ein 10-kDa-Protein, das in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen gebildet wird, an Akrosomal- und Schwanzregion bindet und die Calciumaufnahme reguliert (CLARK EN et al. 1993; FLORMAN HM u. FIRST NL 1988). Es gibt Hinweise dafür, dass dieses Peptid primär über die Hemmung von Ionen-transportsystemen in der Plasmamembran agiert. Ein Na^+ - Ca^{2+} -Antiporter, welcher in Säugetierspermien vorhanden ist, soll vermutlich der caltrinsensitive Transportmechanismus sein und durch die Hemmung desselben eine spontan auftretende Akrosomreaktion verhindern (CLARK EN et al. 1993).

Zum Ejakulationszeitpunkt kommen Spermien außerdem in Kontakt mit einem weiteren Faktor, dem so genannten Spermin, welches aus der Prostata stammt und innerhalb kürzester Zeit reversibel an Spermien gebunden wird. Im Falle von Schafbocksperma konnten schon millimolare Konzentrationen dieses Polyamins eine Akrosomreaktion verhindern (RUBINSTEIN S u. BREITBART H 1991). Während der Kapazitation kommt es zu verschiedenen Modifikationen an der Plasmamembran, zu der auch die Zunahme von lateraler Diffusion von Proteinen gehört (YANAGIMACHI R 1988). Diese wird vermutlich durch Spermin inhibiert und gleichzeitig auch eine mechanische Stabilisierung der Membran gewährleistet.

Die Wirkung des Dekapitationsfaktors wurde in dem angeführten Versuch durch Heparin aufgehoben und die Kapazitation induziert (RUBINSTEIN S u. BREITBART H 1991). Im Epithel des weiblichen Genitales sezernierte heparinähnliche Glykosaminglykane (GAGs), die vor allem in der Follikelphase oder im Oestrus in sehr hohen Konzentrationen produziert werden, lösen ebenfalls die Kapazitation aus (VARNER DD et al. 1993). Der Effekt der GAGs scheint durch heparinbindende Proteine des Seminalplasmas, die auf der Spermienoberfläche andocken, hervorgerufen zu werden (MILLER DJ et al. 1990).

Ein weiteres Coating-Protein, das in der Ampulla und im Vesikelepithel des Bullen produziert wird, ist das aSFP (acidic seminal fluid protein). Während der Spermienreifung im Nebenhoden konnten keine aSFP-Epitope auf der Oberfläche der Samenzellen nachgewiesen werden. Allerdings ist das Bindungsvermögen für dieses Coating-Protein schon zu diesem Zeitpunkt ausgebildet (DOSTÁLOVA Z et al. 1994). ASFP ist eine der Hauptkomponenten (1-7 mg/ml) des Seminalplasmas des Bullen und konnte weder in anderen bovinen Geweben, noch in weiteren untersuchten Säugetierspezies, wie Ziege, Schaf, Schwein, Ratte, Hund oder Mensch detektiert werden. Im Gegensatz zu anderen oben genannten Proteinen wird es nicht fest an die Spermienmembran gebunden und mag deshalb auch keine wichtige Rolle bei Spermien-Eizell-Interaktionen spielen (DOSTÁLOVA Z et al. 1994). Es konnte festgestellt werden, dass aSFP in drei verschiedenen isoelektrischen Formen vorkommt: vollständig oxidiert, teilweise reduziert und vollständig reduziert. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis auf antioxidatives Potential sein, das reduziertes oder teilweise oxidiertes aSFP besitzt (EINSPANIER R et al. 1994). Außerdem wirkt es regulierend auf die Mitochondrienaktivität (SCHÖNECK C et al. 1994), stimuliert in in-vitro-Versuchen die Progesteronsekretion durch Granulosazellen (EINSPANIER R et al. 1993) und verhindert vermutlich auch eine vorzeitige Hyperaktivierung der Samenzellen (EINSPANIER R et al. 1995).

Eine weitere Gruppe von Seminalplasmaproteinen, die locker an die Oberfläche von Spermien gebunden werden, sind die BSP- Proteine BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 und BSP-30-kDa (MANJUNATH P et al. 1993). Das Protein PDC-109 ist ebenfalls bekannt als BSP-A1/A2 (MANJUNATH P u. SAIRAM MR 1987) oder als SVSP-109 (KEMME M u. SCHEIT KH 1988). Mit Ausnahme von BSP-30-kDa in geringen Mengen waren Spermien des Nebenhodens frei von BSP- Proteinen. Dieses Coating-Protein lagert sich vorwiegend in der postakrosomalen Region an Samenzellen an, während sich die anderen über die ganze Spermienoberfläche mit einer gewissen Präferenz für das Mittelstück verteilen. Die unterschiedliche Lokalisierung könnte auch verschiedene Wirkung widerspiegeln (MANJUNATH P et al. 1993). Man geht davon aus, dass BSP-Proteine an der Modifikation der Lipidzusammensetzung von Spermienmembranen beteiligt sind, welche in Zusammenhang mit Kapazitation und Akrosomreaktion

auftritt (DESNOYERS L u. MANJUNATH P 1992; MANJUNATH P et al. 1989). Da es sich außerdem um heparinbindene Proteine handelt, geht man auch von einer regulierenden Wirkung auf Kapazitations- und Zona-Pellucida-induzierter Akrosomreaktion aus (MILLER DJ et al. 1990). Manjunath et al. (1993) stellen sich den Einfluss von BSP-Proteinen folgendermaßen vor: Zum Zeitpunkt der Ejakulation werden Phospholipide an der Oberfläche von Spermien mit diesen Dekapazitationsfaktoren belagert, so dass eine vorzeitige Akrosomreaktion verhindert wird. Während ihrer „Reise“ durch den weiblichen Genitaltrakt treffen sie auf HDL (high-density-lipoprotein), welches an diese BSP-Proteine andockt, die ihrerseits an die Samenzelle gebunden sind. In einem weiteren Schritt wäre es möglich, dass die BSP Cholesterin und Phospholipide abspalten und dann selbst die Spermienoberfläche verlassen, wobei sie mit HDL eine Komplexbildung eingehen. Dieser Lipidverlust könnte für die Samenzelle eine Veränderung der Permeabilität bedeuten und dadurch den Eintritt von Calcium ermöglichen, welches Phospholipase A2 aktiviert. Dies wiederum würde Phospholipide in Lysolipide umwandeln, welche dafür bekannt sind, Membranen zu destabilisieren und somit eine Akrosomreaktion auslösen können. Demzufolge würden BSP-Proteine nicht nur dekapazitierend wirken, sondern eventuell auch eine kapazitationsfördernde Wirkung entfalten können (MANJUNATH P et al. 1993). In einer weiteren Studie konnte belegt werden, dass PDC-109 (BSP-A1/A2) den Spermien ermöglicht, an Epithelzellen des Eileiters zu binden, was für die Bildung eines Samenreservoirs im Ovidukt und den darauf folgenden Befruchtungsvorgang von Bedeutung ist (GWATHMEY TM et al. 2002).

Zwei weitere Coating-Proteine, die in Seminalplasma und auf der Oberfläche ejakulierter Spermien nachgewiesen werden konnten, sind monomeres Ubiquitin und IgF-1 (Insulin-like growth factor 1). Ihr Einfluss auf den Reproduktionsvorgang und die Gameten ist noch weitestgehend unbekannt (EINSPANIER R et al. 1995).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der sogenannte Coating-Effekt, d. h. die Anlagerung von Seminalplasma-Proteinen an die Spermienoberfläche, zu einer Stabilisierung der Zellmembran, zur Ausbildung ihrer Rezeptoreigenschaften bei Erkennung der art eigenen Zona-Pellucida sowie zur Verhinderung eines vorzeitigen Eintritts der Kapazitation führt. Hier stellt sich in Bezug auf die kommerzielle Verarbeitung von Ejakulaten in Besamungsstationen die Frage, wie lange der Kontakt dieser Coating-Proteine in ihrer ursprünglichen Konzentration mit den Samenzellen sein muss, um den Samenzellen ein maximales Befruchtungsvermögen zu geben. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass die Zeit, die man für die Aufbereitung und Verdünnung von Bullensperma benötigt, für den Vollzug des Coating-Effektes ausreicht (KOMMISRUDE 1992). Die Bindungsrate des oben genannten Spermin ist beispielsweise sehr hoch. Innerhalb von 5 Minuten sind bei einer Temperatur von 37°C die Spermienoberflächen eines gesamten Ejakulates mit daran gebundenem Spermin gesättigt. Nach weiterer 20-minütiger Inkubation mit diesem Coating-Protein kommt es zu keinerlei Veränderungen was die Menge an gebundenem oder ungebundenem Spermin betrifft (RUBINSTEIN S u. BREITBARTH H 1991). Bezüglich dieses Proteins würde die übliche Verarbeitungszeit somit ausreichen. Wie es jedoch um die anderen genannten steht, ist noch nicht ausreichend erforscht.

Außerdem ist bekannt, dass die Akrosomreaktion in-vitro bei gefrierkonserviertem Samen leichter ausgelöst werden kann als bei originärem Bullensperma (GRAHAM EF u. FOOTE RH 1987a; GRAHAM EF u. FOOTE RH 1987b). Dieses Phänomen ist ein Zeichen für eine erhöhte Labilität der Zellmembran, welche unter anderem mit einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach Gefrierkonservierung einhergeht (BAILEY JL u. BUHR MM 1993).

Als ein für die Besamungspraxis relevantes Problem zeichnet sich damit die Frage ab, ob das Zeitregime der üblicherweise genutzten Technologien für die Aufbereitung von gefrierkonserviertem Bullensperma geeignet ist, den Besitz der Spermien mit Coating-Proteinen optimal zu gewährleisten.

III. Material und Methoden

1. Auswahl der Bullen

Alle Versuche wurden mit dem Sperma von Fleckviehbullen aus dem Besitz des Besamungsvereins Neustadt a. d. Aisch e.V., Besamungsstation Neustadt a.d. Aisch durchgeführt. Dabei handelte es sich sowohl um zuchtwertgeprüfte Altbullen im Produktionseinsatz als auch um Jungbullen, die noch im Testeinsatz standen. Die Bullen wurden zwei- bis dreimal pro Woche zur Spermagewinnung herangezogen.

Die Tiere zeigten ein ungestörtes Allgemeinbefinden und wiesen keine Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Sexualfunktion oder eine Erkrankung der Geschlechtsorgane auf. Zudem wurden nur Tiere ausgewählt, deren Sperma über einen längeren Zeitraum im Routinebetrieb als tauglich beurteilt worden war und somit bezüglich Motilität, Morphologie und Konzentration keine anormalen Eigenschaften zeigte.

In die Besamungsversuche wurden insbesondere Altbullen einbezogen, für deren Samenportionen die Nachfrage sehr hoch war. Für den Versuch mit flüssigkonserviertem Sperma (siehe Pkt. III.5.2) war das unumgänglich, da es nur für solche Bullen wirtschaftlich sinnvoll ist, im Routinebetrieb flüssigkonserviertes Sperma zu produzieren und zu vertreiben. Für den Versuch mit gefrierkonserviertem Sperma (siehe Pkt. III.5.4) wurde angestrebt, die Versuchs- und Kontrollchargen so schnell wie möglich in der Besamung einzusetzen, um nach relativ kurzer Zeit ein Non Return-Ergebnis zu erhalten.

Mit dem Non Return-Ergebnis wird in der Besamungspraxis festgestellt, wie groß der Anteil an Besamungen ist, der nach einer Erstbesamung zu einer erfolgreichen Befruchtung geführt hat. Tiere, die innerhalb eines bestimmten Zeitraumes (z.B. 30, 60 oder 90 Tage) nicht wieder zur Insemination vorgestellt werden, gelten als trächtig (Nicht-Wiederkehrer). Dabei bleiben die Tiere unberücksichtigt, die innerhalb dieser Zeit den Betrieb verlassen haben. Diese werden als „trächtig“ in die Berechnung mit einbezogen. Die Berechnung des prozentualen Anteils (Non Return-Rate, NRR) erfolgt durch regionale oder überregionale Rechenzentren aufgrund der Meldungen aus der Praxis. Für die Ermittlung des Besamungserfolges pro Bulle und Versuchsvariante wurde in den eigenen Versuchen das 60-90-Tage-NRR-Ergebnis verwendet.

2. Spermagewinnung

Die Spermagewinnung von den für die Versuche genutzten Bullen wurde von dem im Routinebetrieb beschäftigten Personal der Besamungsstation Neustadt a. d. Aisch jeweils nach ein bis drei sogenannten „Blindsprüngen“ durchgeführt. Als Sprungpartner dienten je nach Präferenz der Versuchsbullen ein anderer fixierter Bulle oder ein Phantom. Das Auffangen der Ejakulate durch den Besamungstechniker erfolgte mit Hilfe einer auf 42°C erwärmten künstlichen Scheide (Modell „Neustadt Aisch“), an der das Spermaauffangglas befestigt war. Das aufgefangene Sperma in dem Spermaauffangglas wurde direkt nach dem Absamprozess in ein auf 37°C eingestelltes Temperiergerät (Kugelbad, Firma Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) umgesetzt.

3. Beurteilung des originären Spermias

Jedes Ejakulat wurde innerhalb der ersten 10 Minuten nach Ejakulatsgewinnung entsprechend der in der Besamungsstation üblichen Verfahrensweise auf Farbe, Konsistenz, Beimengungen, Volumen, Motilität und Konzentration untersucht. Alle Daten wurden in der Laborsoftware (Laborsoftware „BullenDoku“, Datenbank Microsoft ACCESS) gespeichert.

Das Volumen wurde mit Hilfe einer Laborwaage ermittelt. Es erfolgte eine Differenzbildung zwischen leerem und befülltem Spermaauffangglas. Die Dichte des Spermias wurde dabei mit 1,0 g/ml zum Ansatz gebracht.

Die Untersuchung der Motilität am originären Sperma wurde von erfahrenem Laborpersonal an einem Mikroskop mit positiven Phasenkontrast (Dialux 20, Firma Leitz, Wetzlar, Deutschland) bei einer

Gesamtvergrößerung von 390 durchgeführt. Gekoppelt war das Mikroskop mit einem auf 38°C eingestellten Mikroskopheiztisch und einer Laborwärmeplatte (HAT 50, Firma Minitüb, Tiefenbach, Deutschland). Damit wurde eine konstante Temperierung des Spermas und allen Zubehörs gesichert. Die Schätzung des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien erfolgte im Feuchtpräparat bei 37°C (pro Ejakulat zwei Tropfen von je ca. 8 µl Volumen auf einem Objektträger, Abdeckung jedes Tropfens mit einem vorgewärmten Deckgläschen [18 x 18 mm]). Ejakulate mit Schätzwerten unter 60% wurden nicht weiterverarbeitet.

Bei einem Teil der Versuche wurde die Spermienmotilität im originären Sperma auch mittels computergestützter Motilitätsanalyse (CMA) untersucht. Dazu diente das Messsystem „Sperm Vision“ der Firma Minitüb (Tiefenbach, Deutschland, siehe auch Pkt. 4.2). Zur Messvorbereitung erfolgte eine Verdünnung der originären Probe mit 0,9%iger NaCl-Lösung oder dem eidotterfreien Verdünner Bioxcell (siehe Pkt. III.5.3) bei 37°C im Verhältnis von 1 : 40 (390 µl 0,9% NaCl + 10µl Sperma) oder 1 : 50 (490 µl 0,9% NaCl + 10µl Sperma).

Die Spermienkonzentration der Ejakulate wurde mit Hilfe eines Photometers (SDM5, Programm 4, Firma Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) ermittelt. Hierfür wurde unter Verwendung eines Dispensers (Firma Brandt, Wertheim, Deutschland) ein Anteil des originären Spermas mit 0,9%iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1: 100 in den Einwegküvetten des Photometers verdünnt. Bei der Entnahme der Spermprobe mit einer variablen Eppendorf-Pipette(10-100µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) musste darauf geachtet werden, dass die Außenseite der Spitze sorgfältig mit einem einmal zu verwendenden Reinigungstuch gesäubert wurde, ohne dem Inneren der Pipettenspitze Probenmaterial zu entziehen. Dies ist wichtig um einen Messfehler, - und in diesem Fall eine zu hohe Konzentrationsangabe - zu vermeiden. Die Angabe des Ergebnisses erfolgt in der Einheit Spermienzahl x 10⁹ / ml.

4. Untersuchung des flüssig- oder gefrierkonservierten Spermas

4.1. Schätzung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien

Es wurden ein Mikroskop mit positivem Phasenkontrast (Mikroskop Nikon Eclipse E600, Japan) und Heiztisch sowie einer 100-fachen Gesamtvergrößerung genutzt. Die Schätzung des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien [V%] erfolgte im Feuchtpräparat bei 38°C. Dazu wurden mittels einer Mikropipette (1-10µl, Gilson, Middleton, USA) je zwei 8 µl-Tropfen der Spermacharge auf einen vorgewärmten Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt. Jeweils mehrere Gesichtsfelder wurden pro Präparat beurteilt und unter den Einzelbefunden das Mittel der beiden besten als Endergebnis ausgewiesen. Die V%- Schätzung wurde im Rahmen eines Resistenztestes bei 37°C 5, 35, 95 und 125 Minuten nach Beginn der Inkubation durchgeführt.

4.2.Computergestützte Motilitätsanalyse (CMA)

Neben der subjektiven Motilitätsschätzung wurde mit der computergestützten Motilitätsanalyse noch zusätzlich eine objektive Methode zur Beurteilung der Spermienbewegung gewählt.

Folgendes System wurde verwendet:

- Software Sperm Vision™ (Updates von Juli 2003 bis Juli 2004)
- PC: Pentium® 4 Prozessor bei 2,0 GHz, 1 GB RAM, 40GB (7200 RPM) mit Monitor
- S/W Digitalkamera (60 Frames pro Sekunde, Verschlusszeit 1/120.000 Sek.)
- Objektiv: negativer Phasenkontrast 20x

Das „Sperm Vision“ – System ist aufgebaut aus einem mit negativem Phasenkontrast ausgestatteten Mikroskop und einem Objektiv mit einer Maßzahl von 10. Die Probe musste- nur wenn es sich um natives Sperma handelte- zunächst mit einem physiologischen, transparenten Medium aufbereitet

werden. Dieser Schritt war bei bereits verdünnten und konservierten Proben nicht mehr notwendig. Danach erfolgte die Befüllung der Messkammer. Bei den eigenen Versuchen wurde eine Leja Kammer (Fa. Leja, The Netherland) benutzt, die ein definiertes Volumen aufnehmen kann und eine Schichtdicke von 20 µm besitzt. Die Füllung erfolgte mit einer auf 2,4 µl eingestellten variablen Pipette (10µl Pipetman® Gilson, Middleton, USA). Pro Probe wurden immer mindestens 6 Felder mit insgesamt wenigstens 400 Spermien ausgewertet.

In den eigenen Versuchen wurden die Einstellungen verwendet, die der Hersteller für Bullensperma empfiehlt. Bei der Messung erfolgte eine Einteilung der Spermien in verschiedene Hauptklassen wie „non- motil“, „lokal motil“ und „progressiv motil“. Die motile und die progressive Gruppe konnten wahlweise noch in Unterklassen unterteilt werden: „curvilinear motile“, „non- linear motile“, „hyperactive motile“ und „linear motile“.

Folgender Parametersatz wurde auf Herstellervorschlag hin verwendet:

Sperm Vision (Minitüb)			Quelle: Bedienungsanleitung „Sperm Vision“ #12049/0586			
Level 1 Classification			Level 2 Classification			
Non- motile	Local motile	Progressive	Hyperactive	Linear	Non- Linear	Curvilinear
AOC < 5	DSL < 4,5	DSL ≥ 4,5	VCL > 80 und LIN < 0,65 und ALH > 6,5	STR > 0,5 und LIN > 0,35	STR < 0,5 und LIN < 0,35	DAP/Radius ≥ 3 und LIN < 0,5
	motile Spermien					

Die Untersuchung konservierter Chargen wurde im Rahmen eines Resistenztestes bei 37°C 45 und 125 beziehungsweise – je nach Experiment - nur 45 Minuten nach Beginn der Probeninkubation durchgeführt.

4.3. Beurteilung der Akrosomenmorphologie

Morphologische Untersuchungen an Spermien werden durchgeführt, um genetisch bedingte, pathologische oder durch die jeweilige Behandlung des Spermias hervorgerufene Veränderungen der normalen Zellstruktur zu erfassen. Während für die beiden zuerst angeführten Problemstellungen die Beurteilung des morphologischen Gesamtzustandes der Spermien im Vordergrund steht, können Konservierungseinflüsse unter Umständen bereits anhand der alleinigen Beurteilung der Akrosomenmorphologie eingeschätzt werden. Die strukturelle und funktionelle Intaktheit dieses Zellorganells ist wegen seines Enzymgehaltes von großer Bedeutung für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien.

Herstellung der Fixierungslösung (0,5 % Formol-pNaCl-Lösung):

- Pufferstammlösung A: 0,5 M Dinatriumhydrogenphosphat, 17,91g/ 100ml (Na₂HPO₄ x 12 H₂O, Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)

- Pufferstammlösung B: 0,5 M Natriumdihydrogenphosphat, 6,9g/ 100ml ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 150 mM Natriumchlorid-Lösung, 0,9g/ 100ml (physiologische Kochsalzlösung, Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 37%ige Formaldehydlösung (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland)

Es wird eine phosphatgepufferte Fixierungslösung verwendet, die aus zwei lagerstabilen Stammlösungen unter Zugabe von frisch zubereiteter physiologischer Kochsalzlösung und Formalin (0,5 % Formol-pNaCl) hergestellt wird. Für den isotonischen Phosphatpuffer (pH 7,0) werden 16,1 ml Stammlösung A und 8,9 ml Stammlösung B mit H_2O auf 100 ml Pufferlösung aufgefüllt. Der Zusatz von 198,5 ml NaCl-Lösung und 1,5 ml Formaldehydlösung komplettiert die Fixierungslösung. Die Zubereitung erfolgt bei Raumtemperatur. Die fertige Fixierlösung ist bei Kühlschranktemperatur drei Monate haltbar.

Durchführung der Untersuchung:

35 Minuten nach Beginn des Resistenztestes wurde der Prozentsatz an Spermien mit normaler akrosomaler Randverdickung durch visuelle Bewertung eines Feuchtpräparates im Phasenkontrast ermittelt. Zur Durchführung wurden 50 μl konserviertes Sperma in einen Tube mit 100 μl Fixierungslösung von 37°C gegeben. Die immobilisierten und fixierten Proben wurden dann bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Probenauswertung im Feuchtpräparat erfolgte innerhalb von 12 Stunden nach Fixierung der Spermien, wobei je 200 Zellen auf zwei Präparaten beurteilt wurden (positiver Phasenkontrast, Mikroskop Nikon Eclipse E400, 400fache Vergrößerung), die aus einem aufgetropften Volumen von 5 μl resultierten. Als „normal“ [% NAR] wurden diejenigen Samenzellen angesehen, an deren apikalen Rand die akrosomale Randverdickung als feine dunkle Linie deutlich sichtbar war.

4.4. Eosin-Nigrosin-Färbung nach BLOM

Mit Hilfe sogenannter „Lebend-Tot-Färbungen“ kann der Anteil an Spermien ermittelt werden, deren Plasmamembran gegenüber bestimmten Farbstoffen permeabel ist. Bei Schädigung der Plasmamembran ist die Durchlässigkeit für diese Farbstoffe erhöht. Sie erscheinen im mikroskopischen Bild gefärbt. Somit gelten gefärbte Spermien als „tot“, während die Zellen mit intakter „Plasmamembran“ ungefärbt bleiben und zur „lebenden“ Fraktion gezählt werden.

Der Farbstoff Eosin permeiert nur die Zellmembran toter Spermien, so dass bei der Untersuchung der Ausstrichpräparate Spermienköpfe, die mit rotem Farbstoff durchdrungen sind, als abgestorbene Zelle gewertet werden können. Führt man zusätzlich eine Gegenfärbung mit Nigrosin durch, so wird die farbliche Differenzierung noch verstärkt und die Auswertung erleichtert.

Herstellung der Farbstofflösungen:

- Zunächst stellt man eine 3%ige Tri-Natriumcitrat-Dihydrat-Lösung [$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$] (Synopharm GmbH, Barsbüttel, Deutschland) in H_2O her. Dann setzt man mit dieser Lösung eine 2%ige Eosin-Lösung (Eosin G, Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) an.
- Für die Herstellung des Farbstoffes für die Gegenfärbung benutzt man 10%ige Nigrosin-Lösung (Firma Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in H_2O .

Die Lösungen können im Kühlschrank über Monate gelagert werden.

Durchführung der Färbung und Auswertung:

Die Eosin-Färbung wurde bei den eigenen Versuchen 35 Minuten nach Beginn der Probeninkubation bei 37°C durchgeführt.

Nach vorsichtigem Schwenken der Probe wird ein Tropfen Samen auf den Randbereich eines vorgewärmten entfetteten Objektträgers („Superfrost“, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) gegeben. Je nach Spermienkonzentration in der Messprobe sollte das Tropfenvolumen der Samenprobe und der Farbstofflösungen bei 10 – 15 µl liegen. Direkt neben diesem Tropfen wird die gleiche Menge an auf 37°C erwärmter Eosin-Lösung abgesetzt. Dann werden die beiden Tropfen mit Hilfe eines Deckglases vorsichtig vermengt. Nach einer Anfärbedauer von exakt 10 Sekunden wird direkt auf dieses Eosin-Sperma-Gemisch ein auf 37°C temperierter Tropfen Nigrosin-Lösung gegeben und die Probe nach 10 Sekunden wiederum kurz gemischt. Mit einem warmen Deckglas wird das Präparat anschließend nach Art der Blutausstrichtechnik dünn ausgestrichen und dann zügig an der Luft getrocknet.

Auf dem Ausstrichpräparat werden mindestens 200 Spermien bei einer 40-fachen Vergrößerung im Hellfeld ausgewertet. Dies muss innerhalb von 24 Stunden nach Durchführung der Färbung erfolgen.

4.5.Differenzierung lebender und toter Spermien durch Vitalfärbung mit SYBR/Propidiumiodid und fluoreszenzmikroskopischer Auswertung

Der Live/ Dead Viability Kit der Firma MoBiTec bietet eine Möglichkeit zwischen lebenden und toten Spermien zu differenzieren. Bei dem darin enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff SYBR-14 handelt es sich um einen Farbstoff, der in alle lebenden Spermien eindringt und diese bei entsprechender Anregung und Emission grün markiert, wobei die Spermiovitalität nicht beeinträchtigt wird. In dem Kit ist dieser Farbstoff mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid kombiniert, welcher membrangeschädigte Samenzellen rot markiert. Dabei wird das Grün der lebenden Zellen überlagert. Die Auswertung der Proben kann entweder mit dem Flowzytometer oder einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt werden. Bei den eigenen Versuchen wurde eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung angewendet.

Herstellung der Reagenzien:

a) Live/Dead® Sperm Vitality Kit (Firma MoBiTec, Göttingen, Deutschland)

- 100µl mM SYBR 14 (SYBR, MG: 565) in Dimethylsulfoxid (DMSO)
- 5ml 2,4 mM Propidiumiodid (PI, MG: 668) in H₂O

Diese kommerziellen Lösungen wurden portioniert und bei -20°C gelagert. Dazu wurden je 2 µl SYBR-Stammlösung und jeweils 100µl PI- Stammlösung in Tubes abgefüllt.

b) Färbelösungen

- SYBR- Reagenz:

Für eine gebrauchsfertige Lösung wird zu den aufgetauten 2 µl SYBR-Stammlösung 100µl HEPES/NaCl/BSA (siehe unten) zugesetzt. Bei Raumtemperatur gehalten kann das SYBR-Reagenz für maximal 12 Stunden benutzt werden.

- PI- Reagenz:

Die eingefrorenen 100µl PI-Stammlösungen werden bei Raumtemperatur aufgetaut und können so direkt verwendet werden. Der Einsatz ist ebenfalls auf 12 Stunden begrenzt.

c) HEPES/NaCl/BSA- Lösung:

- 0,85 %ige NaCl-Lösung
- 260mg HEPES/100ml NaCl-Lösung, 10mM HEPES, pH 7,4 (Firma Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- 2,5g BSA (Firma Sigma, Taufkirchen, Deutschland) mit HEPES/NaCl auf 25ml auffüllen (10% BSA)

Diese Pufferlösung ist bei 4°C eine Woche stabil.

d) Formol-NaCl- Lösung

Hierzu nimmt man eine 0,9%ige NaCl-Lösung mit 0,5% Formalin (37%ig), welche über einige Wochen stabil ist.

Vorbereitung der Messproben und Anfertigen der Färbepreparate:

Diese Färbung wurde nach 35minütiger Inkubation bei 37°C im Rahmen des Thermoresistenztestes durchgeführt.

Zunächst muss die Messprobe mit HEPES/NaCl/BSA-Lösung bei 37°C so verdünnt werden, dass ein gut auswertbares Präparat entsteht. Bei der Testung von gefrierkonservierten Chargen wurde so vorgegangen, dass 750µl der Pufferlösung mit dem aufgetauten Volumen von drei Pailletten vereinigt wurden (Verdünnung des aufgetauten Spermas ca. 1 : 2).

Frühestens fünf Minuten nach der Verdünnung wurden Färbepreparate wie folgt hergestellt:

- 1 ml verdünnte Meßprobe + 5 µl SYBR-Reagenz fünf Minuten im Dunkeln halten (37°C)
- dann 5 µl PI- Reagenz zusetzen und für weitere fünf Minuten bei 37°C im Dunkeln halten
- Anschließend wird diese Spermiesuspension mit Formol- NaCl- Lösung im Verhältnis 1 : 1,5 verdünnt, z. B. 100 µl gefärbte Spermiesuspension + 50 µl Formol-NaCl- Lösung.

Herstellung der Feuchtpräparate und Auswertung:

Die Auswertung sollte nicht später als 60 Minuten nach dem Anfertigen der Färbepreparate erfolgen. Dazu werden 20 µl gefärbte und fixierte Spermiesuspension auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas bedeckt. Es werden 200- 400 Spermien ausgezählt und der Prozentsatz „lebender“ (grüne Markierung) und „toter“ Samenzellen (rote Markierung) ermittelt.

Am Fluoreszenzmikroskop (Nikon, E400, Japan) wurden eine 400fache Gesamtvergrößerung und folgende Filterkombination benutzt:

- EX (Anregungsfilter) 450- 490
- DM (Dicroischer Spiegel) 505
- BA (Ausgangsfilter) 520

4.6. Flowzytometrische Differenzierung lebender und toter Spermien nach Vitalfärbung mit Rhodamin 123 / Propidiumiodid

Im eigenen Versuch wurde die Flowzytometrie zur Ermittlung des Anteils lebender (mitochondrienaktiver) und toter Spermienpopulationen herangezogen. Die hier beschriebene Methode lehnt sich an die von Graham et al (1990) beschriebene Verfahrensweise an. Lebende Spermien mit intakten Mitochondrien werden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 markiert. Spermien können den Farbstoff solange aufnehmen, wie ihr Membranpotential aufrechterhalten bleibt. Mit Hilfe einer Doppelfärbung können auch die toten Zellen gefärbt und somit besser differenziert werden. Dazu wird der Farbstoff Propidiumiodid benutzt. Beide Farbstoffe besitzen unterschiedliche Anregungs- und vor allem Emissionsspektren. Lebende – also mitochondrienaktive- Spermien fluoreszieren grün, tote Zellen rot (GRAHAM JK et al. 1990).

Herstellung der Reagenzien (Arbeitsanleitung IFN Schönow e.V.):

a) 0,13 mmol Rhodamin 123-Lösung (MG: 380,8; SERVA, Heidelberg, Deutschland)

5,0 mg Rhodamin 123/100 ml H₂O

Die Lösung ist im Kühlschrank stabil.

b) 1,5 mmol Propidiumiodid-Lösung (MG: 668,4; SERVA, Heidelberg, Deutschland)

10 mg/10 ml H₂O

Die Lösung wurde in 50 µl-Portionen in geeigneten Tubes aufbewahrt. Sie ist im Kühlschrank stabil.

c) phosphatgepufferte NaCl-Lösung, pH 7,0 (pNaCl-Lösung)

Isotonischer Phosphatpuffer, pH 7,0

Stammlösungen:

A) 0,5 M Na₂HPO₄ x 12 H₂O (17,91g/100 ml)

B) 0,5 M NaH₂PO₄ x H₂O (6,90g/100 ml)

16,1 ml Lösung A + 8,9 ml Lösung B werden mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt.

Phosphatgepufferte NaCl-Lösung (pNaCl-Lösung)

Isotonischer Phosphatpuffer wird mit 0,9 %iger NaCl-Lösung im Verhältnis 1:3 verdünnt.

Der pH-Wert wird kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert.

Die Lösung ist über Wochen stabil. Sie ist vor Gebrauch durch ein Sterilfilter zu filtrieren.

Vorbereitung der Messproben und Anfertigen der Färbepreparate:

Für die Bestimmung werden die Spermaproben bei 38°C im Verhältnis 1 : 5 mit pNaCl-Lösung verdünnt. Gefärbten Proben wurden sofort nach der Vorverdünnung wie folgt hergestellt:

Zu 250 µl Messprobe werden 10 µl Rhodamin-Reagenz und 2,5 µl Propidiumiodid-Reagenz gegeben. Dieses Gemisch wird 20 Minuten lang bei 38°C im Dunkeln inkubiert.

Durchführung der Messung am Flowzytometer

Direkt vor der Durchführung der flowzytometrischen Messung werden 10 µl gefärbter Messansatz in 2 ml sterilfiltrierte pNaCl-Lösung von 38°C gegeben, die sich bereits in dem Messröhrchen für das Flowzytometer befinden (Verdünnung 1 : 200).

Die Messung am Flowzytometer und ihre Auswertung erfolgen nach Gerätevorschrift. Am Flowzytometer PAS der Firma PARTEC (Münster, Deutschland) wurden für diese Messung folgende Messparameter eingestellt:

FL1	660	4	10	grün
FL2	400	4	10	
FL3	990	4	10	rot
FL4	400	lin	10	
FSC	300	3	300	Vorwärtsstreulicht
SSC	600	3	10	Seitwärtsstreulicht

Auswertung der Messung am Flowzytometer:

Entsprechend der Gerätevorschrift müssen Fluoreszenzanteile kompensiert werden, um Daten in den Achsenbereichen sichtbar zu machen. Dann muss die gesamte Spermienpopulation im Streulicht „gegatet“ und auf das Zwei-Parameter-Fluoreszenzdiagramm übertragen werden. Danach wird das Gaten der Propidiumiodid-negativen Spermienpopulation mit starker Rhodamin-Färbung durchgeführt (Abb. 1) und schließlich aus den statistischen Daten der Prozentwert der lebenden Population ermittelt.

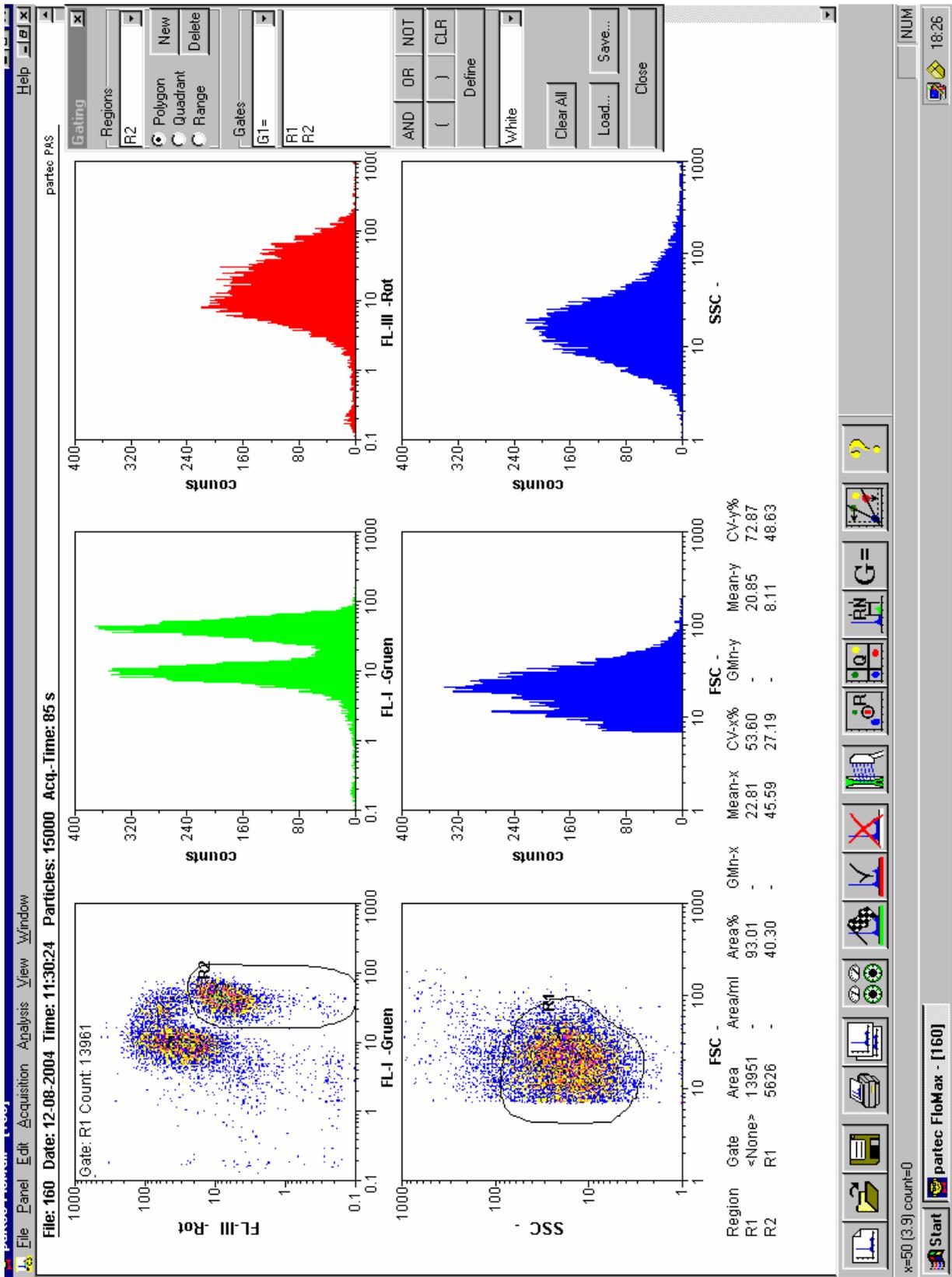


Abb.1 „Gaten“ der Spermienpopulationen zur Ermittlung prozentualen Anteils lebender Samenzellen

5. Durchführung von Versuchen zur Konservierung von Bullensperma

5.1. Vergleich von zwei Varianten des Caprogen-Verdünners für die Flüssigkonservierung

Eine in Deutschland weniger bekannte und auch seltener genutzte Konservierungsmethode ist die Flüssigkonservierung. Diese wird hauptsächlich mit dem aus Neuseeland stammenden kommerziell hergestellten Caprogen® (New Zealand Genetic Hamilton, New Zealand) durchgeführt, der allerdings mit gewissem Aufwand auch von Hand angesetzt werden kann. In diesem Versuch wurden die spermienkonservierenden Eigenschaften des kommerziellen und des selbst hergestellten Produktes zunächst in einem Laborversuch und anschließend auch in einem Feldversuch getestet.

5.1.1. Bereitstellung des „selbst hergestellten“ Caprogen-Verdünners

Herstellung der Antibiotika-Glycerin-Lösung (100 ml)

- a) Einwaage von 2,99 g Penicillin-G-Na [8,985 g Benzylpenicillin-Natrium entsprechen 15.000.000 IE] (Firma Albrecht, Aulendorf, Deutschland) und Lösung in 10 ml H₂O
- b) Einwaage von 5,0 g Dihydrostreptomycinsulfat (DHS) [1 g DHS-Sulfat enthält 755.000 IE] (Firma Albrecht, Aulendorf, Deutschland) und Lösung in 10 ml H₂O
- c) 25 ml Lincospectinlösung [1 ml Lösung enthält: 56,7mg Lincomycinhydrochlorid- Monohydrat entsprechen 50mg Lincomycin, 151,2 mg Spectinomycinsulfat-Tetrahydrat entsprechen 100mg Spectinomycin] (Firma Pharmacia, Erlangen, Deutschland) in Messkolben abmessen
- d) 50 ml Glycerin [C₃H₈O₃, 87%ig] (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) in weiterem Messkolben abmessen
- e) die vier Reagenzien nacheinander in einen 100ml-Messkolben geben und mit H₂O auf 100 ml auffüllen

Da Antibiotika in wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur relativ instabil sind, ist diese Lösung wöchentlich neu anzusetzen.

Herstellung der Pufferlösung

- a) 20g Tri-Natrium-citrat-Dihydrat [C₆H₅Na₃ x 2H₂O] (Synopharm GmbH, Barsbüttel, Deutschland) einwiegen
- b) 10g Glycin [Glykokoll p.a., C₂H₅NO₂] (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) einwiegen
- c) 3g D+-Glukose [C₆H₁₂O₆ x H₂O] (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) einwiegen
- d) Die Substanzen werden in einen 1000ml Messkolben gegeben und mit 250 ml kochendem H₂O unter kräftigem Schütteln gelöst.
- e) Diese Lösung wird mit kaltem H₂O aus dem Kühlraum auf circa 950 ml aufgefüllt. Dabei wird die Temperatur abgesenkt.
- f) Zugabe von 25ml der Antibiotika-Glycerin-Lösung
- g) Auffüllen mit H₂O auf 1000 ml bei Raumtemperatur

Es sollte ein pH-Wert von 7,4 erreicht werden, der gegebenenfalls auch eingestellt werden kann. Die Lösung ist im Kühlraum eine Woche haltbar.

Herstellung der Hexansäure-Lösung (100ml)

2,5 ml Hexansäure [C₆H₁₂O₂ zur Synthese; 1l = 0,93 kg; MG = 116,16] (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) in einem Messkolben mit Pufferlösung auf 100ml auffüllen

Diese Lösung ist im Kühlraum zwei Wochen haltbar.

Herstellung der Katalase-Lösung

45 mg Katalase [aus Rinderleber] (Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einem Messkolben mit Pufferlösung auf 100ml auffüllen

Es ist zu beachten, dass die Trockensubstanz des Enzyms Katalase unter 0°C aufbewahrt werden muss. Die Katalase-Lösung ist im Kühlraum 14 Tage haltbar. Die für die Herstellung des Caprogen-Verdünners benötigten Mengen an gelöster Katalase sind unter solchen Bedingungen zu entnehmen, dass die Lösung dabei nicht unnötig erwärmt wird.

Da in dem durchgeführten Versuch flüssigkonserviertes Sperma unter anderem mit dem „Sperm Vision“-Gerät (Minitüb, Landshut) untersucht wurde und der Messansatz möglichst frei von Partikeln sein sollte, wurde die Katalase-Lösung mit einem sterilen Aufsatzfilter (Flüssigkeitsfilter Clinico, Porengröße 0,22µm, Bad Hersfeld, Deutschland) gefiltert.

Herstellung des Caprogen-Verdünners (250 ml)

- a) 232,5 ml Pufferlösung abmessen
- b) 2,5 ml Hexanlösung abmessen und zugeben
- c) 2,5ml gefilterte Katalaselösung aus dem Kühlraum zugeben
- d) in diesem Gemisch 0,1g Citronensäure [$C_6H_8O_3 \times H_2O$] (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) lösen
- e) 12,5ml gefiltertes (Eigelbfilter, Firma Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) Eidotter (Fabrikat „Wiesenhof Eifix“, Firma EIPRO Vermarktungs GmbH, Lohne, Deutschland) vorsichtig zugeben und alles gut vermischen

Danach wird der Verdünner auf 2 – 5° Celsius heruntergekühlt. Diese Abkühlung ist erforderlich, damit der Caprogen-Verdünner das jetzt einzuleitende Stickstoffgas absorbieren kann und die Schaumbildung während der Gaseinleitung reduziert wird. Die Stickstoffsättigung erfolgt durch Einleiten des Gases über einen Zeitraum von 30 Minuten. Danach wird der Luftraum über dem Verdünner mit Stickstoffgas aufgefüllt und das Glas fest verschlossen. Vor Gebrauch ist der Verdünner auf Raumtemperatur zu erwärmen und erneut zu begasen. Falls das Verdünnermedium über längere Zeit gebraucht wird, ist es ratsam die Stickstoffeinleitung zu wiederholen.

5.1.2. Fertigstellung des kommerziellen Caprogen[®] - Verdünners

Der kommerzielle Caprogen-Verdünner (New Zealand Genetics, Hamilton, New Zealand) besteht zu 10 % aus Caprogen-Konzentrat, 85% zweifach destilliertem Wasser und 5% Eidotter. Man vermischt die Anteile vorsichtig miteinander und kühlt das Medium dann für 30 Minuten auf 5°C ab. Danach findet wie beim „selbst hergestellten“ Verdünner die Begasung mit Stickstoffgas statt. Wichtig ist dabei, dass der Behälter sofort nach der Stickstoffeinleitung fest verschlossen und bis zur Verwendung am selben oder am darauf folgenden Tag bei Kühlraumtemperatur gelagert wird. Hier ist mehrmaliges Begasen ebenfalls zu empfehlen, wenn der Verdünner über mehrere Stunden benutzt wird.

5.1.3. Auswahl der Bullen

In den Laborversuch wurden vier Bullen (drei Altbullen, ein Jungbulle) einbezogen. Von drei Bullen konnten jeweils 7 Ejakulate und von einem der Altbullen drei Ejakulate genutzt werden.

5.1.4. Spermakonservierung und – aufbewahrung

Nach der Spermauntersuchung wurde für jedes Ejakulat aufgrund der Ausgangsspermienkonzentration, der im verdünnten flüssigkonservierten Sperma angestrebten Spermienkonzentration und der notwendigen Anzahl an Pailletten die benötigte Menge an Sperma und Verdünner berechnet (Laborsoftware „BullenDoku“, Datenbank Microsoft ACCESS). Dabei wurde von einer konstanten

Konzentration von $21,7 \times 10^6$ Spermien/ml in dem vollständig verdünnten Ejakulat bzw. von 5×10^6 Spermien/Paillette ausgegangen.

In diesem Versuch gab es zwei Versuchsvarianten: „selbst hergestellter“ und kommerzieller Caprogen-Verdünner. Somit wurde der benötigte Anteil jeden Ejakulates in zwei Teile geteilt und dementsprechend verdünnt. Die Verdünnung erfolgte jeweils in zwei Schritten. Zunächst wurde für jede Versuchsvariante unabhängig von Spermienkonzentration und Spermavolumen ein Gefäß mit auf 32°C erwärmten 1,8 ml Verdünner bereitgestellt. Im ersten Schritt der Verdünnung wurde die benötigte Spermamenge dieser kleinen Menge an Verdünner zugefügt. Die so vorverdünnte Probe wurde dann für 15 Minuten - gerechnet ab der exakten Sprungzeit - in ein auf 23°C geregeltes Wasserbad gestellt. Daraufhin folgte eine weitere Abkühlung auf 21°C , indem die Proben für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur abgestellt wurden. Danach erfolgte die vollständige Verdünnung mit auf 21°C temperiertem Caprogen-Verdünner der jeweiligen Variante. Die Konfektionierung und das Bedrucken der speziell für Flüssigkonservierung entwickelten feinen Pailletten (Firma IMV, L'Aigle, Frankreich) wurde bei Raumtemperatur mit einer Abfüllmaschine (Typ MPP 133, Firma Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) und nachgelagertem Domino-Drucksystem (A200 MINIJET Transport Unit) durchgeführt. Danach wurden die Pailletten in eine auf 15°C temperierte Klimabox (Pöttker, Nortrup, Deutschland) verbracht.

5.1.5. Untersuchung der flüssigkonservierten Proben

Üblicherweise wird für den Besamungseinsatz bestimmter flüssigkonservierter Samen innerhalb von 72 Stunden nach der Produktion versamt. In diesem Zeitraum kann die Befruchtungsfähigkeit auf hohem Niveau erhalten werden. Um jedoch mögliche Unterschiede im Konservierungserfolg im Labormaßstab so deutlich wie möglich zu machen, wurden die Versuchschargen über einen Zeitraum von einer Woche untersucht.

Wenn man den Produktionstag des flüssigkonservierten Spermas als „Tag 0“ betrachtet, so wurden die Proben an den Tagen 1, 3 und 7 mit den nachfolgend beschriebenen Untersuchungsmethoden im Resistenztest über 125 Minuten analysiert. Dazu wurden pro Variante jeweils fünf Pailletten aus der Klimabox entnommen und diese fünf gemeinsam in einen Tube entleert, der in einem Blockthermostat auf 37°C erwärmt worden war. Der Zeitpunkt des Erwärmens entsprach 0 Minuten im durchgeführten Resistenztest.

Es wurden folgende Tests angewendet:

- V%: nach 5, 35, 95 und 125 Minuten
- Analyse mit Sperm Vision: nach 45 Minuten
- % NAR: nach 35 Minuten
- Eosin-Nigrosin-Färbung: nach 35 Minuten

5.2. Caprogen-Feldversuch

5.2.1. Auswahl der Bullen

Für den Versuch wurden von zwei Altbullen 7 Ejakulate und von weiteren zwei Spitzenbulln derselben Altersklasse 8 Ejakulate verarbeitet.

5.2.2. Spermakonservierung

Jedem Ejakulat wurde der berechnete Anteil an Sperma entnommen, der für die bestellte Anzahl an Samenportionen für den jeweiligen Produktionstag notwendig war. Die Berechnung basierte darauf, dass von einer Konzentration von 20×10^6 Spermien/ml im verdünnten Samen bzw. von ca. 5×10^6 Spermien/Besamungsportion ausgegangen wurde. Die benötigte Menge an nativem Sperma wurde daraufhin wiederum für die zwei Versuchsvarianten gesplittet. Die eine Hälfte wurde mit kommerziellem Caprogenverdünner verarbeitet, die andere Hälfte mit selbst hergestelltem Medium. Die weitere Aufbereitung des Spermas entsprach Pkt. 5.1.4.

5.2.3. Kontrolluntersuchung der flüssigkonservierten Proben

Bevor der flüssigkonservierte Samen an den Landwirtschaftsbetrieb geliefert wurde, wurden von jedem Bullen jeweils drei Pailletten untersucht. Der Inhalt wurde in einem Tube bei 37°C vermischt. Aus diesem Gemisch wurde sowohl eine subjektive Motilitätsschätzung als auch eine Motilitätsanalyse mit dem CMA-System „Sperm Vision“ durchgeführt. Spermachargen, die vom Laborpersonal mit weniger als 45 % Vorwärtsbewegung beurteilt wurden, wurden verworfen.

5.2.4. Einsatz in der künstlichen Besamung

Der Empfänger jeder Lieferung erhielt zur Hälfte Samen des gewählten Bullen, der mit kommerziellem Caprogen-Verdünner verdünnt war und zur anderen Hälfte mit selbst hergestelltem Verdünner aufbereitetes Sperma. Diese Portionen sollten möglichst zu gleichen Teilen versamt werden. Insgesamt 44 Besamungstechniker und Tierärzte führten die Inseminationen durch.

Für die Ermittlung des Besamungserfolges wurde das 60-90-NNR-Ergebnis verwendet.

5.3. Untersuchungen zum Einsatz von N-Acetylcystein in einem eidotterfreien und einem eidotterhaltigem Tiefgefrierverdünner

In diesem Versuch wurden zwei Varianten von Tiefgefrierverdünnern bezüglich ihres Konservierungseffektes verglichen, wobei einer davon eidotterhaltig, der andere als Ersatz für dieses tierische Protein einen Lecithin-Extrakt enthielt. Außerdem wurden noch verschiedene Konzentrationen des Antioxidanz N-Acetylcystein hinzugefügt, um samenzellschädigende Effekte durch Lipidperoxidation zu verringern.

5.3.1. Verwendete Verdünnermedien

Eidotterhaltiger Verdünner „Triladyl®“

Als eidotterhaltiger Verdünner wurde der im Routinebetrieb der künstlichen Besamung häufig genutzte Triladyl-Verdünner (Firma Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) verwendet. Das Verdünnerkonzentrat besteht aus folgenden Komponenten und ist unter kühlen (5°C) und lichtgeschützten Bedingungen 6 Monate haltbar:

- Reinstwasser
- Glycerin
- Tris-Puffer
- Citronensäure
- Fructose

Antibiotikakonzentration nach Herstellung des gebrauchsfertigen Verdünners (in 100ml):

- 5,0 mg Tylosin
- 25,0 mg Gentamycin
- 30,0 mg Spectinomycin
- 15,0 mg Lincomycin

Der Verdünner wurde täglich frisch angesetzt. Dafür wurde - wie in den Herstellerangaben angegeben - ein Teil Verdünnerkonzentrat mit drei Teilen Reinstwasser und einem Teil Eidotter versetzt und gut vermischt. Als Eidotter wurde pasteurisiertes Flüssigeigelb („Wiesenhof Eifix“, Firma EIPRO Vermarktungs GmbH, Lohne, Deutschland) verwendet, das aus Geflügelbeständen mit einem definierten Hygienestandard stammt.

Eidotterfreier Verdünner „Bioxcell®“

Das Bioxcell- Konzentrat (IMV Technologies, L'Aigle, France) enthält unter anderem Antioxidationsmittel, Phospholipide und entsprechend der europäischen Norm EC No 88/ 407 Antibiotika (Lincomycin, Spectinomycin, Gentamycin, Tylosin). Anstelle der in herkömmlichen Verdünnern zugesetzten tierischen Produkte, ist diesem „eigelblosen“ Medium ein Sojabohnen-Extrakt - das Lecithin- zugefügt. (Herstellerangaben)

Das Ansetzen dieses Verdünnermediums wurde wie in den Herstellerangaben beschrieben durchgeführt. Das bezogene Verdünnerkonzentrat wurde mit Reinstwasser im Verhältnis 1 + 5 verdünnt und vorsichtig geschwenkt. Danach wurde das Medium für zehn Minuten auf eine Temperatur von 32 - 34°C erhitzt und danach auf die für die Verdünnungsschritte notwendige Temperatur abgekühlt. Auch dieser Verdünner wurde täglich frisch hergestellt und innerhalb von sechs Stunden verbraucht.

Zusatz von N-Acetylcystein [NAC]

In diesem Versuch wurde mit insgesamt 12 verschiedenen Varianten gearbeitet. Pro Verdünnervariante wurden 6 verschiedene Konzentrationen an NAC verwendet, die ein Spektrum von 0 mmol, 4 mmol, 6 mmol, 8 mmol, 10 mmol und 12 mmol NAC / 1 Verdünner umfassten. Hierfür wurde an jedem Versuchstag eine Stammlösung hergestellt, die die höchste Konzentration an NAC enthielt und diese auf die anderen fünf benötigten NAC-Konzentrationen verdünnt.

NAC-Verdünnungsreihe für NAC-Laborversuch:

MG NAC: 163,2

mMol/ l	mg/l	mg/50ml	mg/200ml
0	0	0	0
4	652,8	32,6	130,4
6	979,2	49	196
8	1305,6	65,3	261,2
10	1632	81,6	326,4
12	1958,4	97,9	391,7

Nachverdünnung der 200 ml 12 mMol NAC/l - haltigen Stammlösung [SL]:

mMol/l	Verd.grad [1:x]	SL[ml]	Verdünner[ml]	inges. NAC-Verdünner [ml]
0		0	60	60
4	3	20	40	60
6	2	30	30	60
8	1,5	40	20	60
10	1,2	50	10	60
12		60	0	60

5.3.2. Auswahl der Bullen

Von drei Bullen (2 Jungbullen, 1 Altbulle) konnten vier Ejakulate und von einem Altbullen zwei Ejakulate in den Versuch einbezogen werden. Aus arbeitstechnischen Gründen war es hier wichtig, dass die nativen Samenproben eine Mindestspermienkonzentration von 1000×10^6 /ml enthielten und dass das Spermavolumen 4,5 ml nicht unterschritt.

5.3.3. Verdünnung und Gefrierkonservierung

Für jedes Ejakulat wurde berechnet, wieviel Samen und wieviel Verdünner für $65,2 \times 10^6$ Spermien / ml verdünntes Sperma bzw. für 15×10^6 Spermien/Paillette in beiden Verdünner-Varianten notwendig waren. Da jedoch pro Verdünner wiederum mit sechs verschiedenen Konzentrationen von NAC gearbeitet wurde und eine labortechnisch exakte und möglichst spermienfreundliche Verarbeitung angestrebt wurde, musste gewährleistet werden, dass 0,4 ml Sperma pro Variante nicht unterschritten wurden, weshalb - wie in Pkt. 5.3.2 erwähnt - jedes unverdünnte Ejakulat mindestens 1000×10^6 Spermien / ml in einer Gesamtmenge von mindestens 4,5 ml enthalten musste. Ebenfalls aus arbeitstechnischen Gründen wurde eine einstufige Verdünnung durchgeführt. Der Verdünner mit den verschiedenen NAC-Konzentrationen wurde in einem Wasserbad bei einer Temperatur von 32°C gehalten. Nach der Untersuchung der nativen Probe wurde hiermit die vollständige Verdünnung durchgeführt und die Gefäße dann für 20 Minuten - gerechnet ab dem Ejakulationszeitpunkt - in ein Wasserbad von 23°C verbracht. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Proben für ca. 3,5 Stunden in eine auf 5°C temperierte Kühltheke gestellt, wo nach der Äquilibrationsphase auch das Abfüllen in Pailletten (Typ: Mini Paillette, Einheit 0,25 ml, Firma IMV, France) und das Bedrucken stattfand. Im Anschluss an das Auflegen auf Rampen erfolgte in einem Einfrierautomaten (Firma Nifa, Holland) innerhalb von 8 Minuten das Einfrieren in Stickstoffdampf von -95°C. Danach wurden die Pailletten in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196°C in einem Biocontainer gelagert.

5.3.4. Untersuchung der aufgetauten Proben

Zunächst erfolgte jeweils das Auftauen von drei Pailletten pro Variante in einem Wasserbad mit 38°C für 10 Sekunden. Das Sperma wurde vereinigt und im Rahmen eines Resistenztestes bei 37°C inkubiert. Es wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- V%: nach 5, 35, 95 und 125 Minuten
- Analyse mit Sperm Vision: nach 45 und 125 Minuten
- % NAR: nach 35 Minuten
- SYBR 14/PI (fluoreszenzmikroskopische Auswertung): nach 35 Minuten

5.4. Besamungsversuch mit N-Acetylcystein-Zusatz in einem eidotterfreien und einem eidotterhaltigem Verdünner

5.4.1. Auswahl der Bullen

Drei Altbullen, für die die Samennachfrage sehr hoch war, konnten in diesen Versuch einbezogen werden. Von einem der Tiere wurden sieben Ejakulate gewonnen, von den beiden anderen acht.

5.4.2. Spermakonservierung

Wie unter Pkt. 5.3.1 beschrieben, wurden auch hier die beiden Verdünner Triladyl und Bioxcell zur Verarbeitung der Ejakulate benutzt. Allerdings wurden die beiden Medien nur in Kombination von 0 und 8 mmol NAC/ml zur Verdünnung herangezogen. Die Verarbeitung der Ejakulate erfolgte analog Pkt. 5.3.3, wobei jeweils ein Ejakulat in den vier angeführten Varianten verarbeitet wurde.

5.4.3. Untersuchung der aufgetauten Proben

Die Qualität der eingefrorenen Spermachargen wurde so überprüft, dass innerhalb einer Woche nach der Produktion jeweils zwei Pailletten pro Variante unter Standardbedingungen (10 sec, 38°C) aufgetaut und von Fachpersonal eine subjektive Motilitätsschätzung durchgeführt wurde. Bei einer Vorwärtsbeweglichkeit von weniger als 35% wurde die Spermacharge vom Besamungsversuch ausgeschlossen.

5.4.4. Einsatz in der künstlichen Besamung

Die Besamungstechniker und Tierärzte erhielten von den in den Versuch einbezogenen Bullen von jeder Variante gleich viele Pailletten. Diese sollten wiederum so weit möglich auch zu gleichen Teilen vorwiegend zu Erstbesamungen eingesetzt werden. Die Versuchsproben wurden insgesamt an 166 verschiedene Fachkräfte geliefert.

Für die Ermittlung des Besamungserfolges wurde das 60-90- NNR- Ergebnis verwendet.

5.5. Laborversuch I zum Thema „Coating-Effekt“

5.5.1. Auswahl der Bullen

Es wurden jeweils vier Ejakulate von drei Jungbullen in den Laborversuch einbezogen.

5.5.2. Verdünnung und Gefrierkonservierung

In diesem Versuch wurde ein Anteil des Ejakulats (in der Regel 1ml) ohne vorherige Untersuchung auf Tauglichkeit, also sofort nach der Gewinnung (0 Minuten), im Verhältnis 1 : 5 mit Triladyl-Verdünner verdünnt und bis 10 Minuten nach Sprungzeitpunkt bei 32°C gehalten (Hauptvariante: sofortige (Vor-)Verdünnung). Von dem verbliebenen Ejakulat wurde innerhalb der ersten Minuten nach der Ejakulation die notwendige Menge an Spermata für die Routineuntersuchung entnommen und die restliche Samenprobe unbehandelt im Spermaauffanggefäß in dem 32°C warmen Kugelbad gelassen. Davon wurde 10 Minuten nach Sprungzeitpunkt ein gleich großer Anteil, d. h. ebenfalls 1 ml originäres Sperma, im Verhältnis 1 : 5 mit Triladyl-Verdünner verdünnt (Hauptvariante: verzögerte (Vor-)Verdünnung). Nur taugliche Ejakulate wurden weiterverarbeitet. Im Anschluss an die 10-minütige Inkubation der beiden Hauptvarianten bei 32°C schloss sich die Abkühlungsphase von 20 Minuten an, in der das vorverdünnte Sperma auf eine Temperatur von 23°C abkühlte.

Danach fand der zweite Schritt der Verdünnung statt. Die „0-Minuten“-Probe (Hauptvariante: sofortige (Vor-)Verdünnung) wurde hierzu wieder gesplittet und der eine Teil (2 ml) wiederum im Verhältnis 1 : 5 verdünnt, was einer Endverdünnung von 1 : 25 entsprach. Vom anderen Teil der vorverdünnten Probe wurde 1ml im Verhältnis 1 : 10 endverdünnt, was dann einem Verdünnungsgrad von 1 : 50 bedeutete. Nach dem gleichen Prinzip wurde mit der „10-Minuten“-Probe (Hauptvariante: verzögerte (Vor-)Verdünnung) vorgegangen. Somit wurden hier vier verschiedene Varianten hergestellt: zwei Verdünnungszeit-Varianten mit jeweils zwei verschiedenen Verdünnungsverhältnis-Varianten. Abbildung 2 zeigt den Versuchsaufbau noch einmal zusammenfassend.

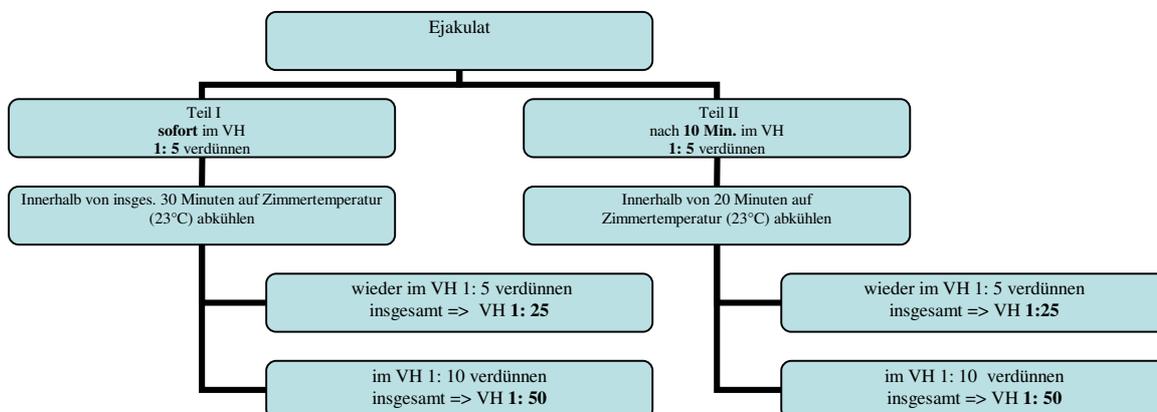


Abb. 2: Versuchsaufbau „Coating-Effekt“ I

Das weitere Abkühlungsregime, die Äquilibrierungszeit, die Konfektionierung und das Einfrieren erfolgten wie unter Pkt. 5.3.3 beschrieben.

5.5.3. Beurteilung der aufgetauten Proben

Für die Untersuchung des aufgetauten Spermas im Resistenztest wurden folgende Methoden eingesetzt:

- V%: nach 5, 35, 95 und 125 Minuten
- Analyse mit Sperm Vision: nach 45 und 125 Minuten
- % NAR: nach 35 Minuten
- Rhodamin 123/Propidiumiodid (flowzytometrische Auswertung): nach 35 Minuten

5.6. Laborversuch II zum Thema „Coating-Effekt“

Im Rahmen der beiden im Folgenden beschriebenen Laborversuche wurde überprüft, wann der für die Befruchtungsfähigkeit günstigste Zeitpunkt der Verdünnung eines Bullenejakulates ist, so dass ein auf Seminalplasmaproteine zurückzuführender Coating-Effekt in ausreichendem Maße stattfinden kann (siehe III.5). Dies wurde außerdem in Kombination mit zwei verschiedenen Verdünnungsverhältnissen untersucht, wobei überall nur ein eigelhaltiger Verdünner zum Einsatz kam.

5.6.1. Auswahl der Bullen

In den Versuch wurden vier Bullen einbezogen. Bei den Tieren handelte es sich um drei Jungbullen und einen Altbullen. Diese mussten aus arbeitstechnischen Gründen in der Regel Ejakulate mit mindestens 4 ml Volumen produzieren und durften eine Untergrenze in der Spermienkonzentration von 1000×10^6 Spermien/ml nicht unterschreiten. Im Rahmen dieses Versuches konnten von drei Tieren jeweils drei Ejakulate und von einem zwei Spermaproben gewonnen werden.

5.6.2. Verdünnung und Gefrierkonservierung

Im Anschluss an die Spermabeurteilung wurde die notwendige Verdünnermenge berechnet. Jedes Ejakulat wurde primär gesplittet und im Verhältnis 1 : 25 und 1 : 50 einstufig mit Triladyl-Verdünner verdünnt. Außerdem mussten im Versuch die Proben in den beiden Verdünnungsstufen zu jeweils vier verschiedenen Zeitpunkten mit dem Verdünner versetzt werden. Dies geschah 5, 10, 20 und 30 Minuten nach der dokumentierten Ejakulationszeit, weshalb auch bei der vorangegangenen Beurteilung sehr zügiges Arbeiten verlangt war.

In dem Versuch ergaben sich bei einer 1 : 25- Verdünnung Spermienzahlen von ca. $12 - 14 \times 10^6$ in der Paillette und bei einer Verdünnung von 1 : 50 etwa $6 - 7 \times 10^6$ in einer Paillette. Die genaue absolute Anzahl war jedoch zweitrangig.

Die Abkühlungszeiten wurden wie in der Routineproduktion gestaltet. Innerhalb von 20 Minuten wurden die verdünnten Proben von 32°C auf 23°C abgekühlt und danach in eine Kühltheke mit 5°C gestellt, wo sich die 3,5- stündige Äquilibrierungszeit anschloss. Konfektionierungsmethode und Einfriervorgang entsprachen Punkt 5.3.3.

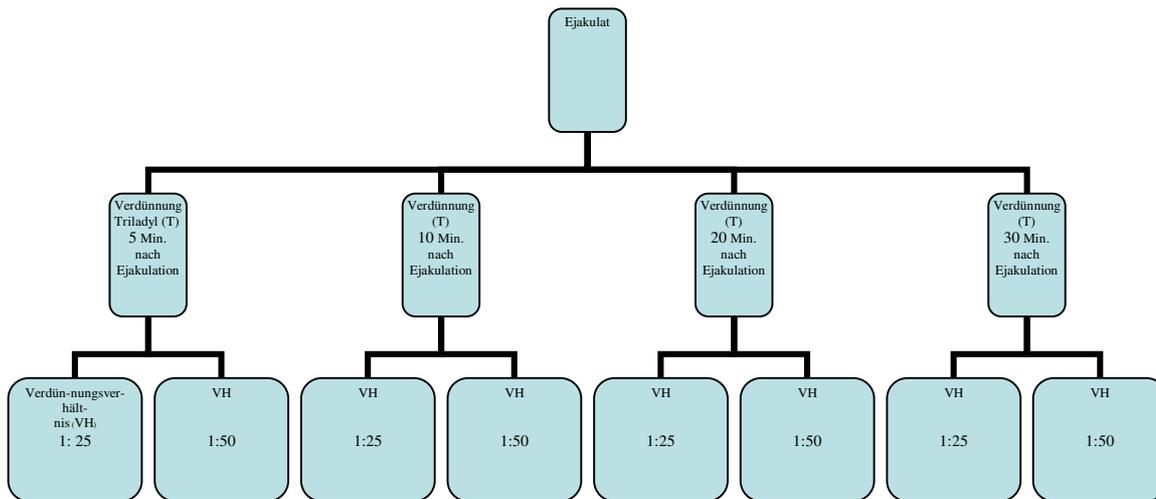


Abb.3: Versuchsaufbau „Coating- Effekt“ II

5.6.3. Beurteilung der aufgetauten Proben

Für die Untersuchung des aufgetauten Spermias im Resistenztest wurden die gleichen Methoden eingesetzt wie im oben genannten Laborversuch I zum Coating- Effekt (siehe Pkt. III.5.5.3)

6. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit den Statistikprogrammen SAS und SPSS für Windows, Version 11 (III.5.1.) bzw. 12 (III.5.3., III.5.5. und III.5.6.) vorgenommen. Dabei kamen neben der deskriptiven Statistik (III.5.1.), die Varianzanalyse (lineares Modell mit gemischten Effekten; III.5.1., III.5.3., III.5.5., III.5.6.) und der Chi²- Test (III.5.2. und III.5.4.) zum Vergleich der Häufigkeit zur Anwendung. Für den Chi²- Test wurden Signifikanzschwellen nach Fisher und Yates (CAVALLI- SFORZA L1969) angewandt.

IV. Ergebnisse

1. Vergleich von zwei Varianten des Caprogen-Verdünners für die Flüssigkonservierung

1.1. Laborversuch

Es wurden zwei Varianten des Caprogen-Verdünners zur Flüssigkonservierung bezüglich ihrer spermenschützenden Eigenschaften in einem Thermoresistenztest über 125 Minuten mit einander verglichen. Das kommerzielle Produkt (kC) aus Neuseeland und ein Produkt, das selbst hergestellt (eC) wurde, wurden zur Verdünnung von insgesamt 24 Ejakulaten von 4 Bullen herangezogen und jeweils über einen Zeitraum von 7 Tagen (1., 3. und 7.Tag nach der Produktion) verschiedenen spermatologischen Tests unterzogen. Das Gesamtergebnis wird im Anhang in den Tabellen 1 und 2 dargestellt, dazugehörige Einzelergebnisse ebenfalls im Anhang (Tab. 3 und 4 und Abb. 1 bis 5). Die Mittelwerte solcher Parameter, die für die praktische Arbeit in Besamungsstationen am aussagekräftigsten erscheinen, sind in den Tabellen 1 und 2 im Text aufgelistet. Differenzen zwischen Varianten sind nur dann statistisch gesichert, wenn Angaben dazu gemacht werden.

Ergebnisse der subjektiven Motilitätsschätzung (V%; Tab.1 und Abb. 5 im Text sowie Anhang, Tab.1)

Fünf Minuten nach Probeninkubation scheinen die beiden Varianten bezüglich dieses Parameters am 1. und 3. Tag zumindest gleichwertig zu sein, wohingegen am 7. Tag der kC mit durchschnittlich 39% (± 12) eine statistisch gesicherte ($P = 0,0057$) höhere Motilität aufweist, als die Chargen, die mit dem selbst hergestellten Medium (35 ± 12) verdünnt wurden. Betrachtet man die Spermienmotilität an den 3 Untersuchungstagen zum Zeitpunkt 35 Minuten, so ist auch hier an den Tagen 1 und 3 kein Unterschied zu verzeichnen. Am 7. Tag zeigt der eC (36 ± 11) jedoch eine etwas bessere Motilität als das kommerzielle Produkt (34 ± 12). Nach 95 Minuten ist der geschätzte Anteil motiler Spermien nur am 3.Tag in der selbst hergestellten Variante (57 ± 5) etwas höher als in der kommerziellen (55 ± 7). Am ersten und dritten Tag nach 125 Minuten Inkubation ist eC ebenfalls um etwa 1% besser, wobei sich diese Tendenz am letzten Untersuchungstag umkehrt. Allgemein kann man in Bezug auf die subjektiv ermittelte Motilität kaum Unterschiede zwischen kommerziellem und selbst hergestelltem Verdünner feststellen, was auch durch die in Tabelle 1 aufgelisteten Mittelwerte noch einmal verdeutlicht wird. Die einzelnen Bullen zeigen lediglich am 7.Tag eine relativ deutliche Variabilität. Diese Differenzen beziehen sich jedoch hauptsächlich auf einen Vergleich mit den anderen verwendeten Bullen und nicht auf einen Unterschied zwischen den beiden Verdünnern. Bullen B und D fallen in ihrer Motilitätsraten nach einer Woche etwas stärker ab als A und C ($P \leq 0,05$, Anhang, Tab. 1, 3 und 4, Abb. 1).

Tab. 1

Aufbewahrungszeit	Verdünnervariante	V% im Resistenztest	Eosin % lebend	NAR %
Tag 1	Caprogen kommerziell	62 ± 6	$86,1 \pm 3,7$	$86,4 \pm 3,5$
	Caprogen Eigenherstellung	62 ± 5	$87,3 \pm 2,2$	$85,8 \pm 3,8$
Tag 3	Caprogen kommerziell	57 ± 7	$83,8 \pm 2,9$	$82,1 \pm 3,6$
	Caprogen Eigenherstellung	57 ± 4	$84,1 \pm 3,3$	$80,4 \pm 3,2$
Tag 7	Caprogen kommerziell	33 ± 11	$77,5 \pm 4,4$	$74,3 \pm 5,6$
	Caprogen Eigenherstellung	32 ± 10	$76,2 \pm 5,9$	$70,9 \pm 5,8$

Tab. 2

Aufbewahrungszeit	Verdünnervariante	% motil	% progressiv	VAP [$\mu\text{m/s}$]
Tag 1	Caprogen kommerziell	$62,5 \pm 7,1$	$44,6 \pm 10,6$	51 ± 8
	Caprogen Eigenherstellung	$66,1 \pm 5,3$	$48,2 \pm 9,0$	60 ± 9
Tag 3	Caprogen kommerziell	$59,2 \pm 7,8$	$35,9 \pm 10,3$	45 ± 9
	Caprogen Eigenherstellung	$65,7 \pm 6,3$	$44,1 \pm 7,8$	52 ± 8
Tag 7	Caprogen kommerziell	$42,8 \pm 6,6$	$20,0 \pm 8,9$	39 ± 11
	Caprogen Eigenherstellung	$58,9 \pm 9,2$	$33,7 \pm 9,4$	40 ± 9

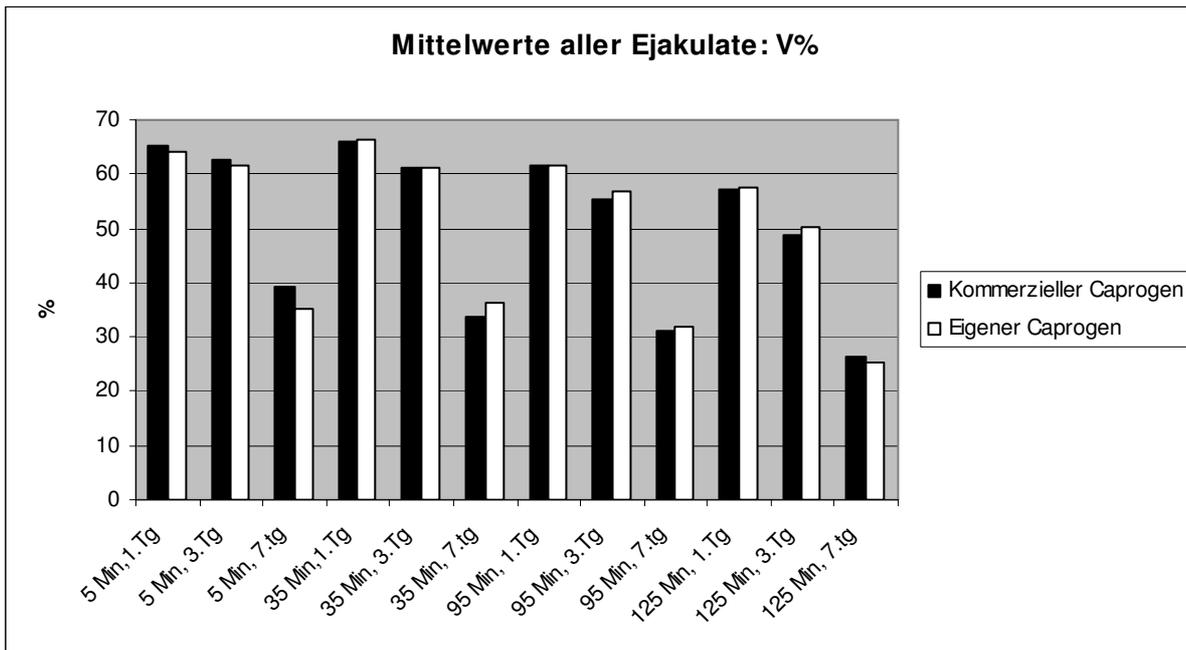


Abb. 5: Ergebnisse der subjektiven Motilitätsanalyse am 1., 3. und 7.Tag nach der Produktion und jeweils 5, 35, 95 und 125 Minuten nach Beginn der Probeninkubation bei 37°C

Ergebnisse der computergestützten Motilitätsanalyse (Sperm Vision)

Betrachtet man das Ergebnis mittels CMA-System in Bezug auf den Prozentsatz motiler Spermien, so fallen hier die durchwegs höheren Werte des selbst hergestellten Caprogen auf, die auch statistisch gesichert sind (Tab. 2, Abb.6). Am ersten Messtag beträgt die Differenz zugunsten eC 3,6% (P = 0,028), am 3.Tag 6,5% (P = 0,0004) und 1 Woche nach der Produktion 16,1% (P < 0,0001) motile Spermien. Hier steigt der Unterschied zwischen den beiden Medien im Laufe der Woche stark an.

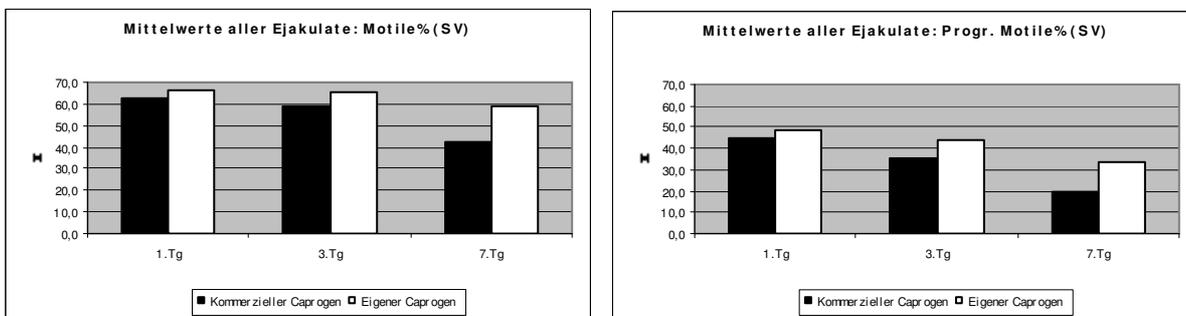


Abb.6: Anteil motiler und progressiv motiler Spermien (%) der beiden Verdüner im Vergleich am 1., 3. und 7. Tag nach der Produktion

Die gleiche Tendenz wird auch durch die Messungen des Anteils progressiv motiler Spermien deutlich. Auch hier steigt die Differenz zwischen den beiden Verdünnern im Verlauf der Messtage an. Die mit kommerziellem Verdüner verarbeiteten Chargen weisen an Tag 1 44,6% ($\pm 10,6$), die mit selbst hergestelltem Medium verdünnten dagegen 48,2 % (± 9) progressiv bewegliche Spermien auf. Dieser Unterschied steigt am Tag 3 auf 8,2% (P = 0,0015) und am letzten Untersuchungstag auf 13,7% (P < 0,0001) an. Die Ergebnisse der einzelnen Bullen spiegeln die allgemeinen Tendenzen dieser beiden Parameter wider (Anhang, Tab.3 und 4).

Betrachtet man die CMA-Auswertung in Bezug auf die VAP-Geschwindigkeit (Tab.2), mit der sich die Spermien fortbewegen, so sind hier für eC an den ersten beiden Messtagen höhere Werte zu verzeichnen (1.Tg.: $P = 0,0001$). Am 7. Tag verschwindet diese Differenz jedoch, da sich die Spermien beider Vergleichschargen dann mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $39 (\pm 11; kC)$ beziehungsweise $40 \mu\text{m}/\text{sek} (\pm 9; eC)$ fortbewegten. Die Bullen B, C und D zeigen bei Verdünnung mit eC deutlich höhere Geschwindigkeiten, wohingegen Bulle A zumindest am 1. Messtag etwa gleich hohe VAP- Werte in beiden Medien aufweist (Anhang, Abb.2).

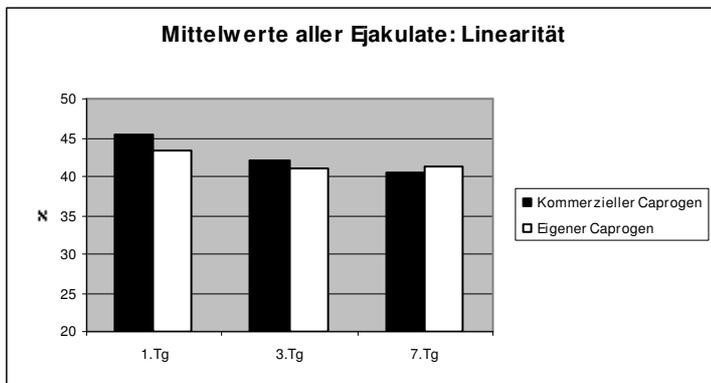


Abb.7: Linearität (%) der mit beiden Verdünnern verarbeiteten Chargen im Vergleich

In Bezug auf die Linearität ist zumindest an den ersten beiden Tagen das Gegenteil der Fall. Hier weisen die kC-Chargen etwas höhere Prozentsätze an Spermien mit linearer Bewegung auf als die der Vergleichsproben. Am 7. Tag kommt es dagegen zu einer um 1% höheren Linearitätsrate der eC-Proben. Allerdings sind die Unterschiede bezüglich dieses Parameters nicht gesichert (Tab.2 und Abb. 7).

Dies trifft auf die Ergebnisse der seitlichen Kopfauslenkung nicht zu (Abb.8 und Anhang Tab. 2). Die Bewegungsform der Spermien scheint sich in den beiden Medien relativ stark von einander zu unterscheiden. Die Kopfauslenkung der Spermien in eC (1.Tg.: $3,6 \pm 0,7$; 3.Tg.: $3,5 \pm 0,6$; 7.Tg.: $2,9 \pm 0,8$) ist zu allen Messzeitpunkten deutlich stärker ausgeprägt, als die der Zellen, aus Chargen mit dem kommerziellen Produkt (1.Tg.: $2,9 \pm 0,4$; 3.Tg.: $2,7 \pm 0,6$; 7.Tg.: $2,8 \pm 0,7$). Dieser Unterschied ist an den beiden ersten Untersuchungstagen statistisch gesichert ($P < 0,0001$). Im Anhang in Abb. 3 werden die Ergebnisse der einzelnen Bullen dazu dargestellt. Die Tendenz der Mittelwerte zeigt sich auch hier wieder, wobei hier vor allem die höheren ALH-Werte der Bullen B und C im eC auffallen. Im Laufe der Woche nimmt dieser Wert langsam ab, wohingegen das Ergebnis in den mit kC verdünnten Proben bei den Bullen von Anfang an niedriger, deshalb aber auch die Differenz zum letzten Messtag geringer ist.

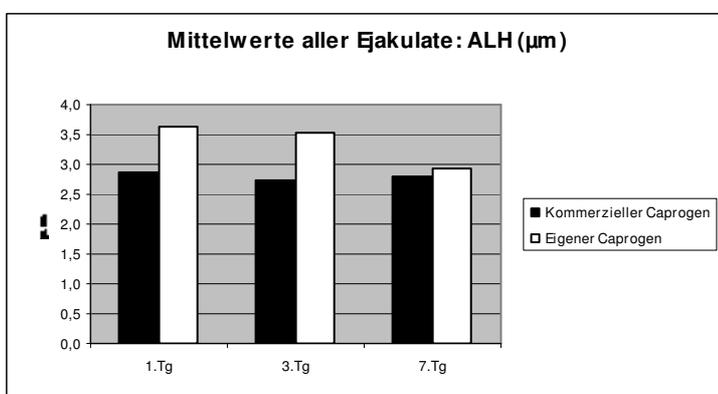


Abb.8: Vergleich der mit beiden Verdünnern verarbeiteten Chargen durch Messung der seitlichen Kopfauslenkung (ALH [μm]) der Spermien

Lebend-Tot-Färbung und Ermittlung des Anteils an Spermien mit normaler Akrosomstruktur (NAR)

Die Durchführung der Eosin-Nigrosin-Färbung nach 35 Minuten im Resistenztest lässt keinen Schluss auf deutliche Unterschiede in der Konservierungseignung eines der beiden Medien zu (Tab. 1, Anhang, Tab. 1, 3 und 4 und Abb. 4). Was den Anteil an Spermien mit unversehrtem Akrosom angeht, so schneidet das kommerzielle Produkt eindeutig besser ab (Tab. 1, Anhang, Abb. 5). Dies ist an allen drei Testtagen, und an Tag 3 ($P = 0,034$) und 7 ($P = 0,0087$) mit statistischer Sicherheit der Fall. Vergleicht man die vier Bullen bezüglich dieses Parameters miteinander, so weist bis auf den letzten Untersuchungstag immer der Bulle D den höchsten Prozentsatz lebender Zellen auf (Anhang, Tab.1, 3 und 4). Am ersten Tag unterscheiden sich die Werte von A von allen anderen signifikant ($P \leq 0,05$) am 3. Untersuchungstag nur A gegenüber D, und am letzten Tag sind keine bullenspezifischen Differenzen statistisch abzusichern.

1.2. Feldversuch

Aufgrund des Laborversuches erschienen die beiden Verdüner in ihren samenkonservierenden Eigenschaften relativ gleichwertig. Da man aus einem in vitro-Versuch jedoch nicht ohne weiteres auf das gleiche Ergebnis eines Besamungsversuches schließen kann, wurde mit den beiden Verdünnervarianten ein Feldversuch mit 29 Ejakulaten von 4 Bullen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengefasst dargestellt, wohingegen die dazugehörigen Einzelergebnisse im Anhang in Tabelle 5 aufgelistet sind. Die Tabellen enthalten auch Laborwerte der Ejakulate, die im Feldversuch eingesetzt wurden.

Tab. 3: Mit Hilfe von „Sperm Vision“ objektiv ermittelte Motilität von Ejakulaten, die mit kommerziell oder selbst hergestelltem Caprogen verdünnt wurden und im Feldversuch zur Besamung eingesetzt wurden

Bulle	% motil		% progressiv motil	
	Caprogen kommerziell	Caprogen Eigenherstellung	Caprogen kommerziell	Caprogen Eigenherstellung
E	63,0 ± 11,6	65,9 ± 8,5	41,1 ± 9,2	45,2 ± 13,7
G	56,5 ± 3,2	61,0 ± 6,6	31,2 ± 8,1	41,3 ± 10,0
H	63,0 ± 5,1	66,1 ± 5,9	41,1 ± 7,2	45,2 ± 11,4
S	63,2 ± 5,1	71,7 ± 4,8	37,6 ± 7,4	53,8 ± 7,8
Gesamt	61,7 ± 7,2	66,6 ± 7,2	38,1 ± 8,4	46,7 ± 11,3

Tab. 4: Befruchtungsergebnisse der im Feldversuch mit kommerziellem oder selbst hergestelltem Caprogen verarbeiteten Ejakulate

Bulle	Caprogen kommerziell		Caprogen Eigenherstellung	
	Anzahl EB	% NR	Anzahl EB	% NR
E	266	71,4	225	69,3
G	183	63,4	165	57,6
H	265	66,8	253	60,1
S	179	69,3	153	64,7
Gesamt	893	68,0*	796	63,1*

NR-Ergebnisse, die mit * gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant (Chi²-Test mit Signifikanzschwellen nach Fisher u. Yates, CAVALLI-SFORZA L 1969)

Mit dem kommerziellen Produkt wurden insgesamt 893 und mit dem Verdüner aus Eigenherstellung 796 Erstbesamungen durchgeführt. Es wurde ein Non Return-Ergebnis von 68,0% mit dem neuseeländischen Verdüner erzielt, wohingegen das selbst hergestellte Produkt nur 63,1% als Non Return-Rate erreichte (Tab. 4, Anhang Tab. 5). Die Differenz ist statistisch abgesichert.

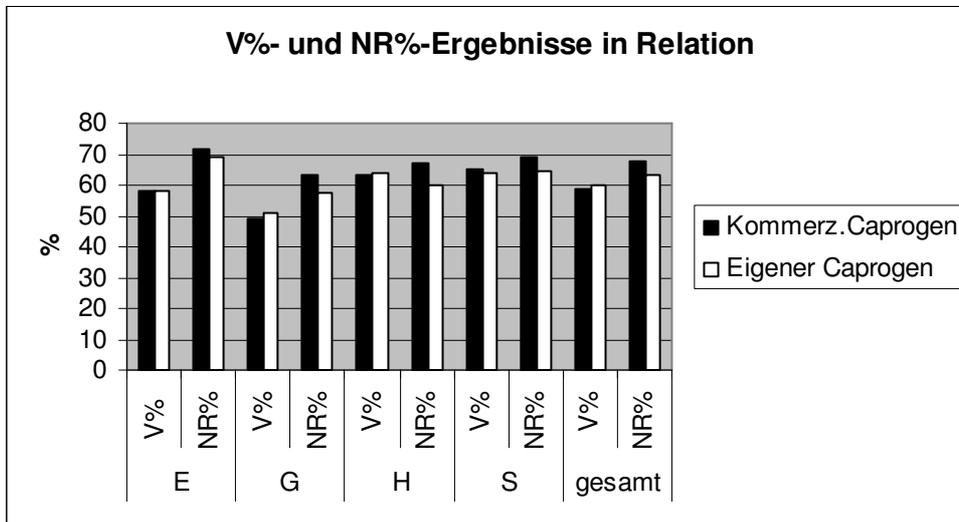


Abb.9: Ergebnisse der subjektiven Motilitätsschätzung (V%) und die dazugehörigen NR%-Ergebnisse der einzelnen Bullen

Die Chargen wurden vor Lieferung an den Kunden auf ihre Einsatztauglichkeit überprüft. Die subjektiven Motilitätsschätzwerte ergaben zwischen den beiden Varianten bei keinem Bullen merkliche Unterschiede (Abb.9, Anhang Tab. 5). Auch die computergesteuerte Motilitätsanalyse wurde durchgeführt (Tab. 3, Abb. 10 u. 11, Anhang Tab. 5). Die Ergebnisse entsprechen denen des Laborversuches. Der Anteil motiler Spermien und der Prozentsatz an Spermien, die sich progressiv fortbewegten, war bei den Chargen, die mit eC verdünnt worden waren, immer höher als die Werte der Vergleichschargen. Auch für die Geschwindigkeit der Samenzellen traf dies zu. Spermien der eC-Chargen bewegten sich weniger geradlinig fort als die der Proben, die mit neuseeländischem Verdüner aufbereitet worden waren. Dem entsprechend war auch die seitliche Kopfauslenkung der Samenzellen größer.

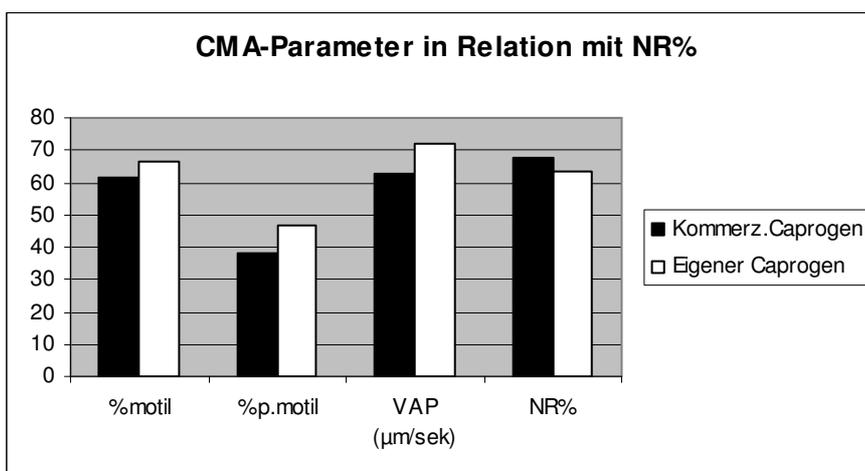


Abb.10: Ergebnisse der Sperm Vision-Messung in Relation mit NR%

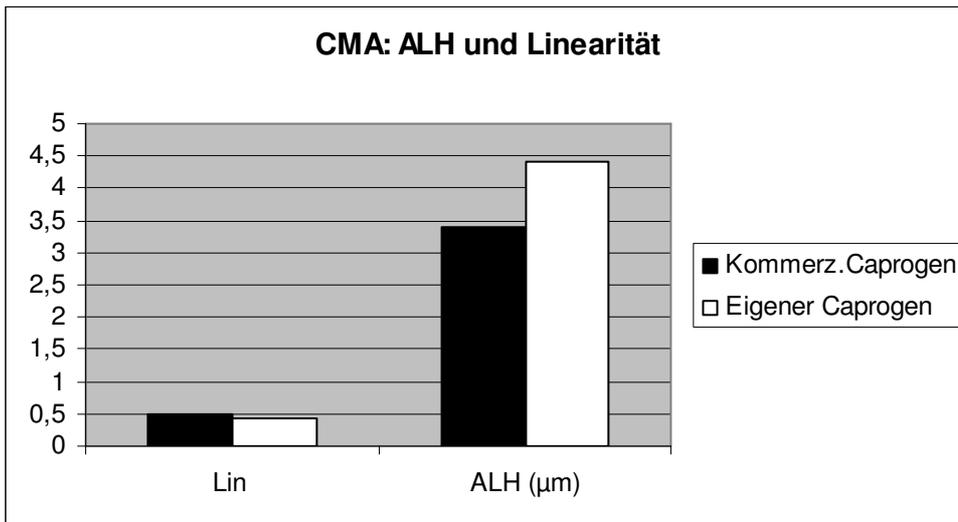


Abb.11: Laterale Kopfauslenkung (ALH) und Linearität der Spermien (Ejakulate aus dem Feldversuch)

Betrachtet man die Ergebnisse der einzelnen Bullen und ihrer Ejakulate (Tab. 3 und 4, Anhang, Tab. 5 und Abb. 6 bis 9), so ergeben sich für die inseminierten Pailletten des Bullen E (Anhang Abb. 6) die höchsten Befruchtungsergebnisse (kC: 71,4%; eC: 69,3%). Der Besamungserfolg dieses Tieres ist auch in Bezug auf beide Verdüner und auf die unterschiedlichen Ejakulate relativ konstant. Der Bulle mit dem niedrigsten Inseminierungserfolg, G (kC: 63,4%; eC: 57,6%; Anhang Abb. 7), zeigt dagegen auch unter den verschiedenen Ejakulaten große Schwankungen. Die Ejakulate 1 und 6 dieses Bullen ergaben mit eC höhere NR%-Ergebnisse, alle anderen jedoch schlechtere Ergebnisse, wenn sie mit diesem Produkt verdünnt worden waren. Den Rang mit den zweit niedrigsten Besamungserfolgen nimmt der Bulle H ein (kC: 66,8%; eC: 60,1%; Anhang, Abb. 8). Sein 6. Ejakulat ist vor allem für dieses niedrige Ergebnis verantwortlich, welches mit 38,7% bei der selbst hergestellten Verdünnervariante und 52,2% beim Vergleichsprodukt nur sehr geringen Besamungserfolg verbuchen konnte. Die kommerzielle Variante des 2. Ejakulates des Bullen S (Anhang, Abb. 9) ist dagegen diejenige, die mit 91,7% die höchste NR%-Rate erzielte, wobei die Vergleichsvariante nur 60% der besamten Tiere erfolgreich befruchten konnte. Allerdings wird die Sicherheit der Angaben zum Befruchtungserfolg in jedem Fall durch die geringe Anzahl an Erstbesamungen pro Ejakulat eingeschränkt.

2. Untersuchungen zum Einsatz von N-Acetylcystein in einem eidotterfreien und einem eidotterhaltigen Tiefgefrierverdünner

2.1. Laborversuch

In diesen Versuch wurden vier Bullen mit einbezogen, von denen insgesamt 14 taugliche Ejakulate gewonnen werden konnten. Wie unter Punkt II.5.3. beschrieben, wurden zwei Tiefgefrierverdünner getestet, von denen Triladyl® (T) eine eigelbhaltige Variante darstellt, wohingegen Bioxcell® (B) eigelblos ist. Außerdem wurde den Spermachargen in Konzentrationen von 0 bis 12 mmol/l das Antioxidanz N-Acetylcystein (NAC) hinzugefügt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 5 bis 7 und den Abbildungen 12 bis 15 sowie den Tabellen 6 bis 19 des Anhangs dargestellt. Wenn keine statistischen Angaben gemacht werden, sind die Ergebnisse nicht statistisch abzusichern.

Ergebnisse in Triladyl®

Betrachtet man alle Varianten, die mit Triladyl® verdünnt wurden, so fällt – was die subjektiv geschätzte Motilität (V%) angeht - folgendes auf (Anhang Tab. 6 und 7): V% ist bei allen NAC- Konzentrationen nach 5 Minuten Inkubation bei 37°C in einem Bereich von 45% (± 6 , 10 mmol/l) bis 49% (± 5 ; 0 und 8 mmol/l). Es sind kaum Abweichungen zu erkennen. Auch nach 35 und 95 Minuten sind keine Unterschiede zu sehen. Nach 125 Minuten sind etwas größere Variationen zwischen 0 mmol/l (21 ± 7) und 8 mmol/l (27 ± 6) auszumachen, die in diesem Fall auch statistisch abzusichern sind ($P = 0,001$). Bezüglich der Mittelwerte sind die 4 und 10 mmol/l- Varianten die mit der geringeren (34 ± 6) durchschnittlichen Spermienmotilität und die 8mmol/l- Variante die mit der tendenziell höchsten (37 ± 5 ; $P = 0,077$; Tab. 5, Abb. 12).

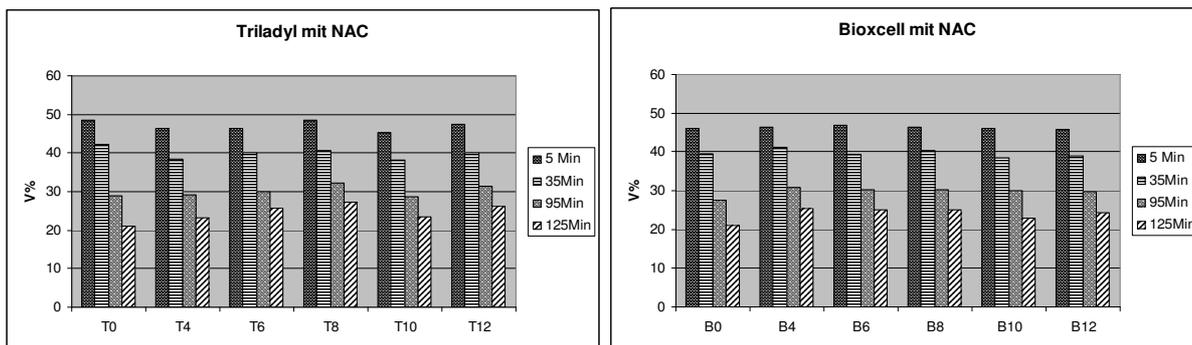


Abb.12: Mittelwerte V% aller untersuchten Ejakulate mit den Verdünnervarianten Triladyl® (T) und Bioxcell® (B), Zusatz von 0, 4, 6, 8, 10 oder 12 mmol N-Acetyl-cystein [mmol/l Verdünner]

Die Motilitätsanalyse, die mit dem CMA-System „Sperm Vision“ zum Zeitpunkt 45 Minuten und 125 Minuten nach dem Auftauen durchgeführt wurde, verdeutlicht das gleiche Motilitätsverhalten wie die subjektive Analyse. Die prozentualen Anteile motiler (% mot) Spermien sind zum Zeitpunkt 45 Minuten in den Varianten 8 mmol/l ($36,8 \pm 9,2$; $P = 0,029$) und 12mmol/l ($39,0 \pm 9$; $P < 0,05$) leicht höher als in den anderen NAC-Triladyl-Varianten (Tab. 6). Ähnliches gilt auch für die progressiv vorwärtsbeweglichen (%p mot) Spermien, die nach 45 Minuten 25,9% ($\pm 8,6$; $P = 0,060$) bei 8 mmol/l und 28,6% ($\pm 8,8$; $P < 0,05$) bei 12mmol/l ausmachen. Alle anderen Varianten weisen im Vergleich dazu durchschnittlich niedrigere Motilitätsraten auf. Auch zum Zeitpunkt 125 Minuten stellt die computergesteuerte Motilitätsanalyse (%mot und %p mot) niedrigere Prozentsätze für die Varianten mit 0, 4 ($P > 0,05$), 6 ($P < 0,05$) und 10 mmol/l ($P < 0,05$) NAC im Vergleich zu 8 ($P < 0,05$) und 12 mmol/l ($P < 0,05$) fest (Tab. 7).

Bezüglich der Spermengeschwindigkeit (VAP in $\mu\text{m}/\text{sek}$) lässt sich aus der Abbildung 13 erkennen, dass sich zum Zeitpunkt 45 Minuten nach Beginn der Probeninkubation die Werte in einem Bereich von 56 $\mu\text{m}/\text{sek}$ (± 7 ; 0 mmol/l) und 62 $\mu\text{m}/\text{sek}$ (± 4 ; 6 und 8 mmol/l; $P = 0,001$) bewegen, mit einer

durchschnittlichen Geschwindigkeit über alle Konzentrationen von 60 µm pro Sekunde. Zum nächsten Messzeitpunkt - 125 Minuten nach Inkubationsbeginn - fiel der T0-Wert auf 42 µm/sek (±7) als deutlich niedrigstes Ergebnis auf. Die höchste Geschwindigkeit wurde bei der T12-Variante mit 57 µm/sek (±6; P < 0,05) erhalten, während alle anderen NAC-Konzentrationen Werte dazwischen einnahmen. Insgesamt ergab sich ein Mittelwert über alle Konzentrationen von 53 µm/sek (±9).

Tab. 5: Spermatologische Tests von Ejakulaten, die mit den Verdünnern Triladyl® (T) und Bioxcell® (B) und mit einer Konzentration von 0, 4, 6, 8, 10 oder 12 mmol N-Acetylcystein verdünnt wurden

mmol A-Cys	Triladyl® mit Eidotter			Bioxcell® ohne Eidotter		
	V% im Resistenztest*	NAR %**	SYBR % lebend**	V% im Resistenztest*	NAR %**	SYBR % lebend**
0	35 ± 5	61,4 ± 6,7	38,4 ± 4,6	34 ± 5	66,5 ± 7,5	38,4 ± 5,8
4	34 ± 6	62,4 ± 7,1	35,8 ± 2,4	36 ± 6	64,4 ± 8,3	38,5 ± 4,2
6	36 ± 5	62,6 ± 6,8	38,4 ± 5,6	35 ± 5	66 ± 11,1	39 ± 4,9
8	37 ± 5	63,8 ± 7,5	40,9 ± 6,4	36 ± 5	65,1 ± 9,5	38,2 ± 5,7
10	34 ± 6	62 ± 8,6	36,5 ± 4,5	34 ± 6	62,6 ± 10,2	38 ± 4,2
12	36 ± 5	63,2 ± 6,2	39,5 ± 4,8	35 ± 5	63,5 ± 7,5	39,9 ± 4,7
gesamt	35 ± 5	62,6 ± 7	38,3 ± 5	35 ± 5	65,1 ± 8,9	38,7 ± 5,1

* im Thermoresistenztest über 125 Minuten ermittelter Mittelwert

**nach 35 Minuten im Thermoresistenztest durchgeführte Messung

Tab. 6: Motilitätsanalyse („Sperm Vision“) nach 45 Minuten Thermoresistenztest mit Ejakulaten, die mit Triladyl® (T) und Bioxcell® (B) und einer Konzentration von 0, 4, 6, 8, 10 oder 12 mmol N-Acetylcystein verdünnt wurden

mmol A-Cys	Nach 45 Minuten Inkubation					
	Triladyl® mit Eidotter			Bioxcell® ohne Eidotter		
	% motil	% pmot.	VAP	% motil	% pmot.	VAP
0	34,7 ± 7,4	24 ± 6,8	56 ± 7	32,1 ± 8	27,1 ± 7,8	70 ± 11
4	31,8 ± 9,6	22,3 ± 8,4	60 ± 7	39,4 ± 11,1	33,7 ± 10,8	69 ± 9
6	36,2 ± 7,7	24,9 ± 6,6	62 ± 4	36,2 ± 9,4	30,6 ± 9	72 ± 8
8	36,8 ± 9,2	25,9 ± 8,6	62 ± 4	37,7 ± 10,5	32,1 ± 11,5	72 ± 7
10	35,6 ± 9,9	25 ± 9,1	59 ± 5	41,2 ± 15,4	35,8 ± 14,9	72 ± 8
12	39 ± 9	28,6 ± 8,8	59 ± 4	40,7 ± 8,3	35,3 ± 7,6	70 ± 5
gesamt	35,7 ± 8,8	25,1 ± 8,1	60 ± 5	36,7 ± 10,6	31,4 ± 10,4	71 ± 8

Tab. 7: Motilitätsanalyse („Sperm Vision“) nach 125 Minuten Thermoresistenztest mit Ejakulaten, die mit Triladyl® (T) und Bioxcell® (B) und einer Konzentration von 0, 4, 6, 8, 10 oder 12 mmol N-Acetylcystein verdünnt wurden

mmol A-Cys	Nach 125 Minuten Inkubation					
	Triladyl® mit Eidotter			Bioxcell® ohne Eidotter		
	% motil	% pmot.	VAP	% motil	% pmot.	VAP
0	26,2 ± 7,5	16,9 ± 7,5	42 ± 7	24,4 ± 11,2	18,4 ± 9,6	49 ± 18
4	26,5 ± 10,7	17 ± 9,2	54 ± 9	34,1 ± 12,2	28 ± 10,9	63 ± 7
6	29,4 ± 8,5	18,9 ± 7,5	55 ± 8	34,6 ± 15	28,7 ± 14	63 ± 9
8	31,3 ± 9,3	21,2 ± 8,4	55 ± 6	33 ± 9,4	27,2 ± 8,8	61 ± 6
10	30,9 ± 9,5	20,3 ± 8,6	55 ± 7	33,1 ± 14,7	27,2 ± 13,9	58 ± 9
12	35,3 ± 11,1	24,9 ± 9,4	57 ± 6	33 ± 10	27,2 ± 9,5	57 ± 5
gesamt	29,9 ± 9,7	19,9 ± 8,6	53 ± 9	30,4 ± 12,5	24,5 ± 11,7	56 ± 13

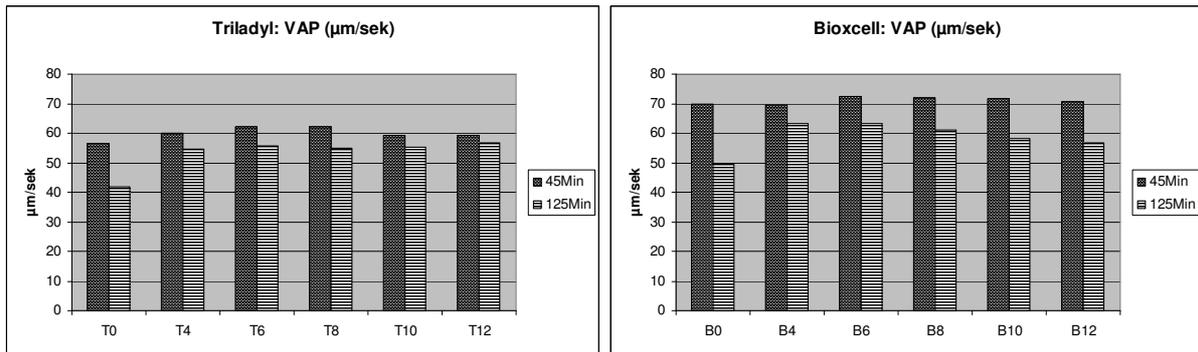


Abb. 13: Vergleich der Spermengeschwindigkeit nach 45 und 125 Minuten Inkubation bei den Verdünnern Triladyl® (T) und Bioxcell® (B), Zusatz von 0, 4, 6, 8, 10 oder 12 mmol N-Acetylcystein [mmol/l Verdünner]

Betrachtet man die Linearität (Lin) der Spermien (Anhang, Tab. 6 bis 19), so zeigt sich, dass die T0-Variante zu beiden Messzeitpunkten ($0,45 \pm 0,03$; und $0,42 \pm 0,03$) die höchsten Werte zeigt, und alle anderen Varianten etwas niedrigere Geradlinigkeiten bis zu 0,39 (T6 bis T12) bei 45 Minuten und 0,34 ($\pm 0,02$ bei T8) nach 125 Minuten aufweisen, wobei die Unterschiede hier signifikant sind ($P \leq 0,05$).

Die Ergebnisse der lateralen Kopfauslenkung (ALH in μm ; Anhang, Tab. 6 bis 19) passen zu den oben beschriebenen Linearitätsresultaten. Die 0mmol/l-Variante zeichnet sich hier zu beiden Untersuchungszeitpunkten durch die geringste Kopfauslenkung aus. Sie betrug nach 45 Minuten $3,8 \mu\text{m}$ ($\pm 0,5$) und nach 125 Minuten $3,3 \mu\text{m}$ ($\pm 0,1$). Zu beiden Zeitpunkten bewegten sich alle anderen NAC-Varianten um etwa $4,5 \mu\text{m}$ ($P \leq 0,05$).

Bezüglich der Anteile an Spermien mit normaler Akrosomstruktur (Tab. 5, Abb. 14, Anhang, Tab.6 und 7) lassen sich bei den mit Triladyl® verdünnten Chargen kaum Unterschiede ausmachen. Es sind die niedrigsten Werte mit 61,4% ($\pm 6,7$) bei T0 und die höchsten Werte mit 63,8% ($\pm 7,5$) bei T8 zu verzeichnen. Tendenziell kann man hier ein leicht positives Resultat bei allen Chargen mit NAC erkennen.

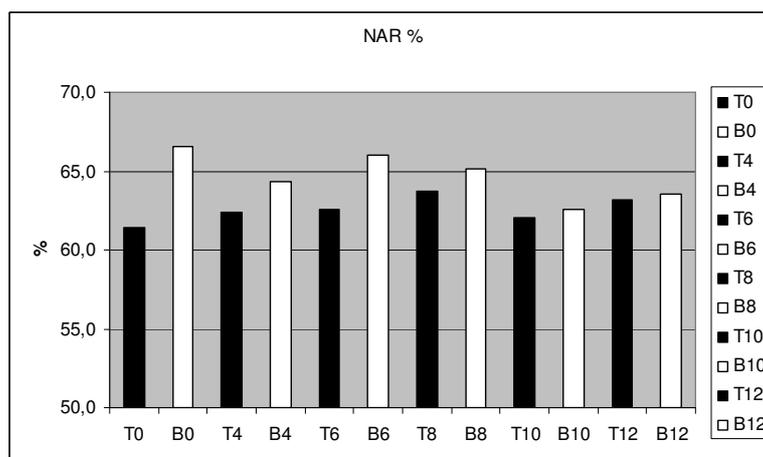


Abb. 14: Anteile an Spermien mit normaler akrosomaler Randverdickung zum Zeitpunkt 35 Minuten im Thermoresistenztest bei den Verdünnern Triladyl® (T) und Bioxcell® (B), Zusatz von 0, 4, 6, 8, 10 oder 12 mmol N-Acetylcystein [mmol/l Verdünner]

Betrachtet man die Rate lebender Spermien, die nach 35-minütiger Inkubation ermittelt wurde, so lassen sich Ergebnisse von 35,8% ($\pm 2,4$) bei T4 bis zu 40,9% ($\pm 6,4$) bei T8 feststellen, so dass auch hier eine leicht positive Tendenz für die 8 mmol-Variante erkennbar ist (Abb. 15).

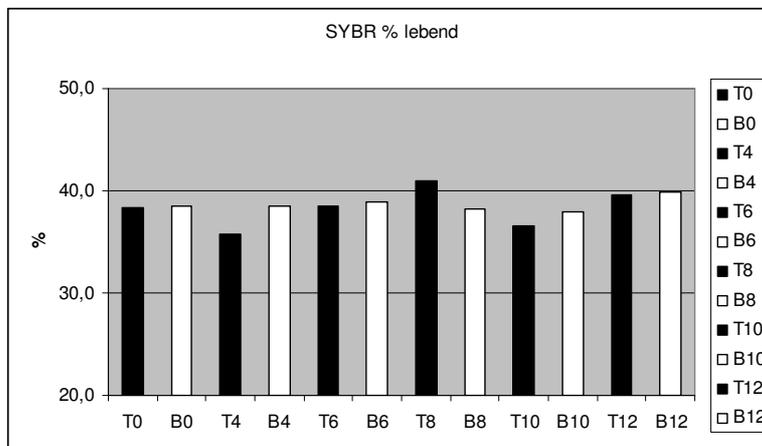


Abb. 15: Anteile lebender Spermien nach 35 Minuten im Thermoresistenztest bei den Verdünnern Triladyl® (T) und Bioxcell® (B), Zusatz von 0, 4, 6, 8, 10 oder 12 mmol N-Acetylcystein [mmol/l Verdünner]

In Bezug auf einzelne Bullen, die in diesen Versuch mit einbezogen wurden, ist festzustellen (Anhang, Tab. 7 bis 19), dass ein Bulle (B) nahezu in jedem getesteten Parameter sehr positiv auffällt, wohingegen ein anderer (E) immer durch vergleichsweise relativ negative Ergebnisse aus dem Rahmen fällt. Von letztgenanntem Tier konnten allerdings nur zwei Ejakulate gewonnen werden. Der Einfluss des Bullen ist in Bezug auf jeden Parameter signifikant ($P \leq 0,05$, Anova-Modell). Was die Veränderung der Resultate in Bezug auf die Konzentration des Antioxidanz angeht, wird die allgemeine Tendenz ebenfalls durch jedes Tier widerspiegelt. Allerdings kommt es bei dem Bullen E erst ab einer Konzentration von 8 mmol/l zu einer merklichen Verbesserung der Spermivitalität v.a. bezüglich der subjektiv und objektiv gemessenen Motilitätsparameter ($V\%$, $\%mot$, $\%p mot$), die auch bis T12 in etwa das gleiche verbesserte Niveau hält. Im Gegensatz dazu zeigen die Spermien des Bullen B schon durch einen Zusatz von 4 mmol/l eine leichte Motilitätssteigerung, die bei den Konzentrationsstufen T8, T10 und T12 ebenfalls die höchsten Werte erreicht.

Ergebnisse in Bioxcell®

Die Ergebnisse der mit Bioxcell® und NAC verdünnten Chargen sind ebenfalls in Tabelle 5 bis 7 enthalten. Die subjektiv geschätzte Motilitätsrate, die außerdem auch in Abbildung 13 dargestellt wird, zeigt, dass es bis zu 95 Minuten nach Inkubationsbeginn keine deutlich erkennbaren Unterschiede der verschiedenen NAC-Varianten gibt. Lediglich nach 125 Minuten lassen sich etwas höhere Werte bei den Varianten mit 4 bis 12 mmol/l NAC (23 ± 7 bei B10 [$P = 0,077$] bis 25 ± 8 bei B4, B6 [$P = 0,005$], und B8 [$P = 0,001$]) im Gegensatz zur B0-Variante (21 ± 8) feststellen.

Nun zu den Motilitätsmessergebnissen aus der Sperm Vision-Messung, die sich auf die Inkubationszeitpunkte 45 und 12 Minuten beziehen: Nach 45 Minuten (Tab. 6) waren bei der B0-Variante mit 32,1% (± 8) am wenigsten Spermien motil. Im Gegensatz dazu waren die Zellen der 10- und 12 mmol/l Varianten mit 41,2% ($\pm 15,4$; $P = 0,008$) bzw. 40,7% ($\pm 8,3$; $P < 0,05$) am aktivsten. Auch nach 125 Minuten (Tab. 7) sind im Vergleich zur B0-Variante ($24,4 \pm 11,2$) alle anderen NAC-Varianten um etwa 10% motiler. Betrachtet man im Vergleich dazu den Prozentsatz der progressiv motilen Spermien, so lässt sich zu beiden Untersuchungszeitpunkten die gleiche Tendenz feststellen, wobei hier nach 45 Minuten nur 27,1% ($\pm 7,8$) der Spermien der B0-Variante Vorwärtsbewegung zeigten, und alle Chargen, die NAC enthielten mindestens 30,6% (± 9 , B6) und maximal 35,8% ($\pm 14,9$, B10 [$P = 0,012$])

vorwärtsbewegliche Spermien aufwiesen. Nach 125 Minuten zeichnet sich das gleiche Bild ab wie nach 45 Minuten, denn alle NAC-haltigen Spermachargen hatten eine um rund 10% höhere progressive Motilität als die Variante ohne Antioxidanz ($18,4 \pm 9,6$).

Die Spermengeschwindigkeit (Tab. 6 und 7, Abb. 13) wurde ebenfalls zu den gleichen zwei Zeitpunkten ermittelt. Zum früheren Zeitpunkt kann man kaum Unterschiede zwischen den Varianten erkennen, deren Durchschnitt $71 \mu\text{m}/\text{sek}$ (± 8) beträgt. Danach zeichnet sich ein weniger stark ausgeprägter Abfall der Geschwindigkeit bei den Chargen ab, die NAC enthielten. Die B0- Variante erreichte hier einen Wert von 49 (± 18) und alle anderen Ergebnisse zwischen 57 (± 5 bei B12 [$P < 0,05$]) und 63 (± 7 bei B4 [$P < 0,05$], ± 9 bei B6 [$P < 0,05$]).

Bezüglich der Geradlinigkeit (Anhang, Tab. 6- 19) ist eine größere Tendenz zur Linearität bei der B0-Variante nach 45 Minuten zu erkennen, welche mit $0,5$ ($\pm 0,03$; $P = 0,002$) über allen anderen Varianten mit NAC liegt. Nach 125 Minuten ist dies nicht mehr so deutlich auszumachen, da hier die B0- und die B4-Variante mit $0,42$ ($\pm 0,13$ bzw. $\pm 0,2$) höhere Werte aufzeigen und alle anderen in einem Bereich von $0,37$ ($\pm 0,03$ bei B8 und B12, $\pm 0,04$ bei B10) bis $0,4$ ($\pm 0,04$ bei B6) liegen.

Betrachtet man die Kopfauslenkung der Spermien (Anhang, Tab. 6- 19), so kommt man – auch wenn sich die Werte von T und B stark unterscheiden - zu dem – zumindest tendenziell - gleichen Ergebnis wie bei den Chargen, die mit Triladyl® verdünnt wurden. Die Variante ohne NAC ist zu jedem Zeitpunkt diejenige mit der geringsten lateralen Kopfbewegung, welche nach 45 Minuten Inkubation von $2,8$ ($\pm 0,4$) bis $3,3$ ($\pm 0,4$; B8) und nach 125 Minuten von $2,3$ ($\pm 0,7$) bis $3,1$ ($\pm 0,3$; B6 und B8) reicht ($P \leq 0,05$).

Der Anteil der Spermien mit normaler akrosomaler Randregion ist in Abbildung 14 dargestellt. Eine nur ansatzweise auszumachende Tendenz zu mehr ungeschädigten Kopfkappen ist hier bei den Varianten B0 ($66,5 \pm 7,5$) und B6 ($66 \pm 11,1$) zu erkennen. Bei der Lebend-Tot-Färbung (Abb. 15) zeigen alle Varianten bis auf eine 38 bis 39 % lebender Zellen. Die Variante B12 ($39,9 \pm 4,7$) weist im Vergleich dazu eine geringgradig höhere Zahl lebender Spermien auf.

Auch hier wird die allgemeine Tendenz des NAC-Effektes, die bei den Mittelwerten aller Ejakulate beobachtet werden konnten, auch von den einzelnen Bullen in etwa widerspiegelt. Wie bei den mit Triladyl® verdünnten Varianten ist der Einfluss jedes Bullen in Bezug auf jeden gemessenen Parameter signifikant ($P \leq 0,05$, Anova- Modell). In den Tabellen 8 bis 19 im Anhang ist zu erkennen, dass es schon durch eine Konzentration von 4 mmol/l im Falle des „schlechtesten“ Tieres (E) zu einer relativ starken Verbesserung der Motilitätsparameter nach einer Inkubation von 125 Minuten kommt. Dies trifft für die Parameter, die mit dem CMA-System gemessen wurden gleichermaßen wie auch auf die Resultate aus der subjektiven Beurteilung zu. Betrachtet man die Ergebnisse des „besten“ Bullen (B), so kommt es auch hier schon bei einem Zusatz von 4 mmol/l zu einer Steigerung der ohnehin sehr guten Spermiovitalität, die sich - allerdings mit Schwankungen - bis zu B12 fortsetzt.

Vergleich der Verdünnervarianten (Tab. 5 bis 7)

Vergleicht man die Verdünnervarianten unabhängig von der NAC-Konzentration untereinander, so kann man hinsichtlich der subjektiven Motilitätsanalyse kaum einen Unterschied erkennen. Über den Untersuchungszeitraum von 125 Minuten sind die mit eigelhaltigem Verdünner versetzten Chargen im Durchschnitt immer um 1% besser als die mit eigellosem Verdünner konservierten Proben. Es ist jedoch kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen.

Betrachtet man nun die Resultate der computergesteuerten Motilitätsanalyse, so kommt man, was den Prozentsatz der motilen Spermien angeht, zu einer ähnlichen Erkenntnis. Nach 45 Minuten sind durchschnittlich $35,7\%$ ($\pm 8,3$) der mit Triladyl® verdünnten Spermien und $36,7\%$ ($\pm 10,7$) der mit Bioxcell® verdünnten Zellen motil, wohingegen nach 125 Minuten nur noch $29,9\%$ ($\pm 9,7$) der ersten Variante und $30,4\%$ ($\pm 12,5$) der zweiten Variante im Durchschnitt beweglich waren. Somit handelt es sich auch hier um einen geringgradigen Unterschied von ca. 1 %, allerdings zugunsten der Variante „eigelblos“.

Dagegen kann man in Bezug auf die progressive Bewegung deutlichere Unterschiede zwischen den beiden Verdünnervarianten feststellen. Im eigelhaltigen Verdüner zeigten nach 45-minütiger Inkubation durchschnittlich 25,1% ($\pm 8,1$) der Spermien progressive Vorwärtsbewegung im Vergleich zu 31,4% ($\pm 10,7$) in der eigelblösen Variante. Nach 125 Minuten fiel der Wert der erstgenannten Variante auf 19,9% ($\pm 8,6$) und der der zweiten Variante auf 24,5% ($\pm 11,7$).

Auch in Bezug auf die Fortbewegungsgeschwindigkeit (VAP in $\mu\text{m}/\text{sec}$) sind deutliche Unterschiede vorhanden. Die mit Bioxcell® (71 ± 8) verdünnten Varianten weisen nach 45 Minuten eine um rund $10\mu\text{m}/\text{sec}$, signifikant ($P \leq 0,05$) höhere Geschwindigkeit auf als die der eigelhaltigen Varianten (60 ± 5), wobei sich dieser große Unterschied nach 125 Minuten Inkubation etwas relativiert. Die Triladyl®-Variante ohne NAC (45 Min) ist dabei die Charge mit den im Durchschnitt langsamsten Spermien (56 ± 7 nach 45 Min. und 42 ± 7 nach 125 Min), wobei die 0 mmol/l-Variante auch bei Bioxcell® nach 125 Minuten vergleichsweise niedrig (49 ± 18) ist.

Auch bezüglich der Geradlinigkeit (Lin) der Bewegung ergeben sich für die mit Bioxcell® verdünnten Varianten sowohl nach 45 als auch nach 125 Minuten um 0,03 signifikant höhere Werte. Nach 45 Minuten bewegten sich in Bioxcell® durchschnittlich mehr Spermien linear fort ($0,46\pm 0,04$) als in der Triladyl®-Variante ($0,40\pm 0,03$), wobei die B-Variante ohne NAC die geradlinigste darstellt ($0,5\pm 0,03$). Auch nach 125 Minuten ist dies der Fall, jedoch fällt die Linearitätsquote für Bioxcell® stärker von durchschnittlich $0,46$ ($\pm 0,04$) auf $0,39$ ($\pm 0,08$) ab als bei Triladyl® von $0,4$ ($\pm 0,03$) auf $0,36$ ($\pm 0,03$). Dabei hat Bioxcell® durchschnittlich immer noch einen höheren Wert zu verzeichnen. Auch bei Triladyl® ist die Variante ohne NAC die mit der höchsten Linearität, sowohl nach 45 min als auch nach 125 min. Die Ergebnisse für die laterale Kopfauslenkung liegen für den eigelhaltigen Verdüner mit durchschnittlich $4,3$ ($\pm 0,08$) zu beiden Analysezeitpunkten im Vergleich zu $3,1$ ($\pm 0,4$; 45 Min) und $2,8$ ($\pm 0,6$; 125 Min) bei Bioxcell® signifikant höher ($P \leq 0,05$).

Die Lebend- Tot-Färbung hingegen zeigt keinen deutlich unterschiedlichen Konservierungseffekt der beiden Medien, da bei dem eigelhaltigen Verdüner durchschnittlich 38,3% (± 5) und bei dem anderen Verdüner 38,7% ($\pm 5,1$) der Spermien überlebt hatten.

Betrachtet man nun die NAR-Ergebnisse, so scheinen in Bioxcell®-Chargen ($65,1 \pm 8,9$) mehr Spermien eine normale akrosomale Randstruktur erhalten zu haben als im Triladyl® ($62,6\pm 7,0$), wobei dieses Ergebnis signifikant ist ($P = 0,011$).

Vergleicht man die beiden Verdünnervarianten bezüglich ihrer Auswirkung auf die einzelnen Bullen, fällt auf, dass es im Falle der eigelblösen Variante zu größeren Schwankungen in der Spermiovitalität kommt. Betrachtet man den Bullen mit der „besten“ Spermienqualität, so scheint es hier durch die Verdünnung mit Bioxcell® im Vergleich zu Triladyl® zu einer noch gesteigerten Aktivität der Spermien zu kommen. Ansonsten werden auch hier die gleichen Tendenzen sichtbar, wie sie von den Mittelwerten abzuleiten sind.

2.2. Feldversuch

Dass N-Acetylcystein einen Einfluss auf die Motilität von Chargen hat, egal ob sie mit eigelhaltigem oder eigelbfreiem Medium verdünnt wurden, kann aus dem Laborversuch abgeleitet werden. Ob die durch den Einsatz des Antioxidanz zu verzeichnenden spermatologischen Veränderungen auch im Feldeinsatz der beiden Verdüner Auswirkungen auf das Befruchtungsvermögen zeigen, galt es herauszufinden. Obwohl in den oben beschriebenen Laborversuch keine eindeutige Optimalvariante ausgemacht werden konnte, konnte von der 8mmol/l-NAC-Variante eine im Vergleich zu den anderen NAC-Konzentrationen etwas positivere Tendenz bezüglich der Spermiovitalität abgeleitet werden. Im Besamungsversuch wurden deshalb die beiden Verdünnervarianten Triladyl® und Bioxcell® mit 0 bzw. 8 mmol/l NAC geprüft. Um einen möglichst raschen Besamungseinsatz zu gewährleisten, wurden 3

Bullen in diesen Versuch miteinbezogen, für die eine hohe Samennachfrage bestand. Von einem Tier wurden 8 Ejakulate gewonnen von den anderen jeweils 7. Auch hier sind Ergebnisse nur signifikant, wenn dazu statistische Angaben gemacht werden.

In der Tabelle 8 sind die Befruchtungsergebnisse des gesamten Versuches zusammengefasst dargestellt. Einzelergebnisse für die Ejakulate sind auch im Anhang in Tabelle 20 und den Abbildungen 10 bis 12 grafisch dargestellt.

Ergebnisse in Triladyl®

Betrachtet man zunächst die Zusammenfassung über alle Bullen und Ejakulate, die mit 0mmol/l NAC (T0) verdünnt wurden im Vergleich zur T8-Variante, so kommt man zu folgender Erkenntnis: Von 1115 Erstbesamungen mit ersterer Variante wurden 781 Kühe beziehungsweise Kalbinnen nicht mehr zu einer weiteren Inseminierung vorgestellt. Daraus ergibt sich eine Non Return-Rate von 70,0%. Dagegen beträgt die Non Return-Rate der T8-Variante 71,2%. Dieses um 1,2% verbesserte Ergebnis ergibt sich für eine Anzahl von 1104 Erstbesamungen.

Ergebnisse in Bioxcell®

Vergleicht man nun die B0- und B8-Varianten miteinander, so ergibt sich für die 0mmol/l-NAC-Variante wie auch für die B8-Variante das gleiche Befruchtungsergebnis. Die B0-Variante wurde für 1012 weibliche Tiere zur Insemination benutzt, wobei für 703 Tiere keine weitere Besamung mehr notwendig war. Im Falle von Bioxcell® der mit 8mmol/l NAC versetzt worden war, wurden 1186 Kühe und Kalbinnen besamt. Davon wurden 824 Tiere zu keiner weiteren Inseminierung vorgestellt. In beiden Fällen ergab sich somit ein Non Return-Ergebnis von 69,5%.

Vergleich der Verdünnervarianten

Die beiden Verdünnervarianten zeigen ohne Berücksichtigung des NAC-Gehaltes unterschiedliche Non Return-Ergebnisse. 70,6% der mit Triladyl® besamten Tiere gingen als „trächtig“ in die Auswertung mit ein, während dies bei den mit Bioxcell® verdünnten Spermachargen im Besamungseinsatz nur für 69,5% der Kühe zu diesem Ergebnis kam. Bezüglich des Befruchtungserfolges differieren die beiden Verdüner demnach um 1,1% zugunsten der eigelhaltigen Variante. Allerdings ist keines dieser Ergebnisse statistisch gesichert.

Vergleich der Befruchtungsergebnisse verschiedener Bullen

Betrachtet man nun die verschiedenen Bullen bezüglich ihres Befruchtungserfolges (Abb. 16) so ergibt sich für den Bullen S in der T0-Variante (71,7% NR) mit circa 3% mehr trächtigen Kühen als bei den anderen beiden Samenspendern (Bulle E: 68,7% NR; Bulle L:68,8%) die höchste Befruchtungsrate. Was die T8-Variante angeht, ist jedoch das Gegenteil der Fall. Bulle S schneidet hier mit 68,7% positiv besamten Tieren schlechter ab, als beide anderen Tiere, wobei hier der Bulle L mit 74,1% das höchste Ergebnis erzielt. Hier kam es sowohl bei E als auch bei L zu einer Verbesserung des Befruchtungsergebnisses im Vergleich zu der Triladylvariante ohne NAC, wohingegen S im Vergleich zur T0-Variante 2,8% schlechter abschnitt. Die Befruchtungsergebnisse der Einzelejakulate der verschiedenen Bullen sind in den Abbildungen 10 bis 12 im Anhang auch grafisch dargestellt.

Tab. 8

mmol NAC	Triladyl®		Bioxcell®	
	Anzahl EB	%NR	Anzahl EB	%NR
0	1115	70	1012	69,5
8	1104	71,2	1186	69,5
gesamt	2219	70,6	2198	69,5

Letztendlich war bezogen auf die eigelhaltige Verdünnervariante ohne Berücksichtigung der NAC-Konzentration der Bulle L der beste Befruchter. Allerdings bewegen sich die Ergebnisse aller drei Bullen in einem relativ engen Rahmen von 70,2 (E) bis 71,4% (L). Führt man nun die gleiche Betrachtung der einzelnen Bullen im Hinblick auf die eigelblose Verdünnervariante durch, so schneidet wiederum Bulle S mit dem besten Ergebnis insgesamt ab (69,9%). Hier ist außerdem zu erkennen, dass sowohl Bulle S als auch E mit der NAC-haltigen Variante etwas negativere Befruchtungsergebnisse zu verzeichnen haben, als in der ohne Antioxidanz. Dagegen verbessert sich das Befruchtungsvermögen des Bullen L von 68,9% (B0) auf 70,6% in der 8mmol/l Variante.

Die beiden Verdüner in Kombination mit dem Antioxidanz zeigen somit unterschiedliche Auswirkungen auf die Spermiovitalität verschiedener Samenspenden. Der Bulle S zeigt sowohl in Verbindung mit Triladyl® als auch mit Bioxcell® eine tendenziell schlechtere Befruchtungsfähigkeit, wenn der jeweilige Verdüner mit NAC versetzt wurde. Bulle E dagegen zeigt mit Triladyl® und NAC eine Verbesserung gegenüber der Variante ohne NAC, jedoch in der Kombination des Antioxidanz mit Bioxcell® eine um 0,8% verminderte Befruchtungsrate.

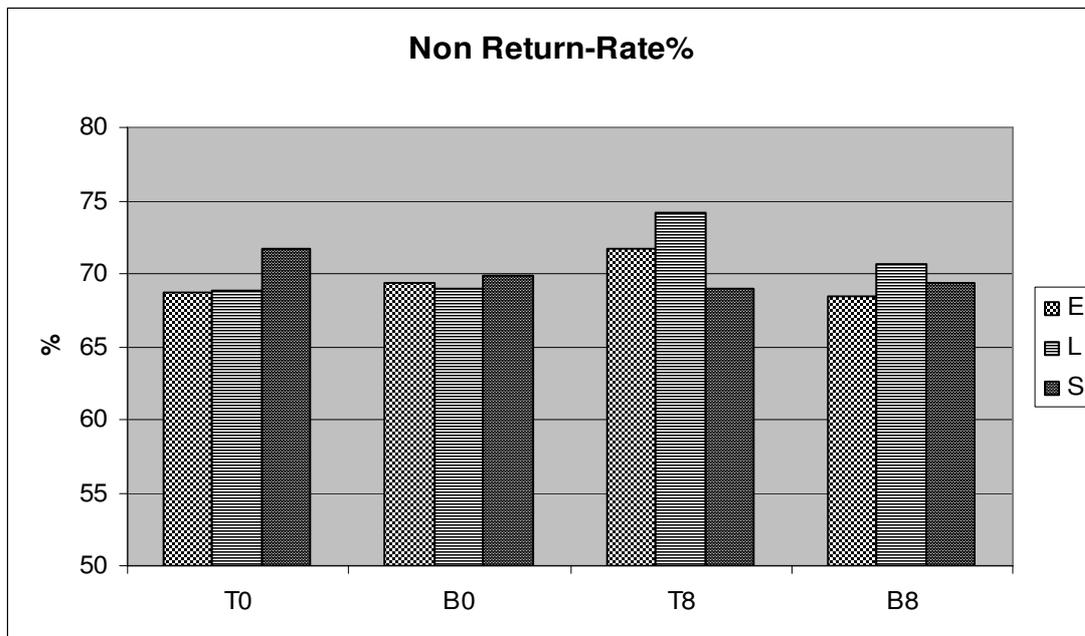


Abb. 16: Befruchtungsergebnisse der einzelnen Bullen (E, L, S) bei Bezug auf die vier verschiedenen Versuchsvarianten: Verdünnung mit Triladyl® (T) oder Bioxcell® (B) und Zusatz von 0 oder 8 mmol N-Acetylcystein

Bulle L zeigt bei beiden Verdünnern in Kombination mit NAC eine verbesserte Non-Return-Rate, wobei dies vor allem in Kombination mit Triladyl® mit einer Verbesserung um 5,3% relativ stark auffällt.

Ohne Berücksichtigung des NAC-Gehaltes, schneiden alle 3 Bullen im Durchschnitt bei einer Verdünnung mit Triladyl® geringgradig besser ab als bei Verarbeitung mit dem eigelblosen Medium.

Bei Betrachtung der einzelnen Ejakulate der Tiere zeigt sich allerdings eine relativ große Streuung der Ergebnisse. Somit kann man nicht allgemein eine Verbesserung oder Verschlechterung durch eine Verdünnervariante in Kombination mit NAC feststellen, da die Spermien jedes Ejakulates unterschiedlich auf die Komponenten des Verdünermediums zu reagieren scheinen. Hinzu kommt außerdem, dass durch die relativ geringen

Erstbesamungszahlen pro verarbeitetes Ejakulat eine eindeutige Wertung der Ergebnisse erschwert wird.

3. Untersuchungen zum „Coating- Effekt“

3.1. Coating-Effekt Versuch I

In Tabellen 9 bis 11 werden die Untersuchungsergebnisse (Mittelwerte aller Ejakulate) zusammenfassend dargestellt. Die Tabellen mit Einzelergebnissen befinden sich im Anhang (Tabellen 21 bis 25) dieser Arbeit. Auch hier sind Resultate nur statistisch gesichert, wenn dementsprechendes erwähnt wird. In diesem Versuch wurde ein Anteil des Ejakulates sofort nach der Gewinnung (0 VZP) – d.h. vor der Spermabeurteilung – verdünnt und ein anderer Teil 10 Minuten (10 VZP) nach der Ejakulation mit Verdünner versetzt. Das Verdünnungsverhältnis betrug jeweils 1:5. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte in zwei Varianten eine Endverdünnung, so dass Gesamtverdünnungsgrade von 1:25 und 1:50 resultierten. Von 3 Bullen wurden dazu jeweils 4 Ejakulate für die Experimente herangezogen, so dass letztendlich 12 Ejakulate für diese Versuche genutzt wurden.

Tab. 9

Verdünnungszeitpunkt nach Gewinnung	Gesamtverdünnungsgrad					
	01:25			01:50		
	V% Resistenztest*	% NAR**	% lebend**	V% Resistenztest*	% NAR**	% lebend**
0 Minuten	39 ± 11	59,2 ± 7,9	44,3 ± 10,2	37 ± 8	58,4 ± 5,3	41,8 ± 12,9
10 Minuten	43 ± 9	56,3 ± 7,6	50,9 ± 5,8	35 ± 11	57,2 ± 6,3	40,8 ± 13,4

* im Thermoresistenztest über 125 Minuten ermittelter Mittelwert

**nach 35 Minuten im Thermoresistenztest durchgeführte Messung

Tab. 10: Objektive Motilitätsdaten nach 45 Minuten Thermoresistenztest: Ermittlung des Prozentsatzes an motilen (% motil) und progressiv motilen (% prog. mot.) Spermien und ihrer Geschwindigkeit (VAP [$\mu\text{m/s}$]) mit Hilfe von computergestützter Motilitätsanalyse

Verdünnungszeitpunkt nach Gewinnung	Gesamtverdünnungsgrad					
	01:25			01:50		
	% motil	% prog. mot.	VAP	% motil	% prog. mot.	VAP
0 Minuten	47,5 ± 19,4	35,4 ± 18,6	57 ± 4	40,0 ± 11,5	27,7 ± 10,5	58 ± 3
10 Minuten	48,1 ± 17,2	37,0 ± 16,3	55 ± 5	34,4 ± 14,0	22,4 ± 13,1	55 ± 3

Tab. 11: Objektive Motilitätsdaten nach 125 Minuten Thermoresistenztest: Ermittlung des Prozentsatzes an motilen (% motil) und progressiv motilen (% prog. mot.) Spermien und ihrer Geschwindigkeit (VAP [$\mu\text{m/s}$]) mit Hilfe von computergestützter Motilitätsanalyse

Verdünnungszeitpunkt nach Gewinnung	Gesamtverdünnungsgrad					
	01:25			01:50		
	% motil	% prog. mot.	VAP	% motil	% prog. mot.	VAP
0 Minuten	34,2 ± 14,9	23,6 ± 13,3	43 ± 4	29,6 ± 9,8	19,0 ± 10,3	42 ± 5
10 Minuten	34,5 ± 14,2	23,9 ± 12,2	40 ± 6	24,7 ± 9,1	14,0 ± 8,5	39 ± 5

Subjektive Motilitätsschätzung (V%) im Resistenztest (Tab. 9, Abb. 17 und Anhang, Tab. 21)

Nach 5minütiger Inkubation bei 37°C wurde die erste subjektive Motilitätsschätzung durchgeführt. Hier ergaben die Ergebnisse sowohl in Bezug auf die unterschiedlichen Verdünnungsverhältnisse als auch auf die beiden Verdünnungszeitpunkte keine signifikanten Differenzen. Die einzelnen Bullen dagegen produzierten Chargen mit signifikant ($P \leq 0,05$) unterschiedlichen Motilitätsraten. Der Bulle IP (1:25) schnitt hier, gefolgt von HP am besten ab. Die Ejakulate mit den geringsten Motilitätsraten stammten von dem Tier MA.

Nach 35 Minuten ergaben sich für die geringer verdünnten (1:25) Chargen bei Verdünnungszeitpunkt 0 Minuten 47 (± 10) und bei 10 Minuten 52% (± 9) bewegliche Spermien. Somit stieg hier den Anteil motiler Samenzellen mit späterer Verdünnung etwas an. Im Falle der höher verdünnten Varianten fiel dieser Wert für Chargen späteren Verdünnungszeitpunktes um 1% sehr geringgradig. Allgemein schneiden die beiden Varianten, die 1:25 verdünnt worden waren, signifikant ($P = 0,003$) besser ab als die zwei Vergleichsvarianten. Auch die beiden Bullen IP und HP haben statistisch gesichert eine höhere Spermienbewegung aufzuweisen als der Bulle MA. Bezüglich der Bullen gilt das gleiche auch für V% nach 95 und nach 125 Minuten. Dieselben tendenziellen Unterschiede wie zum vorherigen Testzeitpunkt treten hier ebenfalls auf, sind allerdings nicht statistisch abzusichern.

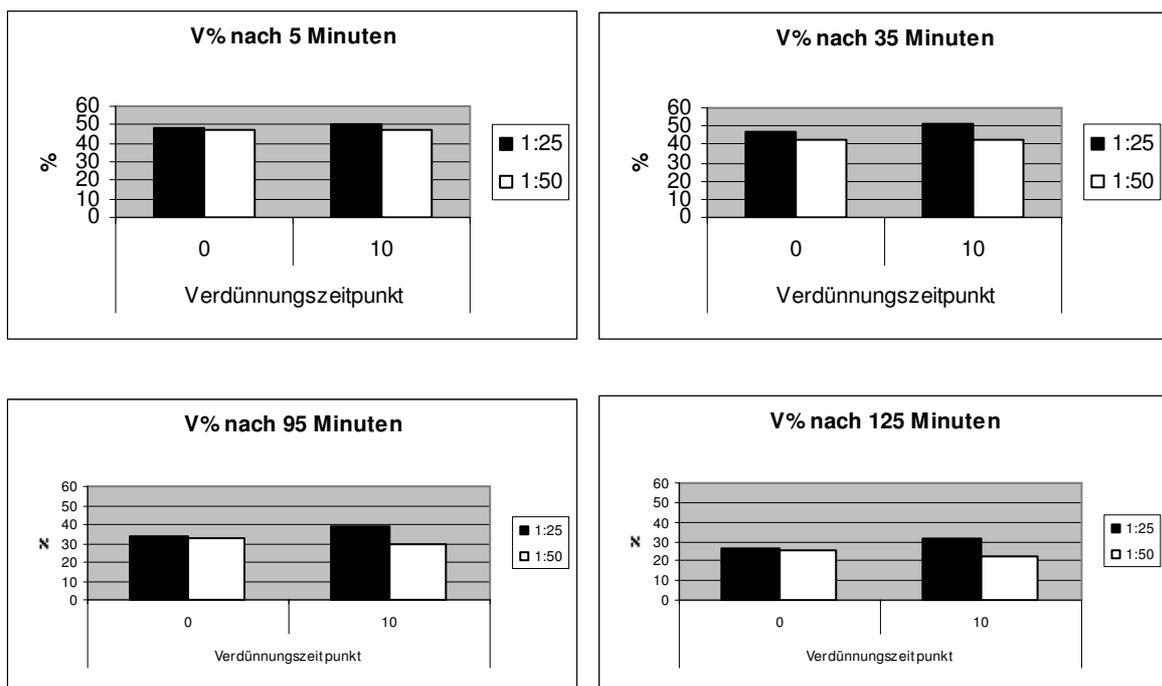


Abb.17: Subjektive Motilitätsanalyse nach 5, 35, 95 und 125 Minuten im Thermoresistenztest mit den Verdünnungszeitpunkten 0 oder 10 Minuten nach Samengewinnung

Beim Verdünnungsgrad 1:25 zeigten Spermien, die sofort nach dem Sprung 1:25 ($59,2 \pm 7,9$) mit Verdüner versetzt wurden, um 2,9% mehr Köpfe, deren Akrosom unversehrt war, also solche, die 10 Minuten ($56,3 \pm 7,6$) später verdünnt worden waren. Die Chargen, die 1:50 verdünnt wurden, zeigten sehr ähnliche Werte.

Prozentsatz lebender Spermien und solcher mit unversehrtem Akrosom (NAR%; Tab. 9 und Anhang, Tab. 21)

Bei der flowzytometrischen Messung des Prozentsatzes lebender Zellen fällt auf, dass hier in der 10 VZP Variante, die weniger stark verdünnt wurde mit 50,9 ($\pm 5,8$) 5,6 % mehr Spermien am Leben waren als bei der Variante, die sofort nach der Ejakulation mit Verdünner in Kontakt kam. Allerdings ist dieses Ergebnis nicht statistisch gesichert. Mit einer Signifikanz von 0,005 ist jedoch ein Unterschied zugunsten der 1:25-Verdünnung im Vergleich zur 1:50-Verdünnung festzustellen. Auch die positiveren Ergebnisse des Bullen IP im Gegensatz zu MA sind statistisch gesichert ($P \leq 0,05$).

CMA-Ergebnisse (Sperm Vision; Tab. 10, 11)

Prozentsatz motiler (%motil) und progressiv motiler (% prog. motil) Spermien nach 45- und 125-minütiger Inkubation

Die computergesteuerte Motilitätsanalyse zum Zeitpunkt 45 Minuten ergab für die Anteile motiler und progressiv motiler Zellen der 1:25 verdünnten Proben ein geringfügig besseres Ergebnis für die nach 10 Minuten verdünnten Chargen im Vergleich zu den sofort verdünnten Varianten (Tab. 10) Das gleiche war auch bei der zweiten Messung nach 125 Minuten festzustellen. Die höher verdünnten Proben (1:50) wiesen dagegen ein tendenziell gegenteiliges Ergebnis auf, da hier die 0 VZP-Proben entweder gleich gut oder besser abschnitten als die 10 VZP-Varianten. Aus der Messung geht auch hervor, dass die Motilitätswerte wie auch bei der subjektiven Schätzung – für die im Verhältnis 1:25 verarbeiteten Proben - höher ausfielen. Dieser Unterschied ist in Bezug auf den Prozentsatz motiler wie auch progressiv motiler Zellen zu beiden Messzeitpunkten statistisch gesichert ($P \leq 0,05$).

Spermiengeschwindigkeit (VAP [$\mu\text{m/s}$])

Die sofort nach dem Sprung verdünnten Spermien der 1:25-Variante (Tab. 10) bewegten sich nach 45 Minuten im Thermoresistenztest mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $57\mu\text{m/sek}$ (± 4) fort. Die Samenzellen, die erst 10 Minuten später mit Verdünner in Kontakt kamen, hatten eine um $2\mu\text{m/sek}$ herabgesetzte Geschwindigkeit. Bei der Messung nach 125 Minuten (Tab. 11) waren die 0 VZP-Spermien um $14\mu\text{m/sek}$ und die 10 VZP-Zellen um $15\mu\text{m/sek}$ langsamer. In Bezug auf diesen Parameter spielt der Verdünnungszeitpunkt eine signifikante (45 Minuten: $P = 0,003$; 125 Minuten: $P = 0,006$) Rolle. Das gleiche gilt auch für die gleichen VZP-Varianten der im Verhältnis 1:50 verdünnten Proben. Diese haben schon nach 45 Minuten geringere Geschwindigkeiten als die niedriger verdünnten Proben. Hinzu kommt noch ein stärkerer Abfall der Werte bei der Messung nach 125 Minuten.

Linearität und seitliche Kopfauslenkung (ALH [μm], Anhang, Tab. 21)

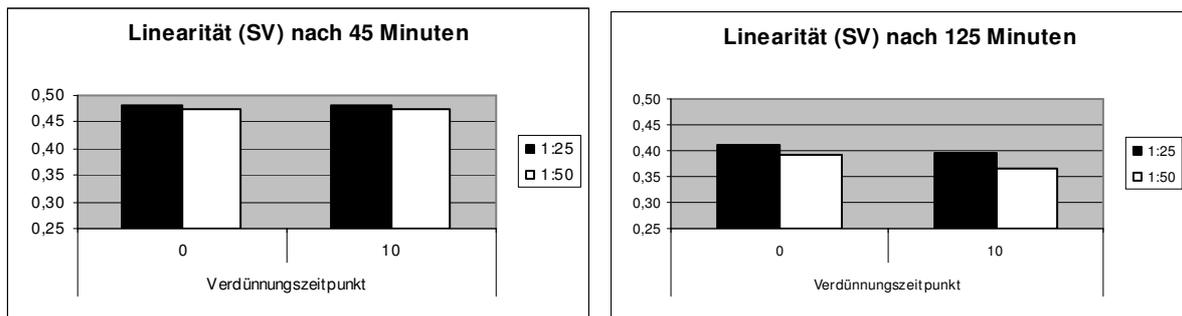


Abb. 18: Geradlinigkeit der Spermien nach 45 und 125 Minuten Thermoresistenztest, Verdünnung der Ejakulate 0 oder 10 Minuten nach Samengewinnung im Verhältnis 1: 25 oder 1: 50

Die Bewegung der 0- und der 10 VZP-Spermien (1:25) ist nach 45 Minuten Inkubation gleich linear, wohingegen diese nach 125 Minuten um 0,07 (0 VZP) beziehungsweise 0,08 (10 VZP) abnimmt. Diese Tendenzen – allerdings mit insgesamt niedrigeren Linearitätsraten- treffen auch auf die 1:50 verdünnten Proben zu (Abb.18). Die Ergebnisse der 125-Messung sind in Bezug auf das Verdünnungsverhältnis ($P = 0,019$) und die Verdünnungszeit ($P = 0,035$) signifikant unterschiedlich. Der Bulle HP ist nach 45 Minuten im Gegensatz zu MA ($P \leq 0,05$) derjenige mit den geradlinigsten Samenzellen, nach 125 ist jedoch IP derjenige, der positiv auffällt ($P \leq 0,05$).

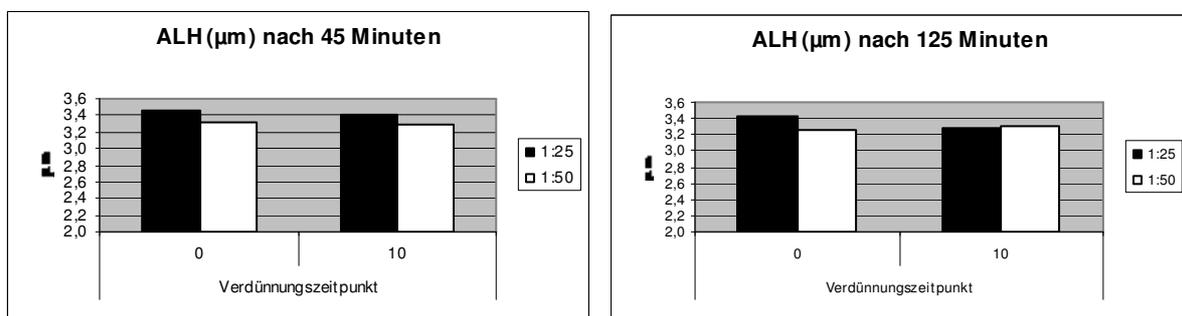


Abb.19: Laterale Kopfauslenkung (ALH [μm]) nach 45 und 125 Minuten Thermoresistenztest, Verdünnung der Ejakulate 0 oder 10 Minuten nach Samengewinnung im Verhältnis 1: 25 oder 1: 50

Die in Abbildung 19 dargestellten Werte für die seitliche Kopfauslenkung der Spermien lässt für die 1:25 verdünnten Chargen zu beiden Verdünnungszeitpunkten keine auffälligen Differenzen erkennen. Dies gilt auch für die Messung nach 125 Minuten. Tendenziell kommt es zu einer sehr geringgradigen Abnahme der seitlichen Kopfbewegung der Chargen, die erst 10 Minuten nach Ejakulation verdünnt wurden. Die gleichen Tendenzen werden auch für die höher verdünnten Proben sichtbar, welche jedoch insgesamt eine niedrigere seitliche Kopfbewegung aufweisen. Der Bulle IP produzierte die Spermien mit dem auffälligsten seitlichen Ausschlag des Kopfes ($P = 0,004$).

Zusammenfassend geht aus den Ergebnissen des Coating-Versuches I hervor, dass ein Aufbewahren des unverdünnten Spermias über einen Zeitraum von 10 Minuten bei einer Temperatur von 32°C bis zum Zeitpunkt der Verdünnung keine Vorteile gegenüber einer sofortigen Verdünnung mit sich bringt.

3.2. Coating-Effekt Versuch II

Die Frage nach dem Einfluss der Aufbewahrungszeit des unverdünnten Spermias auf die spätere Vitalität nach dem Auftauen war Thema des im Folgenden beschriebenen Versuches. Die Mittelwerte dazu werden in Tabellen 12 bis 14 dargestellt, die Einzelergebnisse im Anhang (Tabellen 26 - 32). Es wurden Ejakulatsanteile zu jeweils vier verschiedenen Zeitpunkten (5 Minuten [5 VZP], 10 Minuten [10 VZP], 20 Minuten [20 VZP] und 30 Minuten [30 VZP] nach Ejakulation) mit Verdünner versetzt, wobei dies in einem Verdünnungsverhältnis von 1: 25 und 1:50 durchgeführt wurde. Die produzierten Chargen wurden in einem Thermoresistenztest über 125 Minuten auf verschiedene Vitalitätsmerkmale untersucht. Auch hier sind Ergebnisse nur statistisch gesichert, wenn diesbezüglich Angaben gemacht werden.

Subjektive Motilitätsschätzung (V%) im Resistenztest (Tab. 12 und Anhang, Tab. 26)

Verdünnungsverhältnis 1:25

Die nach 5 und 10 Minuten verdünnten Chargen zeigen mit Werten von 51 (± 4) bzw. 52 (± 4) höhere Anteile motiler Spermien als die beiden zu späteren Zeitpunkten verdünnten Varianten (Anhang, Tab.26). Die nach 20 (46 ± 3 ; $P = 0,003$) und 30 (43 ± 8 ; $P \leq 0,05$) Minuten verarbeiteten Proben unterscheiden sich von der 5 Minuten-Variante mit P-Werten $\leq 0,05$ signifikant. Bei der nächsten Motilitätsschätzung nach 35 Minuten (Abb. 20) erhöhte sich die Differenz zwischen den beiden erst verdünnten Chargen und der zuletzt verdünnten Probe auf durchschnittlich über 10%. Auch dieser Wert ist statistisch gesichert ($P \leq 0,05$). Auch zu allen anderen Untersuchungszeitpunkten sind die geringen Unterschiede zwischen 5 und 10 Minuten als Verdünnungszeitpunkt vernachlässigbar, wohingegen ihr Unterschied zu den nach 20 und 30 Minuten verdünnten Chargen bezüglich dieses Parameters immer signifikant ($P \leq 0,05$) ist.

Tab. 12: Spermatologische Tests von Ejakulaten, die 5, 10, 20 oder 30 Minuten nach Samengewinnung im Verhältnis von 1: 25 oder 1: 50 verdünnt wurden

Aufbewahrungsdauer bis zur Verdünnung		Gesamtverdünnungsgrad	
		01:25	01:50
5 Minuten	V% Resistenztest*	45 \pm 5	42 \pm 6
	% NAR**	58,0 \pm 7,9	60,5 \pm 7,8
	% lebend**	47,7 \pm 5,3	42,1 \pm 5,7
10 Minuten	V% Resistenztest*	44 \pm 5	40 \pm 5
	% NAR**	57,7 \pm 10,5	53,8 \pm 8,1
	% lebend**	48,3 \pm 7,9	39,0 \pm 7,9
20 Minuten	V% Resistenztest*	37 \pm 6	36 \pm 6
	% NAR**	49,6 \pm 8,6	51,7 \pm 8,0
	% lebend**	37,6 \pm 11,6	38,3 \pm 7,3
30 Minuten	V% Resistenztest*	34 \pm 6	32 \pm 6
	% NAR**	49,8 \pm 7,3	49,1 \pm 10,9
	% lebend**	39,8 \pm 5,4	36,5 \pm 5,8

* im Thermoresistenztest über 125 Minuten ermittelter Mittelwert

**nach 35 Minuten im Thermoresistenztest durchgeführte Messung

Tab. 13: Computergestützte Motilitätsanalyse nach 45 Minuten
Thermoresistenztest; Ejakulate, die 5, 10, 20 oder 30 Minuten nach
Samengewinnung im Verhältnis 1: 25 oder 1: 50 verdünnt wurden

Aufbewahrungsdauer bis zur Verdünnung		Gesamtverdünnungsgrad	
		01:25	01:50
5 Minuten	% motil	49,5 ± 10,5	45,5 ± 11,2
	% p.motil	36,3 ± 11,8	31,1 ± 12,2
	VAP	58 ± 4	62 ± 3
10 Minuten	% motil	53,8 ± 12,3	46,9 ± 11,3
	% p.motil	41,5 ± 13,9	33,4 ± 12,5
	VAP	59 ± 4	61 ± 4
20 Minuten	% motil	41,7 ± 11,7	40,8 ± 6,9
	% p.motil	30,3 ± 11,2	27,2 ± 7,1
	VAP	58 ± 4	59 ± 4
30 Minuten	% motil	37,1 ± 9,3	36,4 ± 12,3
	% p.motil	25,1 ± 9,6	22,4 ± 12,0
	VAP	54 ± 4	55 ± 3

Tab. 14: Computergestützte Motilitätsanalyse nach 125 Minuten
Thermoresistenztest; Ejakulate, die 5, 10, 20 oder 30 Minuten nach
Samengewinnung im Verhältnis 1: 25 oder 1: 50 verdünnt wurden

Aufbewahrungsdauer bis zur Verdünnung		Gesamtverdünnungsgrad	
		01:25	01:50
5 Minuten	% motil	40,0 ± 9,2	37,2 ± 10,3
	% p.motil	28,1 ± 8,8	24,0 ± 10,8
	VAP	45 ± 7	45 ± 6
10 Minuten	% motil	41,5 ± 12,3	32,1 ± 6,9
	% p.motil	29,5 ± 12,1	18,8 ± 7,4
	VAP	44 ± 7	43 ± 8
20 Minuten	% motil	29,6 ± 12,0	30,7 ± 8,2
	% p.motil	18,6 ± 11,6	17,9 ± 7,8
	VAP	40 ± 8	42 ± 8
30 Minuten	% motil	28,4 ± 9,0	26,8 ± 7,8
	% p.motil	16,7 ± 8,3	14,5 ± 7,5
	VAP	37 ± 8	38 ± 7

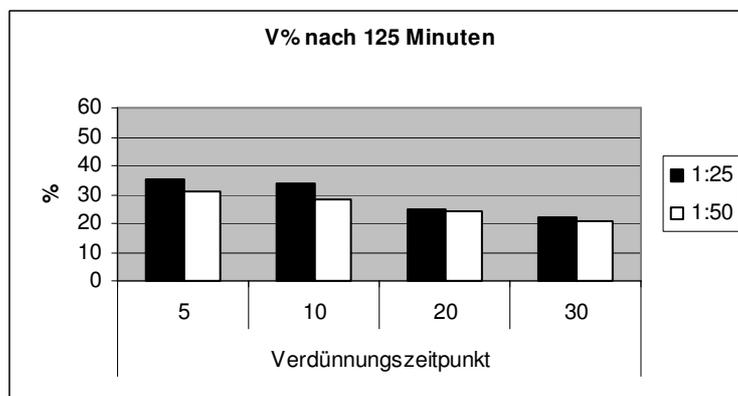
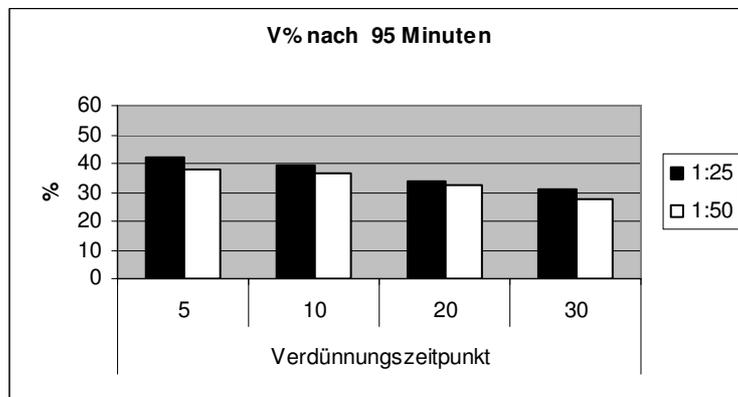
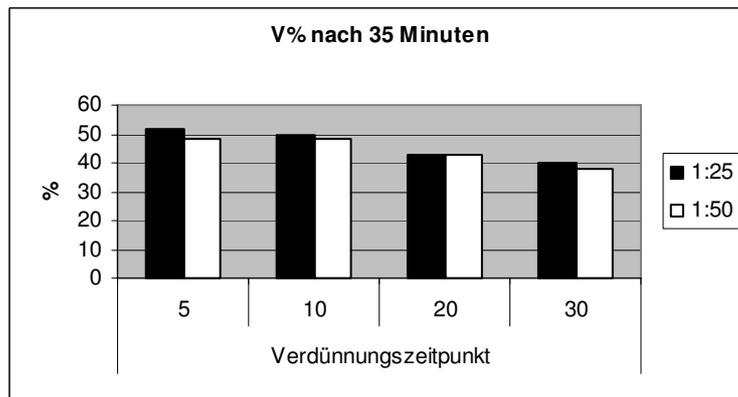
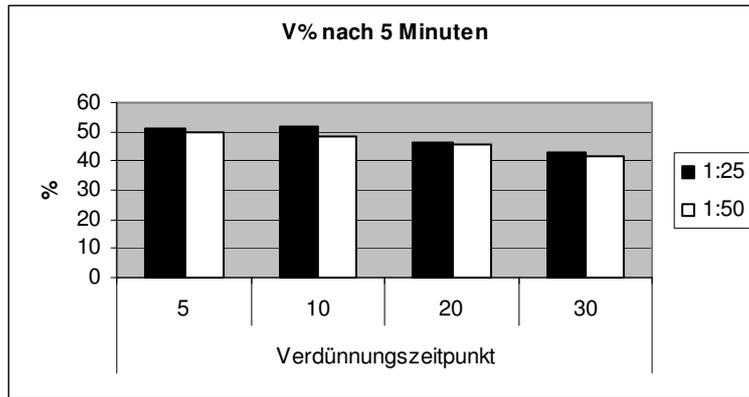


Abb.20: Subjektiv geschätzte Motilität (V%) nach 5, 35, 95 und 125 Minuten im Thermoresistenztest, Verdünnung der Ejakulate nach 5, 10, 20 oder 30 Minuten nach Samengewinnung im Verhältnis 1: 25 oder 1: 50

Verdünnungsverhältnis 1:50

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Chargen, die in einem höheren Verdünnungsverhältnis mit Verdüner versetzt worden waren (Abb. 20), so fallen allgemein ähnliche Unterschiede zwischen den zu verschiedenen Zeitpunkten verdünnten Proben auf. Die Unterschiede zwischen 20 VZP und 30 VZP und der nach 5 Minuten verdünnten Probe sind immer statistisch abgesichert. Die Differenzen sind außerdem zu den beiden späteren Zeitpunkten immer negativer. Bei der Untersuchung der Proben nach 35minütiger Inkubation kommt es bereits zu einem Abfall von 10% zwischen der 5 VZP-Variante mit 48 (± 6) und der 30 VZP-Variante mit 38 (± 8). Diese Differenz bleibt bis zum Ende des Resistenztestes etwa gleich.

Verdünnungsverhältnisse im Vergleich

Die allgemeine Tendenz ist bei beiden Verdünnungsverhältnissen sehr ähnlich. Es gibt bei beiden Varianten in Bezug auf die subjektiv geschätzte Motilität kaum Unterschiede zwischen den Proben, die nach 5 und nach 10 Minuten verdünnt wurden. In der 1:50-Variante kommt es bei einem späteren Verdünnungszeitpunkt eher zu Einbußen in der Motilität der Spermien. Diese Tatsache ist allerdings nicht statistisch gesichert. Auffällig ist auch hier, dass zu allen Untersuchungszeiten die Anzahl der beweglichen Zellen in der stärker verdünnten Variante geringfügig niedriger ist. Betrachtet man die Ejakulate der einzelnen eingesetzten Bullen (Anhang, Tab. 27 bis 32), so fällt auf, dass der Bulle IM ($P \leq 0,05$) mit seinen beiden unterschiedlichen Verdünnungsverhältnissen immer positivere Motilitätsergebnisse zu verzeichnen hat. Der Bulle HI ($P \leq 0,05$) schneidet mit seiner 1:50-Verdünnung durchschnittlich am negativsten ab.

Prozentsatz lebender Spermien und solcher mit unversehrtem Akrosom (NAR%; Tab. 12 und Anhang, Tab. 26))

In der Verdünnungsvariante 1:25 lassen sich für Samenzellen mit normalem Akrosom bei 5 VZP ($58 \pm 7,9$) und 10 VZP ($57,7 \pm 10,5$) keine wesentlichen Unterschiede feststellen, wohingegen der Unterschied zu den beiden später verdünnten Chargen mindestens 8 % beträgt ($P \leq 0,05$). Die beiden zuletzt verdünnten Varianten sind bezüglich dieses Kriteriums mit $49,6 (\pm 8,6)$ und $49,8 (\pm 7,3)$ wiederum sehr ähnlich. Die Chargen der höheren Verdünnungsstufe weisen dagegen schon einen erniedrigten Prozentsatz an Spermien mit unversehrtem Akrosom auf, wenn man 5VZP ($60,5 \pm 7,8$) und 10 VZP ($53,8 \pm 8,1$) mit einander vergleicht. Ein Unterschied ist hier zu den Verdünnungszeitpunkten 20 ($51,7 \pm 8$) und 30 ($49,1 \pm 10,9$) Minuten kaum vorhanden.

Aus dem Versuch geht außerdem hervor, dass die Chargen die 1:25 und 1:50 verdünnt wurden in der 5 VZP-Variante gleichwertige Ergebnisse zeigen und in diesem Parameter die 1:50-Variante um 2,5% positiver auffällt. Dagegen zeigt sich in der 10 VZP-Variante, dass die stärker verdünnten Proben ($53,8 \pm 8,1$; $P \leq 0,05$) einen vergleichsweise höheren Anteil veränderter Akrosomstrukturen aufweisen. Die danach verdünnten Proben haben wie in den oben geschilderten Fällen wieder etwas negativere Ergebnisse aufzuweisen ($P \leq 0,05$).

Auch hier zeigt der Bulle IM mit seinen beiden Verdünnungsvarianten in seinen Ejakulaten am meisten Zellen mit normalem Akrosom ($P \leq 0,05$).

Betrachtet man den Anteil lebender Spermien (Tab. 12), so sind in den 1:25 verdünnten Proben zwischen den nach 5 ($47,7 \pm 5,3$) und nach 10 ($48,3 \pm 7,9$) Minuten verdünnten Varianten keine Unterschiede zu erkennen. Auch im Falle der 20 VZP- und 30VZP-Varianten gibt es kaum Differenzen. Vergleicht man dagegen diese beiden Gruppen mit einander, so sind die Unterschiede zugunsten der erst verdünnten Chargen statistisch gesichert ($P \leq 0,05$). Bei den 1:50 verdünnten Varianten liegt zwischen der 5 VZP- und der 10 VZP- Probe immerhin ein Prozentsatz von 3,1%. Diese Differenz setzt sich auch bei den anderen später verdünnten in etwas kleinerem Ausmaß fort. Dass die nach 20 und 30 Minuten verdünnten Chargen einen höheren Anteil toter als die der 5 VZP-Variante besitzen ist statistisch gesichert ($P = 0,001$). Überraschenderweise ist der Bulle, der durchschnittlich mit relativ großem Abstand die meisten lebenden Zellen zu verzeichnen hat, das Tier HI ($P \leq 0,05$), das in den Motilitätsparametern eher negativ

abschnitt (Anh. Tab. 27 bis 32). Vergleicht man nun die Chargen mit unterschiedlichem Verdünnungsverhältnis miteinander, so kann man erkennen, dass hier die Ergebnisse der 1:25-Verdünnung mit mehr lebenden Zellen in den 5 VZP und 10 VZP abschneiden. Die nachfolgenden Verdünnungszeitpunkte weisen allgemein einen größeren Anteil toten Zellmaterials auf, wobei hier keine klare Überlegenheit eines Verdünnungsverhältnisses deutlich wird.

CMA-Ergebnisse (Sperm Vision; Tab. 13 +14, Anhang, Tab, 26)

Prozentsatz motiler (%motil) und progressiv motiler (% prog. motil) Spermien nach 45- und 125-minütiger Inkubation

Bei den im Verhältnis 1:25 verdünnten Chargen sind die Proben, die innerhalb der ersten 10 Minuten nach Ejakulation verdünnt wurden, eindeutig ($P \leq 0,05$) diejenigen, die höhere Prozentsätze an motilen und progressiv beweglichen Spermien zu verzeichnen haben. Dies trifft auf beide Untersuchungszeitpunkte zu. Nach 45 und 125 Minuten schneidet immer die 10 VZP-Variante am besten ab, wobei der Unterschied zwischen Zeitpunkt 10 und 5 Minuten bezüglich beider Parameter gleichermaßen zunächst ca. 5%, danach nur noch ca.1% beträgt. Zu beiden späteren Verdünnungszeitpunkten nehmen die Werte zur letzten Verdünnungszeit hin kontinuierlich ab (45 Minuten). Nach 125 Minuten Inkubation sind die Ergebnisse für 20 VZP und 30 VZP allerdings nahezu gleich zu setzen.

Prinzipiell zeigen die Spermchargen, die in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt wurden, die gleiche Entwicklung. Auch hier sind nach 45 Minuten die Resultate für 5- und 10 VZP gleich und höher zu setzen, wobei auch hier der Verdünnungszeitpunkt 10 Minuten minimal besser abschneidet. Nach 125 Minuten Inkubation ist das Gegenteil der Fall, da hier 10 VZP mit 32,1% ($\pm 6,9$) motiler Spermien 5,1% weniger bewegliche Zellen hat als die Vergleichsvariante. Die beiden Chargen, die nach 20 und 30 Minuten verdünnt wurden, wiesen kontinuierlich fallende Ergebnisse auf.

Die Zahlenwerte für die progressiven Spermien verhalten sich tendenziell genauso wie die der Gruppe der motilen Spermien.

Bei einem Vergleich der Chargen in Bezug auf das Verhältnis von Samen zu Verdünner, sind die Ergebnisse für die Prozentsätze motiler und progressiv beweglicher Spermien in der 1:25-Variante bis auf einen Zahlenwert (20 VZP, 125 min., 1:50, %motil: $30,7 \pm 8,2$ im Vergleich zu 1:25: $29,6 \pm 12$) höher als in den hoch verdünnten Proben. Zu sehen, ist auch ein relativ starker Abfall von 5 VZP auf 10 VZP nach 125minütiger Inkubation in der hoch verdünnten Variante. Dagegen zeigt sich hier in der Vergleichsvariante (1:25 nach 125 Minuten) sogar eine geringe Verbesserung des Resultates. Bei den Verdünnungen von 1:25 und 1:50 gleichermaßen zeigt der Bulle IM ($P \leq 0,05$) mit seinen Ejakulaten die höchsten Ergebnisse bezüglich dieser zwei Parameter, wohingegen der Bulle HI mit seiner stärker verdünnten Variante eher negativ auffällt.

Spermiengeschwindigkeit (VAP [$\mu\text{m/s}$] Tab. 13 + 14)

Die Spermien der Chargen, die im Verhältnis 1:25 verdünnt wurden, zeigten bis zu einem Verdünnungszeitpunkt von 20 Minuten nach der Ejakulation eine etwa gleich bleibend hohe Geschwindigkeit. Danach fiel die Geschwindigkeit um ca. $3,5 \mu\text{m/s}$ statistisch gesichert ab. Diese Resultate wurden nach 45minütiger Inkubation im Thermoresistenztest erzielt. Nach 125 Minuten sank die Geschwindigkeit von der 5 VZP-Variante zur 30 VZP-Variante geringfügig. Die gleichen Tendenzen sind auch bei den Proben zu erkennen, die höher verdünnt wurden. Allerdings ist nach 45 Minuten Inkubation immer eine geringgradig höhere Geschwindigkeit im Vergleich zu den weniger stark verdünnten Varianten zu erkennen. Die Spermien, die sich nach 45 Minuten am schnellsten bewegten, stammten vom Bullen HA (1:50). Allerdings hatte dieses Tier nach 125 Minuten dann die niedrigsten Geschwindigkeiten zu verbuchen. Zu diesem späteren Untersuchungszeitpunkt war IM derjenige, der die Zellen mit der schnellsten Fortbewegung produziert hatte.

Linearität und seitliche Kopfauslenkung (ALH [μm])

Betrachtet man die grafische Darstellung der Linearität in Abbildung 21 (45 Minuten), so fällt auf, dass die Geradlinigkeit der Spermien im Falle beider Verdünnungsverhältnisse von 5 VZP bis 30 VZP etwas ansteigt. Diese stärkere Linearität ist für 20 VZP ($P = 0,005$) und 30 VZP ($P \leq 0,05$) statistisch abgesichert. Unterschiede zwischen den beiden Verdünnungsverhältnissen sind sehr gering.

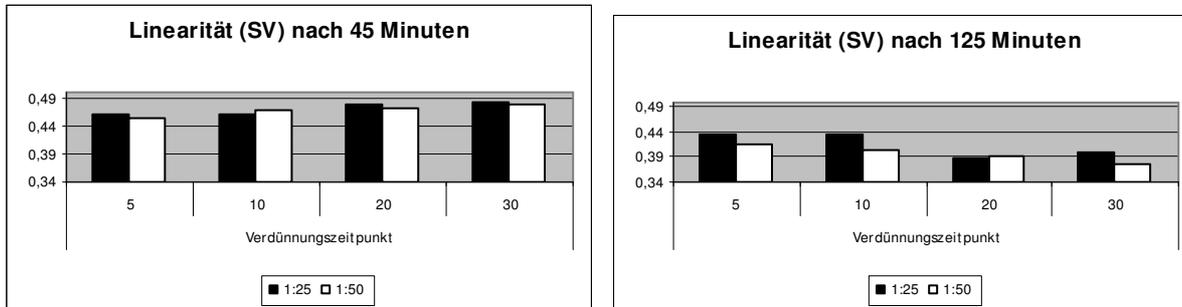


Abb. 21: Geradlinigkeit der Spermien nach 45 und 125 Minuten Thermoresistenztest, Verdünnung der Ejakulate 5, 10, 20 oder 30 Minuten nach Samengewinnung im Verhältnis 1: 25 oder 1: 50

Nach 125minütiger Inkubation wird eine gegenteilige Entwicklung deutlich (Abb. 21). Vom frühesten zum spätesten Verdünnungszeitpunkt nimmt die lineare Bewegung der Spermien mit geringen Schwankungen ab. Hier ist allerdings auch ein Unterschied zwischen den hoch und den niedriger verdünnten Chargen auszumachen. 5 VZP ($0,44 \pm 0,05$) und 10 VZP ($0,43 \pm 0,06$) zeigen bei einer Verdünnung von 1:25 eine tendenziell höhere Linearität als die vergleichbar höher verdünnten Proben (20 VZP: $0,42 \pm 0,03$; 30 VZP: $0,41 \pm 0,04$). Bezüglich der Linearität schneidet der Bulle HU zu beiden Untersuchungszeiten am besten ab. Der bei allen anderen Motilitätsparametern eher positiv auffällige Bulle IM hat dagegen die wenigsten Zellen produziert, die sich geradlinig fortbewegen.

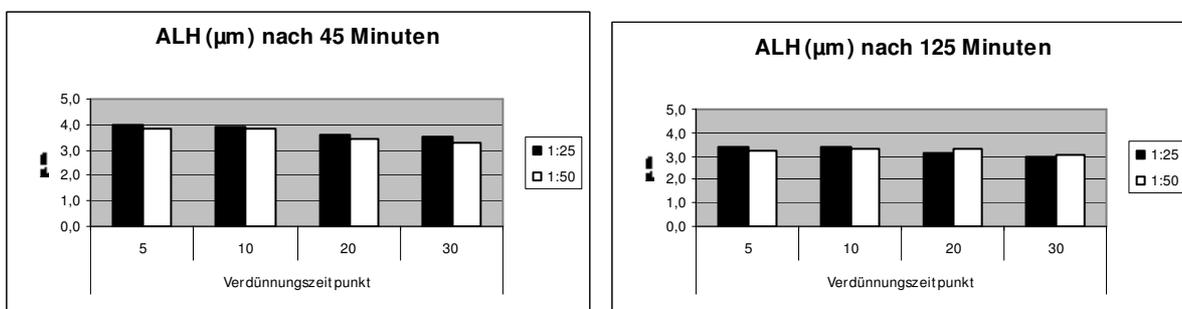


Abb. 22: Laterale Kopfauslenkung (ALH [μm]) nach 45 und 125 Minuten Thermoresistenztest, Verdünnung der Ejakulate 5, 10, 20 oder 30 Minuten nach Samengewinnung im Verhältnis 1: 25 oder 1: 50

Die seitliche Kopfauslenkung der Spermien von 5 VZP- ($4,0 \pm 0,6$) und 10 VZP-Chargen ($3,9 \pm 0,6$) mit einer Verdünnung von 1:25 ist nach 45minütiger Inkubation die stärkste (Abb. 22). Betrachtet man diesen Parameter und vergleicht die Ergebnisse der unterschiedlichen Bullen (Anhang, Tab. 27 bis 32) im Vergleich, so haben zu beiden Untersuchungszeitpunkten die Spermien des Bullen IM die stärkste Kopfauslenkung ($P \leq 0,05$). Dagegen hat nach 45 Minuten logischerweise das Tier mit den linearsten Spermien, HU, hier eine weniger starke Kopfbewegung.

V. Diskussion

Vergleich von zwei Varianten des Caprogen-Verdünners für die Flüssigkonservierung

Im Vergleich zu der Situation in Neuseeland ist in Deutschland der Einsatz von Frischsamen relativ begrenzt. Zusätzlich zur Kryokonservierung nutzen jedoch viele Besamungsstationen diese Art der Flüssigkonservierung für bestimmte Bullen. Ejakulate von Tieren, die züchterisch besonders interessant und für deren Samen eine große Nachfrage besteht, werden zur Produktion von „Frischsamen“ genutzt. Wenn Flüssigkonservierung durchgeführt wird, dann hauptsächlich mit dem bewährten Medium Caprogen®. Die Firma „New Zealand Genetics“ (Hamilton, New Zealand) hat das Monopol für die Produktion dieses Verdünners. Die Kosten für das Produkt zuzüglich Frachtkosten lassen den Bezug dieses Konzentrates relativ kostspielig werden. Allerdings wird durch das Fertigprodukt auch Arbeitszeit gespart. Aus mehreren Gründen gibt es deshalb einige Besamungsstationen, die diesen Verdünner von Hand ansetzen und zur Verdünnung von Bullensamen heranziehen. Trotz des Einsatzes in der Besamungspraxis gibt es keine Studien darüber, ob es Unterschiede in der Samenqualität gibt, wenn mit dem selbsthergestellten oder dem kommerziellen Produkt gearbeitet wird. Aus diesem Grund ist es besonders aus Sicht der Besamungsstationen interessant, ob es Qualitätsunterschiede gibt, die auch die Befruchtungsergebnisse beeinflussen können.

Der Laborversuch wurde durchgeführt, um mögliche Unterschiede in Bezug auf die spermienschützenden Eigenschaften der beiden Medien nachzuweisen. Dabei wurden moderne spermatologische Testmethoden eingesetzt. Ein möglichst objektives Ergebnis sollte durch den Einsatz der computergesteuerten Motilitätsanalyse erreicht werden. Dennoch wurde auf bewährte Verfahren wie die subjektive Schätzung des Anteils motiler Spermien oder die Ermittlung des Prozentsatzes an Spermien, die ein unversehrtes Akrosom aufweisen, nicht verzichtet. Der darauffolgende Besamungsversuch sollte außerdem einen Beitrag dazu leisten, heraus zu finden, welcher Laborparameter in seiner Aussage hinsichtlich einer Fertilitätsprognose wenig und welcher große Relevanz zeigt.

Zur Erzielung optimaler Befruchtungsergebnisse wird flüssigkonservierter Samen in der Praxis üblicherweise innerhalb von 72h nach der Produktion zur Inseminierung verwendet. Es ist jedoch immer noch Ziel der Forschung einen Verdünner zu entwickeln, der - ohne die mit der Kryokonservierung verbundenen Vitalitätseinbußen - nicht nur in diesem sehr begrenzten Zeitraum gute Inseminierungsergebnisse garantiert, sondern auch darüber hinaus. Nicht nur um festzustellen, ob einer der beiden Verdüner eventuell über die Dauer von einer Woche für die Besamung geeignet wäre, sondern auch um mögliche Unterschiede, die eventuell nicht schon nach 72h sondern erst nach mehreren Tagen deutlich sichtbar werden, aufzudecken, unterzog man die Proben einem Thermoresistenztest 1, 3 und 7 Tage nach der Produktion.

Zunächst schienen die beiden Varianten im Laborvergleich gleichwertig zu sein. Nur die NAR%-Ergebnisse wiesen auf eine leicht positive Tendenz für den neuseeländischen Caprogen® hin. Mit Hilfe der computergesteuerten Motilitätsbestimmung ergaben sich für den Anteil motiler und progressiv motiler Spermien und deren Geschwindigkeiten (VAP) sogar höhere Werte des eC im Vergleich zur kommerziellen Variante. Eine Linearität der Spermienbewegung war in letzterer Variante jedoch an den Messtagen 1 und 3 stärker vorhanden als in der „Eigenkreation“. Deutliche Unterschiede wiesen an diesen Tagen besonders die Ergebnisse für die seitliche Spermienkopfauslenkung auf.

Im Feldversuch gab es dann doch Unterschiede zwischen den Verdünnervarianten mit leichten Vorteilen für das kommerzielle Produkt. Wenn man die Laborergebnisse mit denen des Feldversuches vergleicht, so kann man die Vermutung äußern, dass die letztgenannten Parameter für die Vorhersage der Befruchtungsfähigkeit besonders aussagekräftig sind. Die traditionelle Beurteilung der Motilität macht eine wenig nutzbare Aussage in Bezug auf eine Fertilitätsprognose. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten insgesamt darauf hin, dass vorhandene moderne Testverfahren wie computergestützte Motilitätsanalyse oder Flowzytometrie vermehrt eingesetzt werden müssen, um die Fülle an Informationen, die durch diese

modernen Techniken geliefert werden, in Bezug auf eine bessere Fertilitätsprognose deuten zu können und so für die Praxis nutzbar gemacht werden können.

Untersuchungen zum Zusatz von N-Acetylcystein als Antioxidanz in einem eidotterfreien und einem eidotterhaltigen Verdünner

Obwohl schon seit einigen Jahren eigelblose Tiefgefriererdüner im Handel erhältlich sind, die laut Herstellerangaben und einiger Studien (HINSCH E et al. 1997; HURTADO MORALES MP 1998; MAHABIR E et al. 2002; MÜLLER-SCHLÖSSER F et al. 1995; MÜLLER-SCHLÖSSER F et al. 2000; MÜLLER-SCHLÖSSER F et al. 2001; SCHNEIDER H et al. 2002; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW AM et al. 2000) eine Alternative zu eigelbhaltigen Medien darstellen, zögern noch immer viele Besamungsstationen vom altbewährten Verdünner Abstand zu nehmen und diesen durch das „neue“ Medium zu ersetzen. Trotz des verringerten Kontaminationsrisikos durch Ersatz des tierischen Proteins und des ebenfalls reduzierten Arbeitsaufwandes, überwiegt in Deutschland der Umfang der Nutzung eidotterhaltiger Verdünner nach wie vor (NEHRING H et al. 2004). Die Gründe hierfür dürften in der Tatsache liegen, dass auf diesem Gebiet der Vergleich der Befruchtungsergebnisse aus verschiedenen Studien unterschiedlich ausfällt und auch noch nicht ausreichend Erfahrungen in der Praxis gesammelt werden konnten. Nur wenn genügend Beweise erbracht werden können, die eine Verbesserung oder zumindest Gleichwertigkeit des eigelblosen Mediums bezüglich seiner spermienkonservierenden Eigenschaften im Vergleich zum langjährig erprobten eidotterhaltigen Verdünner belegen, wird sich diese Variante in der Routinepraxis von Besamungsstationen durchsetzen. Das mit dem Einsatz von Eigelb verbundene Risiko ist begrenzt, das mit den neuen Verdünnern verbundene Risiko doch etwas schlechtere Befruchtungsraten zu erzielen, ist noch immer nicht ausgeräumt. Erfahrungen aus der Praxis sind somit unbedingt notwendig, um diese Unsicherheit aus der Welt zu schaffen.

In dem beschriebenen Bioxcell®-Triladyl®-NAC-Versuch (II.5.3. u. 5.4., IV.2.1. u. 2.2.) konzentrierte man sich nicht nur auf allein diese Fragestellung, sondern versuchte auch neue Erkenntnisse in Bezug auf einen Antioxidanzeneinsatz in der Spermakonservierung zu gewinnen. Zunächst sollen die Ergebnisse dieses Versuches mit besonderem Augenmerk auf ersteres Thema interpretiert werden.

In dem durchgeführten Laborversuch (IV.2.1.) kamen nicht nur „traditionelle“ Untersuchungsverfahren sondern vor allem auch moderne Methoden zum Einsatz. Besonders der Einsatz von computergesteuerter Motilitätsanalyse sollte ein möglichst objektives Ergebnis gewährleisten. Um außerdem Unterschiede zwischen diesen beiden Verdünnern deutlich zu machen, die nicht sofort nach dem Auftauen offensichtlich werden, wurden die Spermachargen im Resistenztest über 125 Minuten getestet.

Bei der subjektiven Motilitätsanalyse konnten über diesen Zeitraum keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Verdünnern festgestellt werden. Mit diesen Ergebnissen laufen die der CMA-Messung weitgehend konform, wobei hier die eigelblose Variante geringfügig besser abschneidet.

Das auch in anderen Studien (GIL J et al. 2000; HINSCH E et al. 1997; DUMONT P et al. 2005; MÜLLER-SCHLÖSSER F et al. 1995) geschilderte veränderte Motilitätsverhalten der Spermien in dem eidotterfreien Verdünner zeigt sich vor allem in einem höheren Anteil progressiv und linear beweglicher Spermien und in höheren Geschwindigkeiten. Die eigenen Untersuchungen belegen auch, dass mehr Spermien der eigelbhaltigen Verdünnervariante eine größere Kopfauslenkung und somit ein vergleichsweise verändertes Bewegungsmuster haben. Dazu wird in den genannten Veröffentlichungen häufig auf die Viskositätsunterschiede der beiden Medien hingewiesen und auch auf das vermehrte Antreffen von Debris in eidotterhaltigem Verdünner. Dass das eigelbhaltige Medium eine geringere Viskosität aufweist und hier weniger Partikel die visuelle Beurteilung der Proben beeinträchtigen, kann anhand der eigenen Untersuchungen nur bestätigt werden. Ob dies einen direkten Einfluss auf Befruchtungsraten hat, sei dagegen dahin gestellt, zumal in dem darauf folgenden Feldversuch (IV.2.2.) die Chargen mit eigelbhaltigem Verdünner geringfügig besser abschnitten.

Anhand der eigenen Laboruntersuchungen konnten wiederum Veröffentlichungen anderer Autoren (HEROLD FC et al. 2002) bestätigt werden, wonach der Anteil lebender Spermien sich in beiden Medien nicht unterscheidet. Dagegen konnten bezüglich des Prozentsatzes der Samenzellen mit unversehrter Akrosomstruktur leichte Differenzen festgestellt werden, wobei in den eigenen Versuchen die eigelblose

Variante eine verbesserte Schutzwirkung zeigte, in der genannten Studie jedoch keine Unterschiede festzustellen waren. Dass ein Verdünnermedium besonders für die Verdünnung Ejakulate bestimmter Bullen geeignet ist, kann aus den durchgeführten Versuchen - weder im Labor noch im Feld – nicht abgeleitet werden. Es kann aufgrund der relativ begrenzten Versuchsgröße allerdings auch nicht ausgeschlossen werden.

Der im Rahmen der experimentellen Arbeit durchgeführte Besamungsversuch ergab eine für alle beteiligten Bullen und deren Ejakulate durchschnittlich höhere Befruchtungsrate für die Varianten, die mit Triladyl® verdünnt wurden. Der Unterschied ist mit einem Wert von 1,1% geringfügig und in Anbetracht der relativ niedrigen Anzahl von Besamungen nicht statistisch zu sichern. Dieses Ergebnis stimmt mit den Erfahrungen einiger Autoren (HURTADO MORALES MP 1998; MAHABIR E et al. 2002; MÜLLER-SCHLÖSSER F et al. 1995; MÜLLER-SCHLÖSSER F et al. 2000; MÜLLER-SCHLÖSSER F et al. 2001; SCHNEIDER H et al. 2002) überein, widerspricht anderen dagegen auch (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW AM et al. 2000; THUN R u. HURTADO M 2002). Hier muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass nicht alle eigelblösen Verdüner gleich positive beziehungsweise negative spermienkonservierende Eigenschaften besitzen und einige Versuche mit Verdünnern anderer Hersteller durchgeführt wurden. Somit sind direkte Vergleiche nicht immer möglich. Betrachtet man nun die Erkenntnisse der Laboruntersuchungen in Kombination mit den Befruchtungsergebnissen, die in dem durchgeführten Feldversuch erbracht wurden, so kann man folgende Schlüsse ziehen:

Obwohl verschiedene Befunde aus den eigenen in-vitro Versuchen und denen anderer Autoren – insbesondere zum Motilitätsverhalten – gute und zum Teil leicht verbesserte Konservierungseigenschaften des eidotterfreien Verdünners Bioxcell® im Vergleich zu den immer noch häufiger benutzten eidotterhaltigen Verdünnern ergeben hatten, konnte dieser Befund im eigenen Feldversuch nur mit weitgehend gleich hohen Befruchtungsergebnissen bestätigt werden. Da die unterschiedlichen Ergebnisse des Inseminierungsversuches nicht statistisch zu sichern waren, können die im Vergleich leicht negativen Befruchtungserfolge bei Nutzung des eigelblösen Mediums lediglich als Zufallsbefunde gewertet werden. Nicht nur die Vermeidung von Kontamination durch tierisches Protein, auch die einfachere Handhabung des Verdünners bei der Verarbeitung von Bullenejakulaten, sehr gute Auftauergebnisse im Labor und ebenbürtige Befruchtungsergebnisse im Feld, lassen den eigelblösen Verdüner Bioxcell® als eine gute Alternative zu den herkömmlichen eigelbhaltigen Verdünnern erscheinen.

Die Tatsache, dass die Überhandnahme reaktiver Sauerstoffspezies durch beispielsweise defekte Spermatozoen oder durch die entzündungsbedingte Anwesenheit von Leukozyten im männlichen Genitaltrakt die Samenqualität beeinflussen kann, ist bekannt. Eine erhöhte Rate an oxidativen Schäden, Motilitätsverlust und verminderte Fähigkeit zur Spermium-Oozytenfusion sind nur einige der möglichen negativen Konsequenzen für die Befruchtungsfähigkeit geschädigter Spermien (OCHSENDORF FR u. PODDA M 1999). Selbst ein in nativem Zustand einwandfreies Ejakulat kann durch die Manipulation bei Verdünnung, Einfrieren und Auftauen und durch eine dadurch möglicherweise gesteigert auftretende ROS- Produktion erheblich geschädigt werden (JONES R et al. 1978; JONES R u. MANN T 1976; JONES R u. MANN T 1977b). Trotz moderner Verarbeitungsmethoden können diese negativen Effekte nicht vollständig vermieden werden. Um das durch das Auftreten von „oxidativem Stress“ auftretende Risiko einer verminderten Befruchtungsrate zu vermindern, erscheint der Einsatz von Antioxidanzien sinnvoll. In einigen Studien befasste man sich bereits mit dieser Thematik, wobei Spermien zum Beispiel mit Vitamin E und C versetzt wurden. Diese Substanzen zeigten jedoch nur einen positiven Effekt, wenn die Spermachargen keinem Kälteschock - also ausschließlich optimalen Bedingungen – ausgesetzt wurden (BECONI MT et al 1991). Im Gegensatz dazu konnten (BILODEAU JF et al. 2001) durch den Einsatz von Thiolen ab einer Konzentration von 1mM auch Spermien einen effizienten Schutz bieten, die oxidativem Stress ausgesetzt waren. In einem Resistenztest über 6 Stunden wirkte sich dies vor allem auf die Motilitätsrate der Samenzellen positiv aus. Wie hoch allerdings der intrazelluläre Spiegel von Thiolen für ein optimales Überleben von Samenzellen sein muss, wurde von diesen Autoren nicht ermittelt. Außerdem wurden bisherige Versuche mit herkömmlichen eigelbhaltigen Verdünnern durchgeführt. Die

aktuelle Situation lässt jedoch vermuten, dass eigelblose Medien in naher Zukunft eine größere Rolle spielen werden als solche, die tierisches Eiweiß als Komponente enthalten, so dass auch hier großes Interesse an Erfahrungen besteht, ob Antioxidanzien auch in diesen neuartigen Medien ihre Wirkung entfalten können oder nicht. Von Seiten der Forschung als auch der Praxis besteht auch Bedarf, der Frage nach konzentrationsabhängigen Effekten nachzugehen. Der Zusatz von Antioxidanzien könnte bei der Spermaverarbeitung eine einfache und sinnvolle Methode sein, die unvermeidbaren ROS zu bekämpfen und die damit verbundenen Zellschäden einzudämmen.

Zur Gruppe der Thiole gehört auch das in den eigenen Versuchen verwendete N-Acetylcystein. Der dazu durchgeführte eigene Laborversuch bestätigte den in anderen Studien beschriebenen (BILODEAU JF et al. 2001; NEHRING H et al. 1992) Effekt des SH-Gruppenträgers auf die Motilität der Spermien nochmals, machte allerdings auch deutlich, dass die zuvor in Frage gestellte unterschiedliche Wirkung in den beiden Verdünnern nicht bestätigt werden konnte. Bezüglich des Motilitätsverhaltens sind die Differenzen zwischen den Chargen mit unterschiedlichen NAC-Konzentrationen nicht erheblich, jedoch kann – auch unter Berücksichtigung früherer Versuche – eine Tendenz zu verbesserten Motilitätsraten bei den Chargen ausgemacht werden, die einen Zusatz zwischen 6 und 8mmol NAC pro Liter Verdünner enthalten. Dies wird vor allem gegen Ende des Thermoresistenztestes über 125 Minuten deutlich. Bei anderen untersuchten Vitalitätsparametern ist diese Tendenz nicht klar erkennbar. Insgesamt konnten keine deutlichen Unterschiede in der NAC-Wirkung in dem eidotterhaltigen Verdünner Triladyl® und dem eigelbfreien Verdünner Bioxcell® beobachtet werden.

Der Feldversuch bestätigte zumindest in den mit Triladyl® verdünnten Proben, dass es durch den Zusatz von 8mmol/l NAC zu einer zwar sehr geringgradigen aber doch erkennbaren Verbesserung des Befruchtungserfolges im Vergleich zur T0-Variante kommt. Die mit Bioxcell® verdünnten Chargen lieferten mit und ohne Antioxidanz die gleichen Befruchtungsergebnisse, so dass hier kein NAC-bedingter positiver Effekt sichtbar wurde. Für eine konkrete Beurteilung der Wirkung des NAC-Zusatzes fehlt hier allerdings die statistische Sicherheit.

Versuche zum Thema „Coating-Effekt“

Ejakulate bestehen mit den Spermien als zellulärem Anteil und dem Seminalplasma als Medium aus zwei sehr unterschiedlichen Bestandteilen. Auch wenn erstere Fraktion für eine erfolgreiche Befruchtung zweifelsohne unerlässlich ist, so muss man dem Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen doch auch einen erheblichen Einfluss auf das Befruchtungsergebnis zugestehen. Wie groß dieser definitiv ist, ist noch nicht ausreichend geklärt. Versuche, bei denen man die Produktionsstätten dieses Sekretes operativ entfernte, ergaben, dass dies bei künstlicher Befruchtung keinerlei Effekt auf die Fertilität mit sich brachte, im Natursprung jedoch zu vollständiger Unfruchtbarkeit führte (DAVIS DC et al. 1975; PEITZ B u. OLDS-CLARKE P 1986; QUENN K et al. 1981).

Die Zusammensetzung des Seminalplasmas wurde unter Pkt. II. 7 ausführlich beschrieben. Sie ist stark einzeltierabhängig. Auch Ejakulationsfrequenz und Jahreszeit haben einen nicht unerheblichen Einfluss. Fest steht auch, dass zum Zeitpunkt der Ejakulation dieses Sekret den Samenzellen beigefügt wird und durch eine Anlagerung von Proteinen wie zum Beispiel Blutgruppenantigenen, immunsuppressiven Faktoren und anderen Eiweißen an die Spermienmembran ein Vorgang stattfindet, den man als „Coating“ bezeichnen kann (BUSCH W u. HOLZMANN A 2001). Diese Gruppen bewirken eine Stabilisierung der Zellmembran, steuern die Ausbildung von Rezeptoreigenschaften bei Erkennung der arteigenen Zona-Pellucida und verhindern eine vorzeitige Kapazitation, die eine erfolgreiche Befruchtung unmöglich machen würde. Zu diesen Coating-Proteinen gehören unter anderem das ASF-Protein, Spermin, aSFP und die BSP-Proteine (CHANG MC 1957; CLARK EN et. al. 1993; ENG LE u. OLIPHANT G 1978; OLIPHANT G u. BRACKETT BG 1973; MANJUNATH P et. al. 1993; MILLER DJ et. al. 1990; RUBINSTEIN S u. BREITBART H 1991). Im Falle des Spermins ist bekannt, dass die Bindungsrate dieses Proteins so hoch ist, dass innerhalb von 5 Minuten nach Ejakulation die Spermienoberflächen eines gesamten Ejakulates mit daran gebundenem Spermin gesättigt ist und sich an diesem Zustand auch nach

einer weiteren 20-minütigen Inkubation nichts ändert (RUBINSTEIN S u. BREITBART H 1991). In Bezug auf dieses Protein reicht die im Routinebetrieb von Besamungsstationen übliche Verarbeitungszeit somit aus. Für die anderen genannten Coating-Proteine gibt es jedoch noch nicht ausreichend Informationen über ihre Bindungsgeschwindigkeit. Man geht jedoch davon aus, dass die Zeit, die man für die Aufbereitung und Verdünnung von Bullensperma benötigt, für den Vollzug des Coating-Effektes ausreicht (KOMMISRUDE 1992). Dies zu überprüfen war Teil der Fragestellung dieser Arbeit. Bewusst wurden die Versuche dazu deshalb auch im Routinebetrieb einer Besamungsstation durchgeführt. Aus diesem Grund wurde zunächst überprüft, ob eine Coating-Zeit notwendig ist oder nicht. Im Anschluss daran wurde der Einfluss der Aufbewahrungszeit des unverdünnten Spermas auf die spätere Qualität nach dem Auftauen ermittelt.

Diese Versuche wurden außerdem jeweils mit einem hohen und normalen Verdünnungsverhältnis von Sperma zu Verdüner durchgeführt. Frühere Versuche hatten ergeben, dass die Spermiovitalität nach dem Auftauen von Verdünnungsgrad bzw. Seminalplasma weitestgehend unabhängig war, solange der Anteil an akzessorischem Sekret zwischen 3 und 10% betrug (NEHRING H et al. 2004).

Zur Überprüfung der Spermiovitalität wurden konventionelle Routinemethoden der Spermabeurteilung mit modernen spermatologischen Tests kombiniert. Im Verlauf des Thermoresistenztestes über 125 Minuten kamen neben subjektiver Motilitätsschätzung und die Ermittlung des Anteil an Spermien mit unversehrtem Akrosom durch Formolfixierung auch flowzytometrische Auswertungen und CMA-Messungen zur Analyse des Anteils lebender Samenzellen und zur objektiven Ermittlung verschiedener Motilitätsparameter zum Einsatz.

Coating-Effekt Versuch I

Die subjektive Motilitätsanalyse zeigt, dass bezüglich dieses Parameters zwischen den Verdünnungszeitpunkten 0 und 10 Minuten kaum Unterschiede zu verzeichnen waren. Das gleiche gilt bis zu 35 Minuten innerhalb des Thermoresistenztest auch für die beiden Verdünnungsverhältnisse. Nach 35 Minuten schneidet hier jedoch die 1:25 verdünnte Variante immer besser ab. Bezüglich der Spermien mit normaler akrosomaler Randverdickung ergeben sich für die zuerst verdünnte Variante tendenziell etwas bessere Ergebnisse, als für die später verdünnte Probe, wobei hier das Verdünnungsverhältnis keine Rolle spielt. Dagegen haben die Proben, die nach 10 Minuten Haltezeit verdünnt wurden, bei der flowzytometrischen Auswertung tendenziell höhere Raten lebender Spermien zu verzeichnen. Die niedriger verdünnte Variante schneidet auch hier im Vergleich zur 1:50-Verdünnung etwas besser ab. Bezüglich des Anteils motiler und progressiv motiler Spermien kommt man bei Betrachtung des Verdünnungsverhältnisses zum gleichen Ergebnis, wohingegen der Verdünnungszeitpunkt hier keine Bedeutung zu haben scheint. Bei der Spermigeschwindigkeit (VAP) sind, was Verdünnungszeitpunkt und -verhältnis angeht, ebenfalls keine Differenzen festzustellen. Die Linearität der Samenzellen ist für Proben, die nach 0 und 10 Minuten verdünnt wurden, durchschnittlich ebenfalls vergleichbar, wohingegen nach 125 Minuten im Resistenztest die weniger stark verdünnten Spermien eine signifikant höhere Geradlinigkeit aufweisen. Es sind auch kaum Abweichungen in der lateralen Kopfauslenkung zu erkennen, wenn man die zu den zwei verschiedenen Zeitpunkten verdünnten Proben miteinander vergleicht. Die Spermien der Chargen, die im Verhältnis 1:50 verdünnt wurden, zeigen jedoch einen insgesamt etwas geringeren Kopfausschlag auf.

Insgesamt wird deutlich, dass ein „Halten“ des unverdünnten Spermas über 10 Minuten bei 32°C keine Vorteile gegenüber einer sofortigen Verdünnung bringt. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Ergebnissen von Kommisrud E (1992) überein. Egal ob Chargen höher oder niedriger verdünnt werden, die Spermiovitalität bleibt bei einer Verdünnung innerhalb der ersten 10 Minuten nach der Ejakulation gleich. Falls somit ein Coating-Effekt stattfindet, so geschieht dies innerhalb weniger Minuten nach Vermengung von Samenzellen und Seminalplasma beim Samenerguß.

Coating-Effekt Versuch II

Bei einer Verdünnung von Proben zwischen 5 und 30 Minuten nach der Ejakulation lässt sich in Bezug auf die subjektiv geschätzte Motilität feststellen, dass die Bewegung der Samenzellen nach 20 Minuten-Verdünnungszeitpunkt signifikant absinkt. Bezüglich der Verdünnungsverhältnisse 1:25 und 1:50 schneiden die Proben bezüglich dieses untersuchten Parameters nach 35 Minuten im Resistenztest minimal schlechter ab, wenn sie höher verdünnt wurden. Für den Anteil an Spermien mit unversehrtem Akrosom spielt das Verdünnungsverhältnis jedoch keine Rolle. Doch auch hier weisen die Proben, die mindestens 20 Minuten nach der Ejakulation verdünnt wurden, ein tendenziell schlechteres Ergebnis auf. Auch bei der Ermittlung des Anteils lebender Spermien mittels Flowzytometrie schneiden die Varianten signifikant besser ab, die innerhalb der ersten 10 Minuten verdünnt wurden. Die Chargen, die höher verdünnt wurden, stellten immer auch diejenigen mit dem größeren Anteil toter Zellen dar, was schon zum frühesten Verdünnungszeitpunkt sichtbar wird. Bezüglich der CMA-Auswertung ergeben sich für den Prozentsatz motiler und progressiv motiler Spermien ebenfalls zu den ersten beiden Verdünnungszeitpunkten statistisch gesichert höhere Ergebnisse als für später verdünnte Chargen. Bezüglich dieses Parameters schneidet auch die 1:25-verdünnte Variante tendenziell besser ab. Für die Spermigeschwindigkeit sind bei einer Verdünnung innerhalb der ersten 10 Minuten kaum Unterschiede aus zu machen. Danach sinkt die ermittelte Geschwindigkeit etwas ab. Für die beiden Verdünnungsverhältnisse sind bezüglich der VAP kaum Abweichungen erkennbar, wenn überhaupt, dann eine tendenziell etwas höhere Geschwindigkeit bei den 1:50 verdünnten Chargen. Bis zu 45 Minuten im Thermoresistenztest nimmt die Linearität der Samenzellen für die Proben mit 10 Minuten als Verdünnungszeitpunkt signifikant zu, danach ist jedoch das Gegenteil der Fall. Ein Unterschied bezüglich der Geradlinigkeit der Spermien ist erst nach 125minütigem Thermoresistenztest zu erkennen. Hier zeigt die 1:25-Variante eine tendenziell stärker ausgeprägte Geradlinigkeit auf. Die laterale Kopfauslenkung der Spermien fällt bei den innerhalb der ersten 10 Minuten verdünnten Chargen etwas stärker aus, als bei den nach 20 und 30 Minuten verdünnten Proben. Was die beiden Verdünnungsverhältnisse angeht, sind keine Differenzen zu verzeichnen.

Die Versuchsergebnisse belegen, dass der Grenzbereich für die Aufbewahrung unverdünnten Spermas bei Temperaturen um 30°C bei etwa 10 Minuten liegt. Bei einer zwanzigminütigen Aufbewahrung des unverdünnten Spermas war bei allen erfassten Vitalitätsparametern bereits ein deutlicher Abfall zu verzeichnen. Nach 10 Minuten unverdünnten „Haltens“ war in der Verdünnungsvariante 1:25 keine Differenz zu einer Aufbewahrung über 5 Minuten zu erkennen, in der Verdünnungsvariante 1:50 gab es – wenn auch statistisch nicht immer sicherbar – schon negativere Auswirkungen. Das hatte sich auch im Versuch I bereits angedeutet. Der Vergleich der beiden Verdünnungsvarianten unabhängig von dem Problem „Coating-Effekt“ bestätigt den bereits bekannten und hier für die einbezogenen Bullen sehr deutlich sichtbaren Effekt, dass hohe Verdünnungsgrade zu einem Verdünnungsstress und zu Vitalitätsverlusten der Spermien führen können.

VI. Zusammenfassung

Untersuchungen zum Einsatz modifizierter Medien und Bedingungen bei der Konservierung von Bullensperma

Zielstellung der Arbeit war es, verschiedene Samenverdünner, Verdünnerzusätze und Einfrierverfahren für die Flüssig- und Tiefgefrierkonservierung von Bullensperma zu testen. Dabei wurden spermatologische Parameter (subjektiv und computer-assistierte Beurteilung der Spermienmotilität, Akrosomenmorphologie und Anteil lebender Spermien im Rahmen eines 125-minütigen Thermoresistenztestes bei 37°C) unter Zuhilfenahme von klassisch mikroskopischen Techniken und der flowzytometrischen Differenzierung benutzt. Teilweise wurden auch Besamungsversuche durchgeführt. Dadurch sollten neue Möglichkeiten zur weiteren Effektivierung des Konservierungsverfahrens generell und unter Berücksichtigung spezifischer Bedingungen der Besamungsstation überprüft werden.

Untersuchungen zur Flüssigkonservierung

In einem Laborversuch, der 24 Ejakulate von 4 Bullen umfasste wurde über den Zeitraum einer Woche der Konservierungserfolg des kommerziellen „Frischsamen“-Verdünners (Caprogen®) im Vergleich zu einer selbst hergestellten, kostengünstigeren Variante getestet. Im Ergebnis der Labortestung erwiesen sich die beiden Verdünner in ihren spermenschützenden Eigenschaften weitestgehend gleichwertig. Tendenziell fiel der Anteil an Spermien mit unversehrttem Akrosom für die kommerzielle Variante etwas günstiger aus. Für den Prozentsatz motiler und progressiv motiler Spermien, ihre Geschwindigkeiten und die seitliche Kopfauslenkung ergaben sich etwas höhere Werte für das selbst hergestellte Produkt.

Ein Feldversuch mit den Verdünnervarianten und insgesamt 30 Ejakulaten von vier Bullen ergab einen statistisch gesicherten Unterschied in der Non Return-Rate. Mit dem kommerziellen Produkt wurde mit 893 Erstbesamungen eine Non Return-Rate von 68,0% erzielt. Von denen mit dem selbst hergestellten Verdünner inseminierten Tieren, wurden von 796 Tieren nur 63,1% nicht mehr zu einer weiteren Besamung vorgestellt.

Untersuchungen zum Einsatz des Antioxidanz N-Acetylcystein in einem eidotterfreien und einem eidotterhaltigem Tiefgefrierverdünner

Unter Labor- (4 Bullen, insgesamt 14 Ejakulate) und Feldbedingungen (3 Bullen, insgesamt 23 Ejakulate) wurde der Einfluss eines Zusatzes des Antioxidanz N-Acetylcystein zu dem eigelblösen Verdünner Bioxcell® und zu dem eigelbhaltigen Verdünner Triladyl® im Hinblick auf den Konservierungs- und Befruchtungserfolg untersucht. Die Konzentration des N-Acetylcysteins in den beiden Verdünnern wurde im Bereich 0mmol/l bis 12mmol/l variiert.

Der Laborversuch bestätigt einen positiven Effekt des Antioxidanz auf die Motilität der Spermien, insbesondere bei längerer Inkubation nach dem Auftauen. Diese Tendenz war bei anderen Vitalitätsparametern nicht klar erkennbar. Zwischen den beiden Verdünnern wurden keine deutlichen Unterschiede beobachtet, außer, dass die laterale Kopfauslenkung der mit Triladyl® verdünnten Proben signifikant höher war. Obwohl die Differenzen im Motilitätsverhalten nicht erheblich waren und nicht in allen Varianten eine einheitliche Tendenz zeigten, war der Effekt bei einer Konzentration von 6 - 8 mmol N-Acetylcystein/l Verdünner am deutlichsten.

Im Feldversuch wurden Chargen mit 0 und 8mmol/l N-Acetylcystein in einer Kombination mit den Verdünnern Triladyl® und Bioxcell® eingesetzt. 1115 Tiere wurden mit der Triladyl-Variante ohne Antioxidanz-Zusatz besamt und erzielten ein Non Return-Ergebnis von 70,0%. Von 1104 Tieren, die mit der N-Acetylcystein-haltigen Variante des gleichen Verdünners besamt wurden, wurden 71,2% nicht mehr zu einer weiteren Besamung vorgestellt. Mit dem eigelbhaltigen Verdünner konnte somit durch einen Zusatz von 8 mmol/l Antioxidanz ein um 1,2% verbessertes Ergebnis erzielt werden. In der Variante mit dem eigelblösen Verdünner Bioxcell® wurde bei 1186 Erstbesamungen mit einem Zusatz und bei 1012 Erstbesamungen ohne einen Zusatz des N-Acetylcysteins jeweils ein Non Return-Ergebnis von 69,5% erzielt. Hier konnte somit kein Unterschied in der Befruchtungsrate festgestellt werden.

Insgesamt schnitt die eigelbhaltige Verdünnervariante um 1,1% besser ab als die eigelbfreie. Keines der Ergebnisse konnte jedoch statistisch gesichert werden.

Untersuchungen zum Coating- Effekt bei der Aufbereitung von Bullensperma für die Tiefgefrierkonservierung

In zwei Laborversuchen wurde überprüft, ob das derzeit übliche Zeitmanagement bei der Routineverarbeitung von Bullensamen einen ausreichenden Besatz der Spermienoberfläche mit Seminalplasmaeiproteinen (Coating-Effekt) gewährleisten kann. Als Stressfaktor wurden eine normale und eine hohe Verdünnung der Spermachargen einbezogen.

Im Coating-Effekt-Versuch I wurden Samenproben 0 und 10 Minuten nach der Ejakulation zweistufig sowohl im Verhältnis 1:25 als auch 1:50 mit Triladyl®-Verdünner verdünnt und nach der Routinemethode eingefroren. Der Versuch umfasste 11 Ejakulate von 4 Bullen.

Im Coating-Effekt-Versuch II wurden 12 Ejakulate von 3 Bullen verwendet. Auch hier wurde mit den beiden oben genannten Verdünnungsverhältnissen gearbeitet. Die Verdünnung der Proben wurde 5, 10, 20 und 30 Minuten nach dem Samenerguss mit Triladyl®-Verdünner durchgeführt. Der Einfriervorgang erfolgte ebenfalls nach der üblichen Standardmethode.

Die Ergebnisse sind besonders für die Praxis in den Besamungsstationen von Relevanz. Eine Aufbewahrung des unverdünnten Spermas bis zu 10 Minuten bei ca. 32°C vor der Verdünnung verbessert den Konservierungserfolg nicht. Alle untersuchten Vitalitätsparameter waren in der 0- und der 10-Minuten-Variante weitgehend gleich. Demzufolge spielt bei der Gefrierkonservierung von Bullensperma ein Coating-Effekt keine Rolle. Der Zeitraum zwischen Spermagewinnung und Spermaverdünnung, in dem das originäre Sperma meist bei 32°C aufbewahrt wird und in dem üblicherweise die Spermauntersuchung erfolgt, sollte nicht länger als 10 Minuten betragen. Dies sollte bei der Organisation der Spermagewinnung und -untersuchung berücksichtigt werden. Während sich die Varianten 5 und 10 Minuten bei den untersuchten Vitalitätsparametern nicht unterschieden, setzte ab der Variante 20 ein signifikanter und zunehmender Vitalitätsverlust ein. Dies war in den Varianten mit den hohen Verdünnungsgraden besonders deutlich. Damit wird auf mögliche Risiken beim Einsatz niedriger Spermienzahlen pro Besamungsportion verwiesen.

VII. Summary

Scientific study of the application of modified extenders under varying conditions on the procedure of processing bull-semen

The aim of this study was to investigate the survival rate of bull spermatozoa and their fertilizing ability when diluted with different extenders, with addition of a certain antioxidant and when varying procedures for processing were applied. Semen collection took place under routine conditions at an insemination centre. Several tests were applied to evaluate the sperm vitality, ranging from well-tried (e.g. subjective motility assessment, rate of spermatozoa with normal acrosome morphology by means of wet-fixation of semen with formaline-pNaCl, viability assessment with Eosin-Nigrosin-stain) to recently developed spermatological testing methods (e.g. computer-analysis of sperm-motility, fluorescence-microscopical evaluation, flowcytometrical differentiation of spermatozoa). The resistance of spermatozoa was examined by means of a thermoresistancy-test (37°C) which the samples had to undergo during a period of 125 minutes. These experiments should help find new possibilities to increase the efficiency of semen processing under conditions which are relevant for insemination centres.

In-vitro and in-vivo trials with liquid semen

In an in-vitro experiment with 24 ejaculates from 4 bulls, the conserving ability of the commercial extender Caprogen®, was screened and compared to a self-made cheaper variant. In general, these two diluents showed comparable results concerning their ability to preserve bull spermatozoa. But sperms which were processed with commercial extender showed a slightly higher rate of cells with normal acrosome morphology. Nevertheless the percentage of motile and progressively motile sperms and their velocity in the self-made extender achieved higher results than in the commercial product.

The field-trial (30 ejaculates from 4 bulls) resulted in a significant difference between these two diluents: 893 inseminations with Caprogen® ended in a non return-rate of 68,9%, and of 796 females which were inseminated with semen diluted with the self-made product 63,1% did not require further insemination.

Analysis of the use of adding the antioxidant N-acetylcysteine in an egg-yolk-free and in a traditional egg-yolk extender

The influence of added N-acetylcysteine on the sperm-vitality and their fertilizing-ability was tested in semen processed with the egg-yolk extender Triladyl® and the egg-yolk-free diluent Bioxcell®. This was evaluated by means of a laboratory trial (14 ejaculates, 4 bulls) and a field trial (23 ejaculates, 3 bulls).

The concentration of the antioxidant in the two extenders ranged from 0 mmol to 12 mmol/l N-acetylcycteine. The in vitro trial confirmed a positive effect of N-acetylcysteine on sperm motility, especially after a long incubation-time after thawing. This tendency could not clearly be seen through the assessment of other vitality parameters. Apart from significantly higher results of the lateral head-displacement of sperms diluted with Triladyl®, no distinct differences could be found between the two extenders. Although a deviation of motility results was not clearly to be seen, and did not show the same tendency in all experimental variants, the positive effect of N-acetylcysteine was most noticeable when 6 to 8 mmol/l of antioxidant was added to the extender.

Thus the field-trial consisted of the same two diluents (Bioxcell®, Triladyl®) in combination with 0 mmol/l and 8 mmol/l N-acetylcysteine. 1115 animals were inseminated with sperms which were diluted with Triladyl® and no Antioxidant, which resulted in a non return-rate of 70,0%. Of those animals (1104) which were inseminated with this egg-yolk extender and 8 mmol/l of added N-acetylcysteine 71,2% were considered to be in calf. This means that by adding this type of antioxidant to Triladyl® the non return-rate was increased by 1,2%. Artificial insemination on 1012 cows and heifers was carried out with the egg-yolk-free extender Bioxcell® without N-acetylcysteine and on 1186 animals with 8 mmol/l antioxidant. In both cases the non return-rate was 69,5%. In all, the egg-yolk extender Triladyl® achieved a 1,1% higher non return-rate than the egg-yolk-free extender, but this result – likewise to the other conclusions of this field-trial – was not statistically significant.

In vitro experiments with frozen-thawed bull semen concerning the subject “coating-effect”

Two laboratory tests were conducted to check whether the time schedule in semen processing which is currently in use can guarantee sufficient absorption of seminalplasma-proteins on the sperm-surface (coating-effect). Additional stress for the sperms was evoked by processing semen in normal and exceptionally high dilution.

In “coating-effect-trial I” (11 ejaculates, 4 bulls) semen was diluted 0 and 10 minutes after ejaculation in two steps to reach a terminal dilution of 1:25 and 1:50. In this and also the following experiment, Triladyl® was used as extender and the further procedure for producing deep-frozen straws was carried out under routine conditions.

In “coating-effect-trial II” (12 ejaculates, 3 bulls) the two same dilutions were produced, but the sperms were diluted 5, 10, 20 and 30 minutes after ejaculation.

Especially for insemination centres the results of these trials are of practical value. Concerning sperm-vitality, no advantage could be achieved by keeping undiluted semen up to 10 minutes at a temperature of 32°C before adding the extender. The assessed parameters for semen which was diluted 0 or 10 minutes after ejaculation were almost equal. Therefore a “coating-effect” does not play a major role in the production of deep-frozen bovine semen. Thus within 10 minutes after semen collection the native ejaculates should be checked in routine laboratory work. It should be taken into consideration that the time between semen collection and dilution, in which the ejaculate is normally kept at a temperature of 32°C and the routine laboratory check of the sperms takes place, should not exceed 10 minutes.

In “coating-effect-trial II” the variants which were diluted 5 and 10 minutes after ejaculation did not differ in their vitality results, but the experimental samples which were processed 20 minutes and more after semen collection showed a significantly increasing deterioration of sperm vitality. In those variants which were highly diluted this negative effect was especially noticeable and therefore the risk of using low numbers of spermatozoa for artificial insemination can result in low fertility-rates and should therefore be avoided.

VIII. Literaturverzeichnis

Acott TS u. Hoskins DD (1978)

Bovine sperm forward motility protein.

J Biol Chem **253**, 6744-6750

Affranchino MA, Trincherro GD, Schang LM, u. Beconi MT (1991)

Bovine spermatozoa as lipoperoxidation inhibitor.

Com Biol **9**, 261-274

Aires VA, Hinsch K-D, u. Müller-Schlösser F (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

Aitken RJ (1999)

The amoroso lecture. The human spermatozoon- a cell in crisis?

J Reprod Fertil **115**, 1-7

Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW, u. Irvine DS (1995a)

Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma.

Hum Reprod **10**, 2061-2071

Aitken RJ, Buckingham DW, u. Harkiss D (1993)

Use of a xanthine oxidase free radical generation system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa.

Journal of reproduction and fertility **97**, 441-450

Aitken RJ, Buckingham DW, u. West KM (1992)

Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin- dependent chemiluminescence.

J Cell Physiol **151**, 466-477

Aitken RJ u. Clarkson JS (1987)

Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa.

Journal of reproduction and fertility **81**, 459-469

Aitken RJ, Clarkson JS, u. Fishel S (1989a)

Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function.

Biol.Reprod. **40**, 183-197

Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, u. Wu FC (1989b)

Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia.

J Androl **10**, 214-220

Aitken RJ u. Fisher H (1994)

Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk.

Bioassays **16**, 259-267

- Aitken RJ, Fisher H, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, u. Irvine DS (1997)
Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine.
Molecular reproduction and development **47**, 468-482
- Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, u. Irvine DS (1998)
A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP- mediated induction of tyrosine phosphorylation.
J Cell Sci **111**, 645-656
- Aitken RJ u. Krausz C (2001)
Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome.
Reproduction **122**, 497-506
- Aitken RJ, Krausz C, u. Buckingham DW (1994a)
Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspension.
Molecular reproduction and development **39**, 268-279
- Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, u. Van Dubin M (1995b)
Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function.
J Cell Sci **108**, 2017-2025
- Aitken RJ u. West KM (1990)
Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients.
Int J Androl **13**, 433-451
- Aitken RJ, West KM, u. Buckingham DW (1994b)
Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function.
J Androl **15**, 343-352
- Alvarez JG u. Storey BT (1983)
Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility.
Biol Reprod. **29**, 548-555
- Alvarez JG u. Storey BT (1989)
Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation.
Gamete Research **23**, 77-90
- Alvarez JG u. Storey BT (1995)
Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa.
Molecular reproduction and development **42**, 334-346
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, u. Storey BT (1987)
Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity.
Journal of andrology **8**, 338-348

- Anderson J (1945)
The semen of animals and its use for artificial insemination.
Anim.Breed.Genet.
- Aspinall D u. Paleg LG (1981)
Proline accumulation: physiological aspects.
The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants 205-241
- Babcock DF, Singh JP, u. Lardy HA (1979)
Alteration of membrane permeability to calcium ions during maturation of bovine spermatozoa.
Developmental biology **69**, 85-93
- Bailey JL u. Buhr MM (1993)
Ca²⁺ regulation by cryopreserved bull spermatozoa in response to A23187.
Cryobiology **30**, 470-481
- Bayard T Storey (1995)
Interactions between gametes leading tho fertilization: the sperm's eye view.
Reprod.Fertil.Dev. **7**, 927-942
- Beconi MT, Affranchino MA, Schang LM, u. Beorlegui N (1991)
Influence of antioxidant on SOD activity in bovine sperm.
Biochem Int **23**, 545-553
- Beconi MT, Francia CR, Mora NG, u. Affranchino MA (1993)
Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation.
Theriogenology **40**, 841-851
- Bergeron A, Crete MH, Brindle Y, u. Manjunath P (2004)
Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane.
Biol.Reprod. **70**, 708-717
- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon C, u. Sirard MA (2001)
Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen.
Theriogenology **56**, 257-286
- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, u. Gagnon C (2000)
Levels of antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing.
Molecular reproduction and development **55 (3)**, 282-288
- Bonanomi L u. Gazzaniga A (1980)
Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine.
Eur J Respir Dis Suppl **111**, 45-51
- Bousseau S, Brillard JP, Marquant- Le Guienne B, Guérin B, Camus A, u. Lechat M (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 699-706
- Boyer SP, Davis RO, u. Katz DF (1989)
Automated semen analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol* **12**, 167-200

- Budworth PR, Ammann RP, u. Hamerstedt RH (1987)
A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. *J Dairy Sci* **70**, 1927-1936
- Budworth PR, Ammann RP, u. Chapman PL (1988)
Relationships between computerized measurements of motion of frozen thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* **9**, 41-54
- Busch W u. Holzmann A (2001)
Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren.
- Calvete JJ, Sanz L, Enßlin M, u. Töpfer- Petersen E (1995)
Sperm surface proteins.
3th Int Conference on Boar Semen Preservation, Aug.6.-9., Mariensee
- Cavalli- Sforza (1969)
Grundzüge biologisch - medizinischer Statistik
Gustav - Fischer - Verlag
- Chang MC (1957)
A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm.
Nature **179**, 259-259
- Clark EN, Corron ME, u. Florman HM (1993)
Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida.
The journal of biological chemistry **268**, 5309-5316
- Clark IA, Hunt NH, u. Cowden WB (1986)
Oxygen- derived free radicals in the pathogenesis of parasitic disease.
Adv Parasitol **25**, 1-44
- Cross NL (1993)
Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm.
Molecular reproduction and development **35**, 316-323
- Davis DC, Hall G, Hibbitt KC, u. Moore HDM (1975)
The removal of seminal vesicles from the boar and the effects on the semen characteristics.
J Reprod Fertil **43**, 305-312
- De Lamirande E, Bardin CW, u. Gagnon C (1983)
Aprotinin and a seminal plasma factor inhibit the motility of demembrated reactivated rabbit spermatozoa.
Biol Reprod. **28**, 788-796
- De Lamirande E, Belles-Isles M, u. Gagnon C (1984)
Characteristics of a seminal plasma inhibitor of sperm motility.
Annals of the New York Academy of Sciences **438**, 125-131
- De Lamirande E, Eiley D, u. Gagnon C (1993)
Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids.
Int J Androl **16**, 258-266

- De Lamirande E u. Gagnon C (1992a)
Reactive oxygen species and human spermatozoa.I. Effect on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes.
Journal of andrology **13**, 368-378
- De Lamirande E u. Gagnon C (1992c)
Reactive oxygen species and human spermatozoa.II. depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility.
Journal of andrology **13**, 379-386
- De Lamirande E u. Gagnon C (1992b)
Reactive oxygen species and human spermatozoa.II. depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility.
J Androl **13**, 379-386
- De Lamirande E u. Gagnon C (1993a)
A positive role for superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa.
Int J Androl **16**, 21-25
- De Lamirande E u. Gagnon C (1993b)
Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process.
Free Rad Biol Med **14**, 157-166
- De Lamirande E u. Gagnon C (1995)
Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects.
Hum Reprod **10**, 15-21
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, u. Gagnon C (1997)
Reactive oxygen species and sperm physiology.
Reviews of Reproduction **2**, 48-54
- De Lamirande E, Leduc BE, Iwasaki A, Hassouna M, u. Gagnon C (1995)
Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury.
Fertil Steril **64**, 637-642
- Desnoyers L u. Manjunath P (1992)
Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids.
J Biol Chem **267**, 10149-10155
- Dott HM u. Foster GC (1979)
The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. J Reprod Fertil **55**, 161-166
- Dostàlova Z, Calvete JJ, Sanz L, Hettel C, Riedel D, Schöneck C, Einspanier R, u. Töpfer- Petersen E (1994)
Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa.
Biological Chemistry Hoppe-Seyler **357**, 457-461
- Dumont P, Maitre P, u. Guérein B (1995)

Effet de la concentration en glycérol et de la présence de jaune d'oeuf sur la conservation à 4°C des spermatoïdes de taureaux.

Elevage et insemination **268**, 13-28

Duru NK, Morshedi M, u. Oehninger S (2000)

Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa.

Fertil Steril **74**, 1200-1207

Einspanier R, Amselgruber W, Sinowatz F, Henle Th, Röpke R, u. Schams D (1993)

Localization and concentration of a new bioactive acetic seminal fluid protein (aSFP) in bulls.

J Reprod Fertil **98**, 241-244

Einspanier R, Krause I, Calvete JJ, Töpfer- Petersen E, Klostermeyer H, u. Karg H (1994)

Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms.

FEBS Letters **344**, 61-64

Einspanier R, Lauer B, Wollenhaupt K, u. Schöneck C (1995)

Influence of semen proteins on the route of fertilization.

3th Int Conference on Boar Semen Preservation, Aug.6.-9., Mariensee

Eng LE u. Oliphant G (1978)

Rabbit sperm reversible decapitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma.

Biol Reprod. **19**, 1083-1094

Fedder J, Askjaer SA, u. Hjort T (1993)

Nonspermatozoal cells in semen: relationship to other semen parameters and fertility status of the couple.

Arch Andr **31**, 95-103

Florman HM u. First NL (1988)

Regulation of acrosomal exocytosis II. The zona pellucida-induced acrosome reaction of bovine spermatozoa is controlled by extrinsic positive regulatory elements.

Developmental biology **128**, 464-473

Foote R (1967)

Factors prolonging the survival of unfrozen bovine spermatozoa.

J Dairy Sci **50**, 893-895

Gaal T, Mezes M, Noble RC, u. Dixon J (1995)

Development of antioxidant capacity in tissues of chick embryo.

Comp Biochem Physiol **112B**, 711-716

Garner DL, u. Johnson LA (1995)

Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. Biol.Reprod.**53**(2), 276-284

Garner DL, Thomas CA, Gravance CG, Marshall CE, DeJarnette JM, u. Allen CH (2000)

Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm.

Theriogenology **56**, 31-40

- Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, u. Marshall CE (1997)
Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.
Biol. Reprod. **57**(6), 1401-1406
- Gil J, Januskauskas A, Haard MCh, Haar MGM, Johannisson A, Söderquist L, u. Rodriguez-Martinez H (2000)
Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Triladyl.
Reprod.Dom.Anim. **35**, 69-77
- Gillissen A (1995)
Neue Perspektiven der Antioxidantien- Therapie mit Thiolen: Nacystelyn.
- Graham EF u. Foote RH (1987a)
Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm. I. A fertility assay of fresh semen.
Gamete Research **16**, 133
- Graham EF u. Foote RH (1987b)
Dilauroylphosphatidylcholine liposome effects on the acrosome reaction and in vitro penetration of zona-free hamster eggs by bull sperm. I. A fertility assay of frozen- thawed semen.
Gamete Research **16**, 147
- Graham JK, Kunze E, u. Hammerstedt RH (1990)
Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry.
Biol Reprod. **43**, 55-64
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, u. LeLannou D (1995a)
Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa.
Journal of reproduction and fertility **103**, 17-20
- Griveau JF, Renard P, u. Le Lannou D (1994)
An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation.
Int J Androl **17**, 300-307
- Griveau JF, Renard P, u. Le Lannou D (1995b)
Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process.
Int J Androl **18**, 67-74
- Gwathmey TM, Ignatz GG, u. Suarez SS (2002)
PDC-109 (BSP A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir.
Biol Reprod.
- Halliwell B (1990)
How to characterize a biological antioxidant.
Free Radic Res Comm **9**, 1-32
- Halliwell B u. Gutteridge JMC (1989a)
Free radicals in biology and medicine. **2**,
- Halliwell B u. Gutteridge JMC (1989b)
Free radicals in biology and medicine.

Clarendon Press

Heber U, Tyankova L, u. Santarius KA (1971)

Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino acids.
Biochim.Biophys.Acta **241**, 578-592

Herold FC, Gerber D, u. Aurich JE (2002)

Influence of homologous seminal plasma on bovine epididymal semen frozen with Triladyl or AndroMed.
Reprod.Dom.Anim. **37**, 236

Hinsch E, Hinsch K-D, Boehm JG, Schill WB, u. Müller-Schlösser F (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

Hoffmann B (2003)

Andrologie: Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung. **1**,

Holland MK, Alvarez JG, u. Storey BT (1982)

Lipid peroxidation on different tissues. Its role on the same.
Biol Reprod. **27**, 1109-1118

Hurtado Morales MP (1998)

Kryokonservierung von Rindersamenzellen mit Biociphos- Plus: Untersuchungen nach Konfektionierung bei 4°C und Raumtemperatur.
Dissertation, Veterinärmedizinische Universität Zürich

Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, u. Shur BD (1997)

Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmatic creatine phosphokinase and creatine phosphokinase isoform ratios.
Biol.Reprod. **56**, 1020-1024

Iwasaki A u. Gagnon C (1992)

Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients.
Fertil Steril **57**, 409-416

Janssen YM, Van- Houton B, Borm PJ, u. Mossuran BT (1993)

Cell and tissue responses to oxidative damage.
Lab Invest **69**, 261-274

Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Caval-Martim D, u. Calvayrac R (1989)

Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma.
Gamete Research **24**, 185-196

Jones R u. Mann T (1976)

Lipid peroxides in spermatozoa: Formation, role of plasmalogen and physiological significance.
Proc.R.Soc.Lond.(Biol) **193**, 317-331

Jones R u. Mann T (1977a)

Damage to spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids.
J Reprod Fertil **50**, 261-268

- Jones R u. Mann T (1977b)
Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa.
J Reprod Fertil **50**, 255-260
- Jones R, Mann T, u. Shering RJ (1978)
Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa.
Proc.R.Soc.Lond.(Biol) **201**, 413-417
- Jones RC (1976)
The nature of ultrastructural changes induced by exposure of spermatozoa to lysolecithin.
Theriogenology **6**, 656
- Kemme M u. Scheit KH (1988)
Cloning and sequence analysis of a cDNA from seminal vesicle tissue encoding the precursor of the major protein of bull semen.
DNA **7**, 595-599
- Knuth UA, Yeung CH, u. Nieschlag E (1987)
Computerized semen analysis: Objective measurement of semen characteristics is based on subjective parameter settings. Fert Steril **48**, 118-124
- Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, u. Tanaka T (1997)
Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients.
Fertil Steril **65**, 519-524
- Kolb E (1984)
Biochemie und Pathobiochemie der Fortpflanzung. **1**,
- Kommisrud E (1992)
Effect of 15 minutes delay between ejaculation and dilution of bull semen.
12th Int.Congr.Anim.Reprod., The Hague 1992, Bd.3, 1569
- Lewis SEM, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, u. Thompson W (1995)
Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men.
Fertil Steril **64**, 868-870
- Lindholmer CH (1974)
The importance of seminal plasma for human sperm motility.
Biol Reprod. **10**, 533-542
- Lopes S, Jurisicova A, Sun J, u. Casper RF (1998)
Reactive oxygen species: a potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa.
Hum Reprod **13**, 896-900
- Lucy JA (1972)
Functional and structural aspects of biological membranes. A suggested structural role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability.
Ann NY Acad Sci **203**, 4-11
- Mahabir E, Gilles M, Koll H, Wimmers K, Ponsuksili S, u. Schellander K (2002)
Vergleich von eigelbhaltigem und eigelbfreiem Medium zur Kryokonservierung von Bullensamen: Einfluß der unterschiedlichen Konservierungsmedien auf die IVP beim Rind.
29.Jahrestagung der AET-d, Bad Waldsee, 20./21.06.2002

- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, u. Desnoyers L (1993)
Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa.
Biol Reprod. **49**, 27-37
- Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chretien M, u. Chapdelaine A (1989)
Apolipoprotein A-1 binds to a family of bovine seminal plasma proteins.
J Biol Chem **264**, 16853-16857
- Manjunath P u. Sairam MR (1987)
Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma.
Biochemical Journal **241**, 685-692
- Mann T u. Lutwak-Mann C (1981a)
Male Reproductive Function an dSemen. **2**,
- Mann T u. Lutwak-Mann C (1981b)
Male Reproductive Function and Semen.
- Matzk F, Meister A, u. Schubert I (2000)
An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots.
The Plant Journal **21**, 97-108
- Mazur P (1980)
Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis in mammalian ova and embryos.
- McRorie RA u. Williams WL (1974)
Biochemistry of mammalian fertilization.
Annu.Rev.Biochem **43**, 777-804
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, u. Rodrigues JL (2002)
Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better?
Theriogenology **57**, 327
- Meister A (1994)
Glutathione, ascorbate, and cellular protection.
Cancer Res **54**, 1969-1975
- Miller DJ, Winer MA, u. Ax RL (1990)
Heparin- binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin.
Biol Reprod. **42**, 899-915
- Miller MD u. Aust SD (1989)
Studies of ascorbate- dependent, iron -catalyzed lipid peroxidation.
Arch Biochem Biophys **271**, 113-119
- Müller-Schlösser F, Aires VA, Hinsch E, Schill WB, u. Hinsch K-D (2000)
Investigation of an egg yolk- free andrological medium for freezing of bovine ejaculates.
Reprod.Dom.Anim.- Physiology, Pathology, Biotechnology **35(1)**, 38
- Müller-Schlösser F, Aires VA, Hinsch E, Schill WB, u. Hinsch K-D (2001)

Evaluation of the quality of a new generation of egg yolk-free semen diluters for cryopreservation of bovine semen.

34.Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, 22.-23.02.2001

Müller-Schlösser F, Hinsch E, Böhm J, Schill WB, u. Hinsch K-D (1995)

Untersuchungen an einem eidotterfreien Verdünnungsmedium für die Tiefgefrier- Konservierung von Bullensperma.

Tierärztl Prax **23**, 363

Nehring H u. Rothe L (2002)

Testung eidotterfreier Verdünnernmedien bei der Gefrierkonservierung von Bullensperma im Hinblick auf eine Verringerung der Spermienzahl pro Besamungsportion.

unveröffentlichte Projektarbeit

Nehring H, Rothe L, Kanitz W, u. Becker F (2004)

Untersuchung zur Effektivierung der künstlichen Besamung beim Rind durch erhöhte Auslastung von Besamungsbullen und Stabilisierung der Trächtigkeitsergebnisse mittels biotechnischer Maßnahmen der Zyklus- und Ovulationssteuerung.

Zwischenbericht 12/ 2004 zum KBR- Projekt 2004/ 2005

Nehring H, Wicke I, u. Stähr B (1994)

Beeinflussung des Motilitätsverhaltens von Eberspermien durch heterologes Eberseminalplasma.

Reprod.Dom.Anim. **29**, 182

Nissen Hp u. Kreysel HW (1983)

Superoxide dismutase in human semen.

Klinische Wochenschrift **61**, 63-65

Ochsendorf FR u. Podda M (1999)

The role of reactive oxygen species in male infertility.

Reproduktionsmedizin **15/6**, 393-404

Oliphant G u. Brackett BG (1973)

Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation.

Biol Reprod. **9**, 404-414

Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Kohn S, Lynne CM, Thomas AJ Jr, u. Agarwal A (1997)

Seminal reactive oxygen species, sperm motility and morphology in men with spinal cord injury.

Fertil Steril **67**, 1115-1120

Paleg LG, Douglas TJ, Van Daal A, u. Keech DB (1981)

Proline and betaine protect enzymes against heat inactivation.

Aust.J.Plant Physiol. **8**, 107-114

Parrish JJ, Susko- Parrish JL, Leibfried- Rutledge ML, Criester ES, Eyestone WH, u. First NL (1986)

Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen.

Theriogenology **25**, 591-600

Pasqualotto FF, Sharma RK, Agarwal A, Nelson DR, Thomas AJ Jr, u. Potts JM (2000)

Seminal oxidative stress in chronic prostatitis patients.

Urology **55**, 881-885

Peitz B u. Olds-Clarke P (1986)

Effects of seminal vesicle removal on fertility and uterine sperm motility in the house mouse.
Biol Reprod. **35**, 608-617

Phillips P u. Lardy AL (1940)
A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen.
J Dairy Sci **23**, 399-404

Plante M, De Lamirande E, u. Gagnon C (1994)
Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility.
Fertil Steril **62**, 387-393

Polge C, Smith AU, u. Parkes AS (1949)
Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature.
Nature **164**, 666-676

Prat AG u. Turrens JF (1990)
Ascorbate and hemoglobin- dependent brain chemiluminescence.
Free Rad Biol Med **8**, 319-325

Quenn K, Dhabuwala CB, u. Pierrepont CG (1981)
The effect of removal of various accessory sex glands on the fertility of male rats.
J Reprod Fertil **62**, 423-426

Rajasekaran M, Hellstrom WJ, Naz RK, u. Sikka SC (1995)
Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia.
Fertil Steril **64**, 166-171

Ramadan A Saleh u. Ashok Agarwal (2002)
Oxidative stress and male infertility.
Journal of andrology **23**, 737-752

Riemke P, Braun J, u. Leidl W (1986) Die Videomikrographie - Eine Möglichkeit zur objektiven Bestimmung der Motilität von Bullenspermien. *J Vet Med A* **33**, 541-550

Robert M u. Gagnon C (1994)
Sperm motility inhibitor from human seminal plasma: presence of a precursor molecule in seminal vesicle fluid and its molecular processing after ejaculation.
International Journal of Andrology **17**, 232-240

Rubinstein S u. Breitbart H (1991)
Role of spermine in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction.
The biochemical journal **278**, 25-28

Scheunert A u. Trautmann A (1987)
Lehrbuch der Veterinärphysiologie. **7**,

Schneider H, Nabiev D, Mahabir E, Wimmers K, Ponsuksili S, Koll H, Gilles M, u. Schellander K (2002)
Vergleich eines Tris-Eigelb Verdünners und AndroMed bei der Tiefgefrierkonservierung von Bullensamen- Einfluß auf mögliche fertilitätsrelevante in vitro Parameter aufgetauter Spermien.
29.Jahrestagung der AET-d, Bad Waldsee, 20./21.06.2002

Schöneck C, Calvete JJ, Sanz L, Töpfer- Petersen E, Nowshari M, Hodges JK, u. Einspanier R (1994)

Erste funktionelle Vergleiche zwischen den Samenplasmaproteinen aSFP des Bullen und AWN-1 des Ebers belegen deren Einfluß auf die Spermivitalität.
Reprod.Dom.Anim. **29**, 89

Schuh H (1992)
Comparison between liquid and deep-frozen semen for artificial insemination in developing and developed countries.
Wld Anim Rev **70-71**, 44-53

Schülke B (1991)
Grundstruktur der Spermienzelle und Biochemie des Spermas.209-234

Setchell BP u. Brooks DE (1988)
Anatomy, Vasculature, Innervation and Fluids of the Male Reproductive Tract.

Shannon P (1962)
Effect of additions of volatile fatty acids on the viability and fertility of diluted bovine semen.
Nature **196**, 1225-1226

Shannon P (1964)
The effect of diluents containing glycine and glycerol, on fertility of diluted bovine semen.
New Zealand journal of agricultural research **7**, 357-363

Shannon P (1965)
Contribution of seminal plasma, sperm numbers and gas phase to dilute effects of bovine spermatozoa.
Journal of dairy science **48**, 1357-1361

Shannon P (1968)
Advances in semen dilution.
Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production **28**, 23-31

Shannon P u. Curson B (1984)
Effect of storage temperature on the viability and fertility of bovine sperm diluted and stored in Caprogen.
New Zealand journal of agricultural research **27**, 173-177

Shannon P, Curson B, u. Shannon P (1984)
Relationship between total spermatozoa/insemination and fertility of bovine semen stored in Caprogen at ambient temperature.
New Zealand journal of agricultural research **27**, 35-41

Shannon P u. Vishwanath R (1995)
The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine sperm and a theoretical model to explain the fertility differences.
Animal reproduction science **39**, 1-10

Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, u. Agarwal A (2001)
Relationship between seminal white blood cells counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic.
J Androl **22**, 575-583

Sies H (1993)
Strategies of antioxidant defence.
Eur J Biochem **215**, 213-219

- Sies H, Stahl W, u. Sundquist RA (1992)
Antioxidant function of vitamins. Vitamins E and C, beta- carotenoids, and other carotenoids.
Ann NY Acad Sci **669**, 7-20
- Sikka u. Suresh C (2004)
Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology.
Journal of andrology **25**, 5-18
- Speake BK, Surai PF, Gaal T, Mezes M, u. Noble RC (1996)
Tissue-specific development of antioxidant systems during avian embryogenesis.
Biochem Soc Trans **24**, 182
- Spitteler G (1993)
On the chemistry of oxidative stress.
J Lipid Mediators **7**, 77-82
- Stähr B u. Nehring H (1997)
Empfehlungen zur Gewinnung, Aufbereitung, Lagerung und Transport von Ebersperma.
IFN Schönnow
- Thomas J, Fishel SB, Hall JA, Green S, u. Newton TA (1997)
Increased polymorphnuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology.
Hum Reprod **12**, 2418-2421
- Thun R u. Hurtado M (2002)
Comparison of Biociphos and Tris- egg yolk- extender for cryopreservation of bull semen.
Theriogenology **57**, 1087-1094
- Tomlinson MJ, Barrat GLR, u. Cooke ID (1993)
Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggest that they are not a cause of male infertility.
Fertil Steril **60**, 1069-1075
- Töpfer- Petersen E, Romero A, Varela PF, Ekhlasi - Hundrieser M, Dostàlova Z, Sanz L, u. Calvete JJ (1998)
Spermadhesins: A new protein family. Facts, hypotheses and perspectives.
Andrologia **30**, 217-224
- Twigg J, Irvine DS, u. Aitken RJ (1998a)
Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmatic sperm injection.
Hum Reprod **13**, 1864-1871
- Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, u. Aitken RJ (1998b)
Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma.
Mol Hum Reprod **4**, 439-445
- Van Wagendonk-de Leeuw AM, Haring RM, Kaal- Lansbergen LM, u. Den Daas JH (2000)
Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract.
Theriogenology **54**, 57-67
- Van Zandwijk N (1995)

N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemoprotective properties, with special reference to lung cancer.

J Cell Biochem Suppl **22**, 24-32

Varner DD, Bowen JA, u. Johnson J (1993)

Effect of heparin on capacitation/acrosome reaction of equine sperm.

Arch Andr **31**, 199-207

Verstegen J, Iguer-Ouada M, u. Onclin K (2002)

Computer assisted smenen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology **57**, 149-179

Vishwanath R (2000)

Current concepts in semen preservation.

Livestock Improvement Corporation **3**,

Vishwanath R (2003)

Artificial insemination: the state of the art.

Theriogenology **59**, 571

Vishwanath R, Pitt CJ, u. Shannon P (1996)

Sperm numbers, semen age and fertility in fresh and frozen bovine semen.

Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production **31-34**

Vishwanath R u. Shannon P (1997)

Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature.

Reproduction, fertility and development **9**, 321-331

Vishwanath R u. Shannon P (2000)

Storage of bovine semen in liquid and frozen state.

Animal reproduction science **23-53**

Warren JS, Johnson KJ, u. Ward PA (1987)

Oxygen radicals in cell injury and cell death.

Pathol Immunopathol Res **6**, 301-315

Watson PF (2000)

The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.

Animal reproduction science **60-61**, 481

Wefers H u. Sies H (1988)

The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E.

Eur J Biochem **174**, 353-357

Wilson JX, Liu EM, u. Del Maestro RF (1992)

Developmental profiles of antioxidant enzymes and trace metals in chick embryo.

Mech Ageing Dev **65**, 51-64

Witting LA (1980)

Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical-initiated reactions.

In: Pryor, WA (ed.) Free radicals in Biology **IV**, 295-318

- Wolff H (1995)
The biologic significance of white blood cells in semen.
Fertil Steril **63**, 1143-1157
- Wolff H u. Anderson DJ (1988)
Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulation in human semen.
Fertil Steril **49**, 497-503
- Wung-Wai Tso u. Wai-Ming Lee (1980)
Seminal plasma and progressive motility of boar spermatozoa.
Int J Androl **3**, 243-250
- Yamamoto Y u. Omori M (1994)
Antioxidative activity of egg yolk lipoproteins.
Biosci Biotech Biochem **58**, 1711-1713
- Yanagimachi R (1988)
The physiology of reproduction.
Raven Press, New York 135-185
- Yancey PH u. Somero GN (1979)
Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes.
Biochemical Journal **183**, 317-323
- Zaimi A, Jennings MG, u. Baker HWG (1985)
Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men. *Int J Androl* **8**, 427-435
- Zini A, De Lamirande E, u. Gagnon C (1993a)
Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase- like activities in seminal plasma and spermatozoa.
Int J Androl **16**, 183-188
- Zini A, De Lamirande E, u. Gagnon C (1993b)
Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa.
International Journal of Andrology **16**, 183-188

IX. Anhang

Vergleich von zwei Varianten des Caprogen-Verdünners für die Flüssigkonservierung

Laborversuch: Abbildungen 1 bis 5 und Tabellen 1 bis 4

Tab.1.: Caprogen-Laborversuch (Mittelwerte)

Caprogen-Verdüner, kommerzielles Produkt

Bulle	Ej.	V% im Resistenztest																		Eosin-Färbung			NAR-Bestimmung		
		5 min			35 min			95 min			125 min			MW			Diff. 35/125 in %			% lebend			% NAR		
		Aufbewahrungsdauer des flüssigkonservierten Bullenspermas in Tagen																							
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
A	7	66	64	44	68	64	41	64	56	36	59	52	31	64	59	38	87,1	82,2	75,6	84,5	80,6	76,1	87,6	80,9	77,4
		±4	±6	±8	±4	±6	±9	±6	±5	±6	±7	±5	±8	±5	±4	±8	±6,5	±5,6	±10,9	±2,0	±1,6	±2,2	±1,6	±3,7	±2,2
B	7	64	61	35	64	56	30	58	50	24	54	44	21	60	53	28	85,0	76,7	70,7	86,4	84,3	76,4	84,6	81,2	68,6
		±6	±5	±14	±7	±11	±12	±11	±8	±9	±9	±12	±7	±8	±8	±10	±7,7	±11,2	±9,3	±2,6	±1,6	±2,7	±5,2	±4,2	±4,1
C	7	64	63	43	66	62	41	61	59	36	57	52	31	62	59	38	86,8	83,5	74,1	86,6	85,2	79,5	86,8	83,8	77,3
		±4	±9	±5	±4	±8	±9	±7	±8	±7	±6	±10	±8	±5	±8	±6	±4,2	±7,2	±9,9	±5,7	±2,3	±7,3	±3,0	±3,4	±6,2
D	3	68	65	30	68	63	27	65	57	25	58	45	20	65	58	25	85,2	70,6	69,3	87,8	87,1	78,2	87,0	83,5	73,5
		±3	±0	±20	±3	±6	±18	±5	±3	±20	±8	±17	±15	±5	±6	±18	±8,0	±25,9	±16,7	±2,8	±3,7	±1,8	±1,7	±1,3	±2,2
gesamt	24	65	63	39	66	61	34	61	55	31	57	49	26	62	57	33	86,1	79,5	73,0	86,1	83,8	77,5	86,4	82,1	74,3
		±14	±6	±12	±5	±17	±12	±8	±7	±11	±8	±10	±9	±6	±7	±11	±6,2	±11,5	±10,5	±3,7	±2,9	±4,4	±3,5	±3,6	±5,6

Caprogen-Verdüner, Eigenherstellung

Bulle	Ej.	V% im Resistenztest																		Eosin-Färbung			NAR-Bestimmung		
		5 min			35 min			95 min			125 min			MW			Diff. 35/125 in %			% lebend			% NAR		
		Aufbewahrungsdauer des flüssigkonservierten Bullenspermas in Tagen																							
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
A	7	66	61	41	4	62	41	64	58	37	59	50	31	64	58	38	87,1	80,6	74,6	85,7	81,9	77,9	86,9	78,6	72,9
		±4	±4	±7	±4	±4	±9	±6	±5	±6	±7	±5	±6	±5	±3	±7	±6,5	±7,8	±4,1	±1,8	±2,0	±2,1	±2,9	±2,6	±4,5
B	7	64	61	32	65	61	34	60	56	28	56	51	21	61	57	29	86,6	83,9	62,7	87,4	84,1	73,3	84,4	79,5	67,3
		±4	±5	±12	±4	±6	±10	±6	±5	±8	±7	±7	±7	±5	±5	±9	±6,5	±11,8	±11,9	±1,9	±1,9	±5,6	±4,0	±2,6	±5,3
C	7	62	61	37	66	59	39	61	56	34	57	51	28	61	57	34	86,8	85,4	70,1	88,8	86,1	77,4	85,7	82,2	73,7
		±3	±5	±8	±5	±5	±10	±7	±6	±6	±6	±6	±11	±5	±5	±8	±4,1	±4,6	±16,0	±1,8	±3,5	±9,0	±4,9	±2,8	±6,5
D	3	65	65	23	67	63	25	62	58	23	57	48	18	63	59	23	84,9	76,2	67,6	87,0	84,7	76,3	86,7	82,5	68,3
		±0	±0	±20	±6	±6	±18	±6	±3	±20	±6	±16	±15	±4	±5	±18	±1,4	±25,1	±15,3	±2,6	±6,0	±1,5	±1,6	±4,4	±5,8
gesamt	24	64	62	35	66	61	36	61	57	32	58	50	25	62	57	32	86,6	82,4	68,9	87,3	84,1	76,2	85,8	80,4	70,9
		±4	±4	±12	±4	±5	±11	±6	±5	±10	±6	±7	±10	±5	±4	±10	±5,2	±11,0	±12,3	±2,2	±3,3	±5,9	±3,8	±3,2	±5,8

Tab. 2.: Caprogen-Laborversuch (Mittelwerte)

Caprogen-Verdüner, kommerzielles Produkt

Bulle	Ej.	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm Vision														
		% motil			% progr. motil			VAP [$\mu\text{m/s}$]			Linearität [%]			ALH [μm]		
		Aufbewahrungsdauer des flüssigkonservierten Bullenspermas in Tagen														
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
A	7	63,6	60,8	46,3	45,7	38,3	21,3	59	42	40	56	44	40	2,8	2,2	2,9
		\pm 6,7	\pm 2,6	\pm 5,7	\pm 12,6	\pm 6,1	\pm 4,1	\pm 6	\pm 8	\pm 5	\pm 14	\pm 4	\pm 3	\pm 0,3	\pm 0,3	\pm 0,4
B	7	57,7	55,5	39,6	39,1	28,5	15,3	46	48	40	43	42	42	2,6	2,9	2,8
		\pm 5,8	\pm 4,5	\pm 4,1	\pm 9,1	\pm 6,4	\pm 8,6	\pm 7	\pm 11	\pm 17	\pm 5	\pm 2	\pm 3	\pm 0,5	\pm 0,5	\pm 1,0
C	7	66,0	65,7	44,7	46,8	44,3	26,1	53	48	35	40	39	38	3,2	3,1	3,1
		\pm 6,8	\pm 7,0	\pm 4,9	\pm 9,0	\pm 7,8	\pm 8,6	\pm 5	\pm 5	\pm 8	\pm 2	\pm 2	\pm 2	\pm 0,1	\pm 0,4	\pm 0,7
D	3	63,4	49,1	37,5	12,1	27,9	14,1	43	38	36	39	42	43	2,8	2,5	2,5
		\pm 9,0	\pm 10,4	\pm 12,0	\pm 12,1	\pm 15,5	\pm 12,6	\pm 4	\pm 11	\pm 11	\pm 4	\pm 4	\pm 2	\pm 0,0	\pm 0,8	\pm 0,9
gesamt	24	62,5	59,2	42,8	44,6	35,9	20,0	51	45	39	46	42	40	2,9	2,7	2,8
		\pm 7,1	\pm 7,8	\pm 6,6	\pm 10,6	\pm 10,3	\pm 8,9	\pm 8	\pm 9	\pm 11	\pm 10	\pm 3	\pm 3	\pm 0,4	\pm 0,6	\pm 0,7

Caprogen-Verdüner, Eigenherstellung

Bulle	Ej.	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm Vision														
		% motil			% progr. motil			VAP [$\mu\text{m/s}$]			Linearität [%]			ALH [μm]		
		Aufbewahrungsdauer des flüssigkonservierten Bullenspermas in Tagen														
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
A	7	63,1	67,6	63,7	43,4	41,0	36,7	61	51	41	46	43	41	3,4	3,2	2,9
		\pm 4,1	\pm 6,6	\pm 5,4	\pm 10,8	\pm 9,2	\pm 4,3	\pm 9	\pm 8	\pm 10	\pm 3	\pm 3	\pm 3	\pm 0,3	\pm 0,5	\pm 0,7
B	7	65,2	68,7	53,1	48,2	47,8	31,9	60	58	41	43	41	41	3,5	3,9	3,0
		\pm 4,9	\pm 1,7	\pm 7,0	\pm 9,2	\pm 4,2	\pm 7,4	\pm 10	\pm 4	\pm 9	\pm 3	\pm 1	\pm 3	\pm 1,2	\pm 0,4	\pm 0,8
C	7	70,3	64,8	58,1	53,7	44,9	34,7	63	54	42	42	41	39	4,1	3,8	3,3
		\pm 4,6	\pm 6,4	\pm 11,2	\pm 6,7	\pm 9,7	\pm 12,0	\pm 7	\pm 5	\pm 8	\pm 2	\pm 0	\pm 3	\pm 0,2	\pm 0,4	\pm 0,7
D	3	65,5	56,7	62,8	47,0	41,3	28,4	49	40	31	40	39	45	3,3	2,8	2,1
		\pm 6,2	\pm 4,3	\pm 11,8	\pm 3,2	\pm 4,7	\pm 16,9	\pm 4	\pm 3	\pm 12	\pm 1	\pm 2	\pm 10	\pm 0,2	\pm 0,3	\pm 1,1
gesamt	24	66,1	65,7	58,9	48,2	44,1	33,7	60	52	40	43	41	41	3,6	3,5	2,9

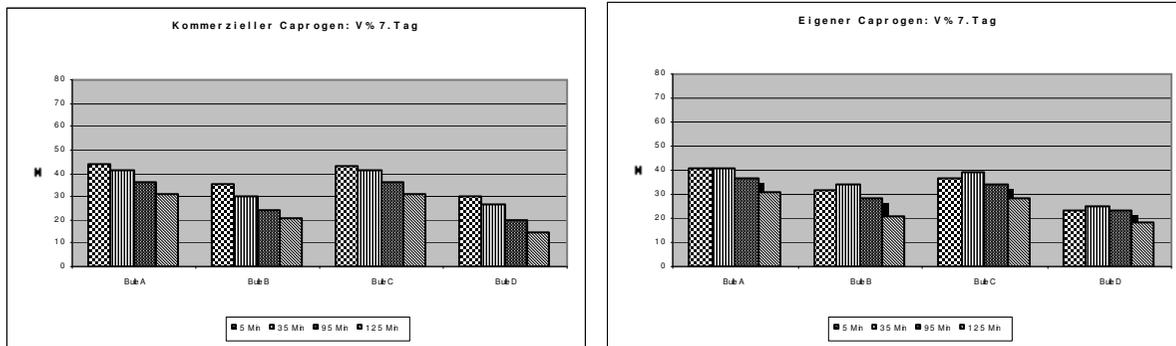


Abb.1: Darstellung der Ergebnisse der einzelnen Bullen bezüglich der subjektiven Motilitätsschätzung

Tab.3: Caprogen-Laborversuch (Einzelergebnisse)

Caprogen, kommerziell

Bulle	Ej	V% im Resistenztest																		Eosin-Färbung			NAR-Bestimmung		
		5 min			35 min			95 min			125 min			MW			Diff. 35/125 in %			% lebend			% NAR		
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
A	1	70	65	50	70	70	45	65	60	35	60	55	35	66	63	41	85,7	78,6	77,8	83,0	80,5	75,5	88,5	81,0	80,0
A	2	70	70	30	70	70	25	65	60	25	65	60	20	68	65	25	92,9	85,7	80,0	84,0	79,0	72,0	86,5	80,0	77,0
A	3	70	70	50	70	60	50	70	55	40	65	45	35	69	58	44	92,9	75,0	70,0	85,0	81,0	77,0	86,5	85,5	75,0
A	4	65	65	50	70	65	45	70	60	45	65	55	40	68	61	45	92,9	84,6	88,9	85,5	80,0	78,0	89,5	78,0	74,5
A	5	65	55	50	70	55	50	60	50	40	60	50	35	64	53	44	85,7	90,9	70,0	81,0	80,0	75,5	88,0	81,5	77,5
A	6	65	60	45	65	60	35	60	50	35	55	50	30	61	55	36	84,6	83,3	85,7	87,0	80,0	76,0	85,0	75,0	78,0
A	7	60	60	35	60	65	35	55	60	35	45	50	20	55	59	31	75,0	76,9	57,1	86,0	84,0	79,0	89,0	85,0	80,0
MW		66	64	44	68	64	41	64	56	36	59	52	31	64	59	38	87,1	82,2	75,6	84,5	80,6	76,1	87,6	80,9	77,4
STABW		±4	±6	±8	±4	±6	±9	±6	±5	±6	±7	±5	±8	±5	±4	±8	±6,5	±5,6	±10,9	±2,0	±1,6	±2,2	±1,6	±3,7	±2,2
B	1	70	65	45	70	60	45	65	55	30	60	55	25	66	59	36	85,7	91,7	55,6	84,0	83,0	75,5	87,0	84,5	70,0
B	2	70	65	30	70	70	25	65	55	25	65	55	20	68	61	25	92,9	78,6	80,0	86,5	84,5	74,5	88,5	80,0	71,0
B	3	65	60	15	65	60	15	65	55	10	60	35	10	64	53	13	92,3	58,3	66,7	87,5	87,5	80,0	88,0	84,0	70,0
B	4	65	65	50	65	65	40	65	60	35	60	55	30	64	61	39	92,3	84,6	75,0	90,0	83,0	73,0	81,5	77,5	60,0
B	5	60	60	50	65	45	40	60	40	30	50	30	25	59	44	36	76,9	66,7	62,5	87,5	84,0	77,0	87,0	85,0	68,0
B	6	55	60	35	50	55	25	40	45	25	40	45	20	46	51	26	80,0	81,8	80,0	82,0	83,0	75,0	74,0	74,0	72,5
B	7	60	50	20	60	40	20	45	40	15	45	30	15	53	40	18	75,0	75,0	75,0	87,0	85,0	80,0	86,0	83,5	69,0
MW		64	61	35	64	56	30	58	50	24	54	44	21	60	53	28	85,0	76,7	70,7	86,4	84,3	76,4	84,6	81,2	68,6
STABW		±6	±5	±14	±7	±11	±12	±11	±8	±9	±9	±12	±7	±8	±8	±10	±7,7	±11,2	±9,3	±2,6	±1,6	±2,7	±5,2	±4,2	±4,1
C	1	70	65	45	70	65	50	65	65	40	60	60	35	66	64	43	85,7	92,3	70,0	88,5	83,0	81,5	89,0	83,0	78,0
C	2	60	65	40	65	65	35	60	65	35	55	60	20	60	64	33	84,6	92,3	57,1	75,0	82,5	64,0	81,0	78,0	66,0
C	3	70	70	40	70	65	50	70	60	45	65	55	35	69	63	43	92,9	84,6	70,0	92,0	88,5	84,0	88,5	87,0	83,5
C	4	65	70	50	70	70	40	70	65	30	65	60	30	68	66	38	92,9	85,7	75,0	91,5	86,0	85,0	87,0	88,0	84,0
C	5	65	45	45	65	45	45	60	45	40	55	35	40	61	43	43	84,6	77,8	88,9	86,0	84,0	79,0	90,0	81,5	78,5
C	6	60	60	35	60	60	25	55	50	25	50	45	20	56	54	26	83,3	75,0	80,0	88,0	87,5	84,0	85,0	84,0	78,0
C	7	60	65	45	60	65	45	50	60	35	50	50	35	55	60	40	83,3	76,9	77,8	85,0	85,0	79,0	87,0	85,0	73,0
MW		64	63	43	66	62	41	61	59	36	57	52	31	62	59	38	86,8	83,5	74,1	86,6	85,2	79,5	86,8	83,8	77,3
STABW		±4	±9	±5	±4	±8	±9	±7	±8	±7	±6	±10	±8	±5	±8	±6	±4,2	±7,2	±9,9	±5,7	±2,3	±7,3	±3,0	±3,4	±6,2

Fortsetzung Tab. 3.:

Caprogen, kommerziell

Bulle	Ej	V% im Resistenztest																		Eosin-Färbung			NAR-Bestimmung		
		5 min			35 min			95 min			125 min			MW			Diff. 35/125 in %			% lebend			% NAR		
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
D	1	65	65	30	65	60	25	60	55	25	50	55	20	60	59	25	76,9	91,7	80,0	87,0	85,0	76,5	89,0	85,0	71,0
D	2	70	65	10	70	60	10	65	55	5	60	25	5	66	51	8	85,7	41,7	50,0	91,0	90,5	80,0	86,0	83,0	75,0
D	3	70	65	50	70	70	45	70	60	45	65	55	35	69	63	44	92,9	78,6	77,8	85,5	83,5	78,0	86,0	82,5	74,5
MW		68	65	30	68	63	27	65	57	25	58	45	20	65	58	25	85,2	70,6	69,3	87,8	87,1	78,2	87,0	83,5	73,5
STABW		±3	±0	±20	±3	±6	±18	±5	±3	±20	±8	±17	±15	±5	±6	±18	±8,0	±25,9	±16,7	±2,8	±3,7	±1,8	±1,7	±1,3	±2,2
MW gesamt		65	63	39	66	61	34	61	55	31	57	49	26	62	57	33	86,1	79,5	73,0	86,1	83,8	77,5	86,4	82,1	74,3
STABW gesamt		±14	±6	±12	±5	±17	±12	±8	±7	±11	±8	±10	±9	±6	±7	±11	±6,2	±11,5	±10,5	±3,7	±2,9	±4,4	±3,5	±3,6	±5,6

Fortsetzung Tab. 3.:

Caprogen, kommerziell

Bulle	Ej	CMA-Messung (Sperm Vision)														
		% motil			% progr. motil			VAP [$\mu\text{m/s}$]			Linearität [%]			ALH [μm]		
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
A	1	54,7	58,6	43,0	28,2	35,9	21,5	60	44	48	56	45	41	3,2	2,3	3,0
A	2	67,5	59,8	40,7	48,5	39,4	17,6	54	54	46	49	47	39	2,6	2,3	3,6
A	3	71,4	62,2	39,2	63,4	43,0	21,6	65	40	39	87	43	44	2,6	2,3	2,7
A	4	56,8	56,9	51,3	43,2	35,6	28,1	61	39	37	55	47	43	2,5	1,9	2,4
A	5	62,0	62,1	45,3	30,9	30,0	22,5	58	50	37	50	47	39	3,3	2,7	2,9
A	6	71,3	61,4	53,6	53,2	35,4	22,4	67	33	34	49	36	38	3,0	2,1	2,4
A	7	61,8	64,7	50,8	52,4	48,8	15,3	49	31	37	48	45	37	2,5	1,9	3,1
MW		63,6	60,8	46,3	45,7	38,3	21,3	59	42	40	56	44	40	2,8	2,2	2,9
STABW		$\pm 6,7$	$\pm 2,6$	$\pm 5,7$	$\pm 12,6$	$\pm 6,1$	$\pm 4,1$	± 6	± 8	± 5	± 14	± 4	± 3	$\pm 0,3$	$\pm 0,3$	$\pm 0,4$
B	1	59,5	53,7	37,6	27,8	32,5	8,2	57	54	70	48	42	41	3,0	3,6	4,1
B	2	63,4	58,5	34,3	51,5	19,0	9,0	46	48	46	38	40	37	2,9	3,0	3,8
B	3	63,2	55,5	34,6	49,5	23,4	9,3	38	43	23	38	40	45	2,3	2,5	1,8
B	4	55,8	54,2	43,6	38,4	32,1	27,5	44	63	49	48	44	42	2,4	3,4	3,2
B	5	57,9	57,2	41,7	31,0	33,8	22,3	53	44	28	47	44	43	3,3	2,8	2,0
B	6	57,5	62,0	42,6	42,5	23,6	7,2	47	55	45	40	44	40	2,4	2,9	3,2
B	7	46,3	47,7	43,1	33,3	35,2	23,1	38	30	22	42	43	46	2,1	2,0	1,5
MW		57,7	55,5	39,6	39,1	28,5	15,3	46	48	40	43	42	42	2,6	2,9	2,8
STABW		$\pm 5,8$	$\pm 4,5$	$\pm 4,1$	$\pm 9,1$	$\pm 6,4$	$\pm 8,6$	± 7	± 11	± 17	± 5	± 2	± 3	$\pm 0,5$	$\pm 0,5$	$\pm 1,0$
C	1	67,1	66,0	41,4	52,0	53,0	24,9	55	47	38	42	39	37	3,4	3,4	2,6
C	2	54,1	52,1	38,7	33,5	30,2	23,2	56	54	54	42	42	40	3,4	3,6	4,1
C	3	74,1	75,5	42,1	61,5	51,1	16,8	54	53	31	40	40	37	3,2	3,1	2,2
C	4	65,0	65,3	47,4	41,7	47,0	35,1	46	45	31	38	39	42	3,1	2,9	2,3
C	5	73,3	67,4	52,9	49,3	47,6	32,9	45	52	43	41	39	36	3,0	3,5	3,4
C	6	62,1	65,6	42,4	48,3	40,1	14,3	55	44	31	37	36	35	3,4	3,0	2,6
C	7	66,1	68,3	48,4	41,5	40,8	35,2	57	42	38	39	41	39	3,3	2,6	2,7
MW		66,0	65,7	44,7	46,8	44,3	26,1	53	48	35	40	39	38	3,2	3,1	3,1
STABW		$\pm 6,8$	$\pm 7,0$	$\pm 4,9$	$\pm 9,0$	$\pm 7,8$	$\pm 8,6$	± 5	± 5	± 8	± 2	± 2	± 2	$\pm 0,1$	$\pm 0,4$	$\pm 0,7$
D	1	53,6	37,2	31,6	35,7	12,5	10,4	38	43	45	36	39	41	2,8	2,9	3,5
D	2	71,3	53,9	29,5	57,4	27,7	3,6	44	25	24	39	46	45	2,8	1,6	1,7
D	3	65,4	56,3	51,3	55,9	43,5	28,1	46	46	37	43	42	43	2,8	3,0	2,4
MW		63,4	49,1	37,5	12,1	27,9	14,1	43	38	36	39	42	43	2,8	2,5	2,5
STABW		± 9	$\pm 10,4$	$\pm 12,0$	$\pm 12,1$	$\pm 15,5$	$\pm 12,6$	± 4	± 11	± 11	± 4	± 4	± 2	$\pm 0,0$	$\pm 0,8$	$\pm 0,9$
MW gesamt		62,5	59,2	42,8	44,6	35,9	20,0	51	45	39	46	42	40	2,9	2,7	2,8
STABW gesamt		$\pm 7,1$	$\pm 7,8$	$\pm 6,6$	$\pm 10,6$	$\pm 10,3$	$\pm 8,9$	± 8	± 9	± 11	± 10	± 3	± 3	$\pm 0,4$	$\pm 0,6$	$\pm 0,7$

Tab. 4.:

Caprogen, Eigenherstellung

Bulle	Ej	V% im Resistenztest																		Eosin-Färbung			NAR-Bestimmung		
		5 min			35 min			95 min			125 min			MW			Diff. 35/125 in %			% lebend			% NAR		
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
A	1	70	60	45	70	65	50	65	60	35	60	50	35	66	59	41	85,7	76,9	70,0	82,5	79,5	78,0	89,0	78,0	76,0
A	2	70	65	30	70	65	25	65	60	25	65	55	20	68	61	25	92,9	84,6	80,0	87,0	79,5	79,0	84,0	79,0	72,0
A	3	70	65	40	70	60	50	70	55	40	65	40	35	69	55	41	92,9	66,7	70,0	87,5	80,5	81,0	89,0	80,0	74,0
A	4	65	65	45	70	65	45	70	60	45	65	55	35	68	61	43	92,9	84,6	77,8	87,5	83,5	78,0	82,0	73,5	65,0
A	5	65	55	50	70	55	45	60	50	40	60	50	35	64	53	43	85,7	90,9	77,8	85,0	83,0	75,5	90,0	81,5	77,5
A	6	60	60	45	65	60	40	60	55	40	55	50	30	60	56	39	84,6	83,3	75,0	84,5	83,0	75,0	87,0	78,0	76,5
A	7	60	60	35	60	65	35	55	65	35	45	50	25	55	60	33	75,0	76,9	71,4	86,0	84,0	79,0	87,0	80,0	69,0
MW		66	61	41	4	62	41	64	58	37	59	50	31	64	58	38	87,1	80,6	74,6	85,7	81,9	77,9	86,9	78,6	72,9
STABW		± 4	± 4	± 7	± 4	± 4	± 9	± 6	± 5	± 6	± 7	± 5	± 6	± 5	± 3	± 7	± 6,5	± 7,8	± 4,1	± 1,8	± 2,0	± 2,1	± 2,9	± 2,6	± 4,5
B	1	65	65	45	70	55	45	60	55	35	60	55	30	64	58	39	85,7	100,0	66,7	83,5	83,0	63,0	84,0	79,0	76,0
B	2	70	65	25	70	70	25	65	65	20	65	60	15	68	65	21	92,9	85,7	60,0	88,5	83,0	75,0	88,0	80,0	68,0
B	3	65	65	15	65	65	20	65	55	15	60	40	15	64	56	16	92,3	61,5	75,0	87,0	85,0	80,0	86,5	79,0	67,0
B	4	65	65	40	65	65	40	65	60	35	60	55	15	64	61	33	92,3	84,6	37,5	88,5	83,0	69,0	84,0	78,5	58,0
B	5	60	55	45	65	55	45	60	50	35	55	45	30	60	51	39	84,6	81,8	66,7	88,0	86,0	75,0	85,0	77,0	67,0
B	6	60	60	35	60	60	30	55	55	30	50	55	20	56	58	29	83,3	91,7	66,7	87,0	82,0	75,0	76,0	78,0	66,0
B	7	60	55	20	60	55	30	50	55	25	45	45	20	54	53	24	75,0	81,8	66,7	89,0	87,0	76,0	87,0	85,0	69,0
MW		64	61	32	65	61	34	60	56	28	56	51	21	61	57	29	86,6	83,9	62,7	87,4	84,1	73,3	84,4	79,5	67,3
STABW		± 4	± 5	± 12	± 4	± 6	± 10	± 6	± 5	± 8	± 7	± 7	± 7	± 5	± 5	± 9	± 6,5	± 11,8	± 11,9	± 1,9	± 1,9	± 5,6	± 4,0	± 2,6	± 5,3
C	1	65	60	45	65	60	50	60	55	40	60	55	35	63	58	43	92,3	91,7	70,0	88,0	83,0	78,0	88,5	84,0	76,0
C	2	60	60	25	65	60	20	60	60	25	55	55	10	60	59	20	84,6	91,7	50,0	87,5	88,0	60,0	86,5	77,5	62,0
C	3	65	65	30	70	65	40	70	60	40	65	55	35	68	61	36	92,9	84,6	87,5	90,5	90,0	84,0	88,0	85,0	78,0
C	4	60	65	35	75	65	40	70	60	30	65	55	20	68	61	31	86,7	84,6	50,0	91,0	88,0	86,0	75,0	80,0	77,0
C	5	65	50	45	65	50	45	60	45	40	55	40	40	61	46	43	84,6	80,0	88,9	86,0	86,0	73,0	88,0	81,0	70,0
C	6	60	60	35	60	55	30	55	50	30	50	45	20	56	53	29	83,3	81,8	66,7	90,0	88,0	84,0	85,0	84,0	79,0
C	7	60	65	45	60	60	45	50	60	35	50	50	35	55	59	40	83,3	83,3	77,8	88,5	80,0	76,5	89,0	84,0	74,0
MW		62	61	37	66	59	39	61	56	34	57	51	28	61	57	34	86,8	85,4	70,1	88,8	86,1	77,4	85,7	82,2	73,7
STABW		± 3	± 5	± 8	± 5	± 5	± 10	± 7	± 6	± 6	± 6	± 6	± 11	± 5	± 5	± 8	± 4,1	± 4,6	± 16,0	± 1,8	± 3,5	± 9,0	± 4,9	± 2,8	± 6,5

Fortsetzung Tab. 4.:

Caprogen, Eigenherstellung

Bulle	Ej	V% im Resistenztest																		Eosin-Färbung			NAR-Bestimmung		
		5 min			35 min			95 min			125 min			MW			Diff. 35/125 in %			% lebend			% NAR		
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
D	1	65	65	20	60	60	20	55	55	20	50	60	15	58	60	19	83,3	100,0	75,0	85,0	85,0	75,0	88,5	86,0	65,0
D	2	65	65	5	70	60	10	65	60	5	60	30	5	65	54	6	85,7	50,0	50,0	90,0	90,5	76,0	86,0	84,0	75,0
D	3	65	65	45	70	70	45	65	60	45	60	55	35	65	63	43	85,7	78,6	77,8	86,0	78,5	78,0	85,5	77,5	65,0
MW		65	65	23	67	63	25	62	58	23	57	48	18	63	59	23	84,9	76,2	67,6	87,0	84,7	76,3	86,7	82,5	68,3
STABW		± 0	± 0	± 20	± 6	± 6	± 18	± 6	± 3	± 20	± 6	± 16	± 15	± 4	± 5	± 18	± 1,4	± 25,1	± 15,3	± 2,6	± 6,0	± 1,5	± 1,6	± 4,4	± 5,8
MW gesamt		64	62	35	66	61	36	61	57	32	58	50	25	62	57	32	86,6	82,4	68,9	87,3	84,1	76,2	85,8	80,4	70,9
STABW gesamt		± 4	± 4	± 12	± 4	± 5	± 11	± 6	± 5	± 10	± 6	± 7	± 10	± 5	± 4	± 10	± 5,2	± 11,0	± 12,3	± 2,2	± 3,3	± 5,9	± 3,8	± 3,2	± 5,8

Fortsetzung Tab. 4.:

Caprogen, Eigenherstellung

Bulle	Ej	CMA-Messung (Sperm Vision)														
		% motil			% progr. mot.il			VAP [$\mu\text{m/s}$]			Linearität [%]			ALH [μm]		
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
A	1	58,6	60,4	58,8	23,2	29,2	34,5	64	62	55	50	41	39	3,8	4,0	4,1
A	2	69,5	69,2	67,5	50,2	28,0	34,8	61	52	51	42	40	43	3,7	3,7	3,4
A	3	65,5	73,2	57,2	49,0	51,0	36,8	66	57	28	47	42	40	3,2	3,5	2,1
A	4	57,6	56,6	72,2	46,5	41,6	44,3	50	52	40	49	46	45	3,0	2,8	2,5
A	5	63,6	69,7	61,7	34,4	42,3	38,3	65	42	37	46	40	42	3,6	2,8	2,6
A	6	63,7	74,5	67,1	53,9	44,8	38,2	74	50	34	47	43	44	3,5	3,1	2,2
A	7	63,1	69,8	61,5	46,2	50,0	30,4	49	41	40	43	46	37	3,0	2,4	3,2
MW		63,1	67,6	63,7	43,4	41,0	36,7	61	51	41	46	43	41	3,4	3,2	2,9
STABW		\pm 4,1	\pm 6,6	\pm 5,4	\pm 10,8	\pm 9,2	\pm 4,3	\pm 9	\pm 8	\pm 10	\pm 3	\pm 3	\pm 3	\pm 0,3	\pm 0,5	\pm 0,7
B	1	57,4	67,8	56,1	30,8	49,6	30,5	57	64	51	46	39	37	4,0	4,6	4,0
B	2	73,5	66,1	41,1	44,0	45,9	20,9	55	62	49	38	41	38	4,1	3,9	3,8
B	3	66,4	68,6	50,5	52,7	49,0	32,2	58	58	32	39	40	46	3,9	3,6	2,1
B	4	66,0	69,6	50,2	48,4	51,1	24,9	53	52	32	44	42	43	0,8	3,5	2,1
B	5	65,0	71,6	52,8	54,4	51,5	39,8	61	53	43	44	43	41	3,8	3,6	3,0
B	6	66,4	68,4	58,0	59,4	48,0	41,4	81	60	50	44	42	40	4,2	3,8	3,8
B	7	62,0	68,6	63,3	47,6	39,2	33,3	52	57	31	43	40	41	3,5	4,1	2,4
MW		65,2	68,7	53,1	48,2	47,8	31,9	60	58	41	43	41	41	3,5	3,9	3,0
STABW		\pm 4,9	\pm 1,7	\pm 7,0	\pm 9,2	\pm 4,2	\pm 7,4	\pm 10	\pm 4	\pm 9	\pm 3	\pm 1	\pm 3	\pm 1,2	\pm 0,4	\pm 0,8
C	1	68,2	60,9	65,6	47,1	38,6	46,0	65	56	43	45	40	37	4,3	4,2	3,4
C	2	70,0	55,9	35,3	56,6	36,2	8,9	64	58	44	44	41	38	4,2	4,2	3,5
C	3	78,1	75,1	59,1	50,0	53,7	38,4	63	58	32	42	41	43	4,0	4,0	2,4
C	4	67,5	62,8	58,0	48,6	44,6	41,0	54	51	36	41	41	44	4,0	3,8	2,8
C	5	75,1	62,3	59,3	59,6	36,2	38,2	65	58	57	40	41	37	4,4	4,0	4,5
C	6	68,1	70,5	71,3	64,8	62,1	34,5	74	51	35	44	40	39	4,3	3,4	2,8
C	7	64,9	66,1	57,9	49,5	42,8	35,8	55	45	46	40	41	38	3,7	3,3	3,7
MW		70,3	64,8	58,1	53,7	44,9	34,7	63	54	42	42	41	39	4,1	3,8	3,3
STABW		\pm 4,6	\pm 6,4	\pm 11,2	\pm 6,7	\pm 9,7	\pm 12,0	\pm 7	\pm 5	\pm 8	\pm 2	\pm 0	\pm 3	\pm 0,2	\pm 0,4	\pm 0,7
D	1	72,6	58,1	49,5	48,7	37,6	10,6	53	43	35	39	40	36	3,6	3,2	2,9
D	2	61,0	51,9	66,7	49,0	39,8	30,4	51	38	17	41	37	55	3,2	2,6	0,9
D	3	62,9	60,1	72,2	43,3	46,5	44,3	45	39	40	41	40	45	3,1	2,8	2,5
MW		65,5	56,7	62,8	47,0	41,3	28,4	49	40	31	40	39	45	3,3	2,8	2,1
STABW		\pm 6,2	\pm 4,3	\pm 11,8	\pm 3,2	\pm 4,7	\pm 16,9	\pm 4	\pm 3	\pm 12	\pm 1	\pm 2	\pm 10	\pm 0,2	\pm 0,3	\pm 1,1
MW gesamt		66,1	65,7	58,9	48,2	44,1	33,7	60	52	40	43	41	41	3,6	3,5	2,9
STABW gesamt		\pm 5,3	\pm 6,3	\pm 9,2	\pm 9,0	\pm 7,8	\pm 9,4	\pm 9	\pm 8	\pm 9	\pm 3	\pm 2	\pm 4	\pm 0,7	\pm 0,6	\pm 0,8

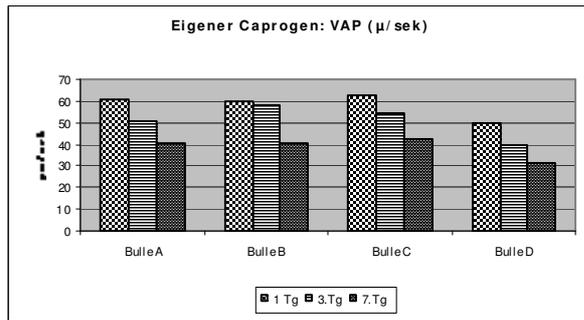
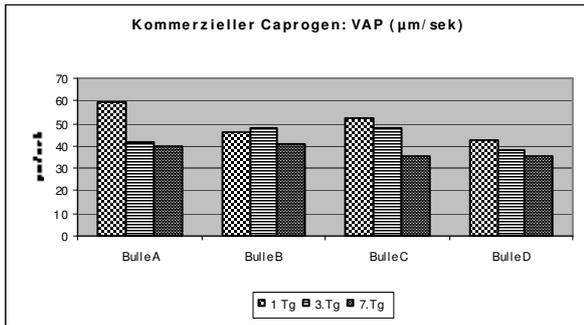


Abb.2: Spermengeschwindigkeiten der einzelnen Bullen

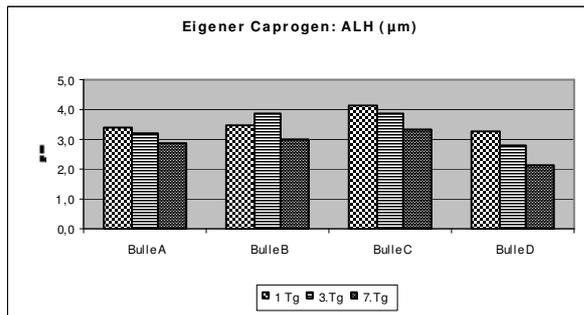
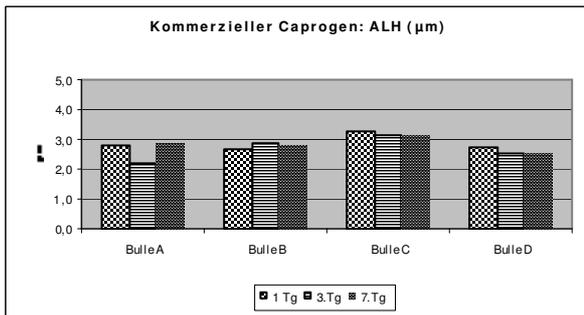


Abb.3: Seitliche Kopfauslenkung von Spermien der einzelnen Bullen

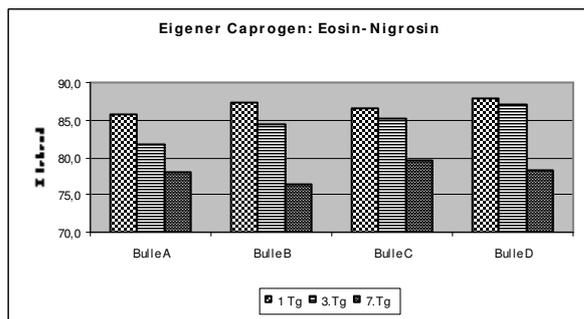
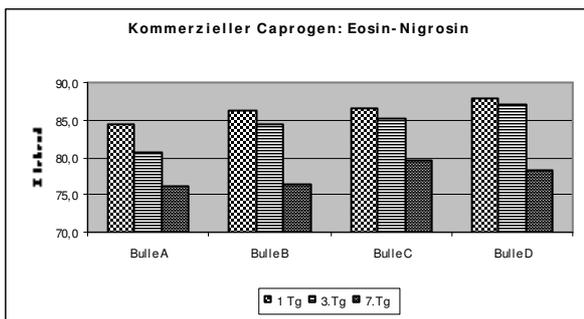


Abb.4: Anteil lebender Spermien in Bezug auf einzelne Bullen

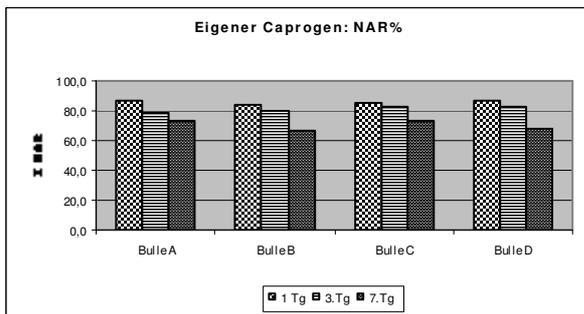
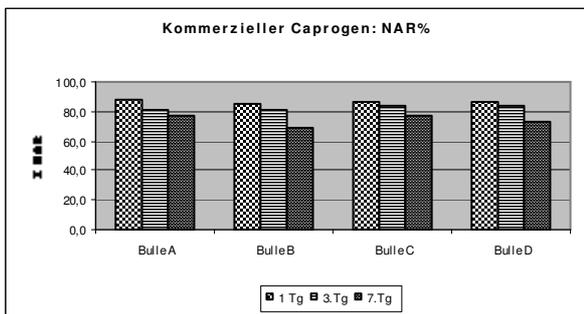


Abb.5: Anteil Spermien mit normaler Akrosomstruktur in Bezug auf einzelne Bullen

Tab. 5.: Ergebnisse des Caprogen-Feldversuches

Bulle	Ej.	Caprogen-Verdüner, kommerziell								
		V%	CMA (Sperm Vision)					Befruchtungsergebnisse		
			% motil	% p. mot.	VAP	Lin	ALH	EB ges.	EB +	% NR
E	1	60	76,5	56,0	64	0,49	3,8	50	36	72,0
E	2	45	51,0	28,6	59	0,44	3,6	33	22	66,7
E	3	55	75,7	48,7	60	0,52	3,3	44	33	75,0
E	5	65	69,2	40,8	59	0,47	3,8	29	20	69,0
E	6	65	65,5	42,4	61	0,52	2,9	42	29	69,0
E	7	65	54,2	34,3	68	0,45	3,7	31	24	77,4
E	8	50	48,9	37,0	77	0,43	3,0	37	26	70,3
MW oder gesamt		58	63,0	41,1	64	0,47	3,5	266	190	71,4
STABW		8	11,6	9,2	7	0,04	0,4			
G	1	35	58,9	25,2	62	0,45	4,1	29	15	51,7
G	2	50	55,0	29,8	58	0,47	3,5	28	16	57,1
G	3	45	54,7	20,3	52	0,42	4,0	33	21	63,6
G	6	55	56,2	31,5	59	0,39	4,3	30	17	56,7
G	7	55	61,5	41,1	64	0,45	3,9	32	24	75,0
G	8	55	52,4	39,7	72	0,43	3,1	31	23	74,2
MW oder gesamt		49	56,5	31,2	61	0,44	3,8	183	116	63,4
STABW		8	3,2	8,1	7	0,03	0,4			
H	1	55	54,8	30,2	65	0,43	3,9	26	23	88,5*
H	2	70	67,2	42,7	60	0,54	3,0	27	20	74,1
H	3	60	64,4	43,8	48	0,53	2,7	33	20	60,6
H	4	60	63,7	34,6	61	0,53	2,7	34	19	55,9
H	5	70	65,8	39,0	58	0,57	2,7	34	26	76,5
H	6	65	69,0	53,9	62	0,55	2,7	23	12	52,2
H	7	65	63,0	45,7	63	0,52	2,7	44	32	72,7
H	8	60	55,9	39,3	74	0,53	2,6	44	25	56,8
MW oder gesamt		63	63,0	41,1	62	0,53	2,9	265	177	66,8
STABW		5	5,1	7,2	7	0,04	0,4			
S	1	65	65,5	33,4	63	0,44	3,9	12	10	83,3
S	2	50	58,2	35,6	59	0,48	2,9	24	22	91,7*
S	3	65	66,4	34,5	57	0,52	3,3	19	12	63,2
S	4	70	58,3	30,6	58	0,48	3,4	26	13	50,0
S	5	75	67,6	32,9	63	0,49	3,9	25	17	68,0
S	6	65	65,5	39,8	65	0,51	3,3	23	17	73,9
S	7	65	69,0	54,0	69	0,51	3,5	25	17	68,0
S	8	65	55,4	39,9	76	0,45	3,1	25	16	64,0
MW oder gesamt		65	63,2	37,6	64	0,49	3,4	179	124	69,3
STABW		7	5,1	7,4	6	0,03	0,4			
MW oder gesamt (ges.)		59	61,7	38,1	63	0,48	3,4	893	607	68,0*
STABW (ges.)		9	7,2	8,4	7	0,05	0,5			

NR-Ergebnisse, die mit * gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant (Chi2-Test)

Tab. 5.: Fortsetzung der Ergebnisse des Feldversuches

Ejakulat		Caprogen-Verdüner, Eigenherstellung									Differenz
Bulle	Ej	V%	CMA (Sperm Vision)					Befruchtungsergebnisse		% NR	
			% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	EB ges.	EB +	% NR	kC - eC
E	1	55	60,0	34,9	64	0,46	4,3	35	23	65,7	6,3
E	2	45	54,7	20,4	49	0,39	4,3	39	27	69,2	-2,6
E	3	60	74,1	52,5	72	0,42	4,9	38	27	71,1	3,9
E	5	65	77,7	54,2	77	0,41	5,2	26	17	65,4	3,6
E	6	65	65,1	43,4	88	0,42	5,6	35	25	71,4	-2,4
E	7	65	59,3	49,9	79	0,42	5,2	27	19	70,4	7,0
E	8	50	70,6	60,9	75	0,39	3,2	25	18	72,0	-1,7
MW oder gesamt		58	65,9	45,2	72	0,42	4,7	225	156	69,3	2,1
STABW		±8	±8,5	±13,7	±12	±0,02	±0,8				
G	1	40	65,6	43,5	63	0,38	4,9	29	18	62,1	-10,3
G	2	50	65,7	30,8	50	0,37	4,5	29	16	55,2	2,0
G	3	50	52,2	28,2	61	0,38	4,8	27	13	48,1	15,5
G	6	55	68,8	53,9	79	0,35	5,6	22	14	63,6	-7,0
G	7	55	57,9	43,1	79	0,36	5,5	30	17	56,7	18,3
G	8	55	56,0	48,5	83	0,41	3,5	28	17	60,7	13,5
MW oder gesamt		51	61,0	41,3	69	0,38	4,8	165	95	57,6	5,8
STABW		±6	±6,6	±10,0	±13	±0,02	±0,8				
H	1	60	59,7	32,0	76	0,49	4,0	42	24	57,1*	31,3
H	2	70	64,0	28,3	54	0,46	4,3	36	24	66,7	7,4
H	3	60	71,5	53,7	66	0,45	4,7	31	20	64,5	-3,9
H	4	60	65,9	41,1	69	0,52	3,4	31	15	48,4	7,5
H	5	70	64,2	42,4	77	0,54	3,5	32	23	71,9	4,6
H	6	65	75,1	59,5	72	0,48	3,7	31	12	38,7	13,5
H	7	65	70,3	57,1	82	0,48	4,2	24	16	66,7	6,1
H	8	60	58,2	47,4	71	0,50	2,9	26	18	69,2	-12,4
MW oder gesamt		64	66,1	45,2	71	0,49	3,8	253	152	60,1	6,7
STABW		±4	±5,9	±11,4	±8	±0,03	±0,6				
S	1	65	60,5	38,6	75	0,47	4,5	27	18	66,7	16,7
S	2	50	73,4	45,3	55	0,44	4,4	20	12	60,0*	31,7
S	3	65	75,8	54,7	62	0,44	4,3	15	12	80,0	-16,8
S	4	70	74,9	58,8	81	0,48	4,5	17	11	64,7	-14,7
S	5	70	73,4	58,4	73	0,43	4,8	20	10	50,0	18,0
S	6	65	72,5	54,8	92	0,47	4,8	17	13	76,5	-2,6
S	7	65	70,6	59,2	88	0,45	4,9	17	12	70,6	-2,6
S	8	65	72,6	60,5	80	0,42	3,4	20	11	55,0	9,0
MW oder gesamt		64	71,7	53,8	76	0,45	4,5	153	99	64,7	4,6
STABW		±6	±4,8	±7,8	±13	±0,02	±0,5				
MW oder gesamt (ges.)		60	66,6	46,7	72	0,44	4,4	796	502	63,1*	4,9
STABW (ges.)		±8	±7,2	±11,3	±11	±0,05	±0,7				

NR-Ergebnisse, die mit * gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant (Chi2-Test)

Abbildungen 6 bis 9 zeigen die beim Feldversuch eingesetzten Ejakulate der einzelnen Bullen in Verbindung mit den erzielten Befruchtungsraten.

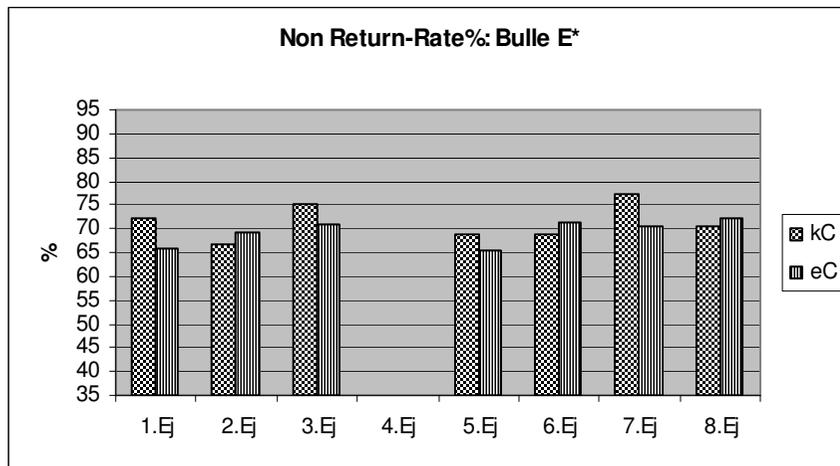


Abb.6: *Ejakulat 4 dieses Bullen wurde nicht verwendet

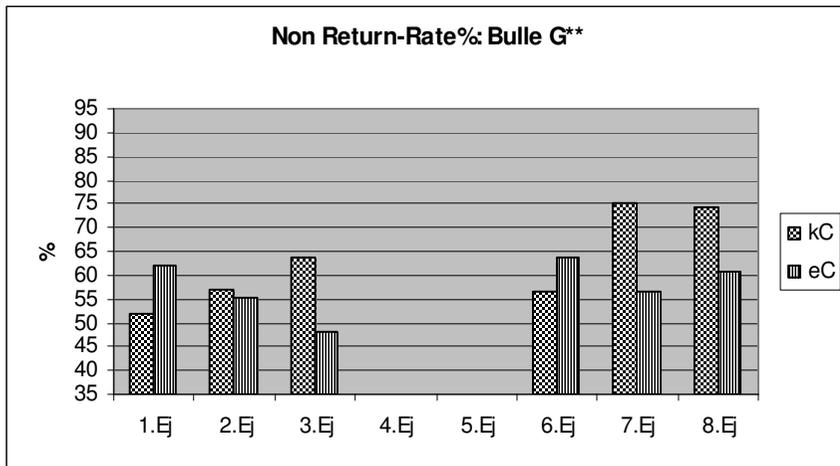


Abb. 7: **Ejakulate 4 und 5 dieses Bullen wurden nicht verwendet

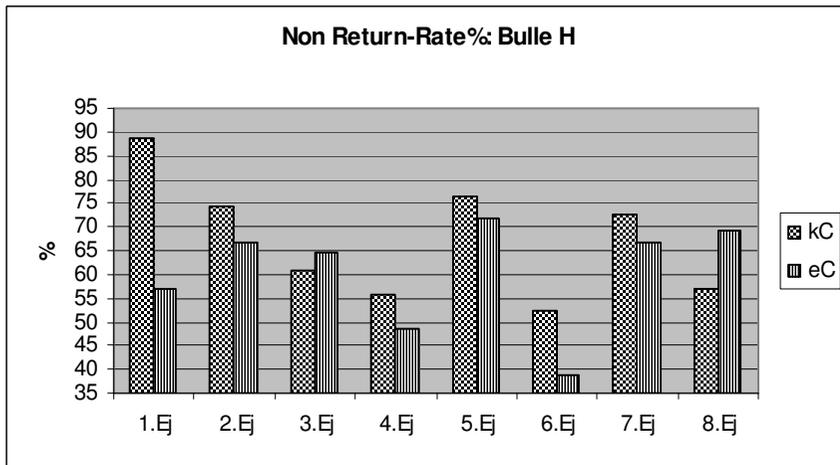


Abb.8

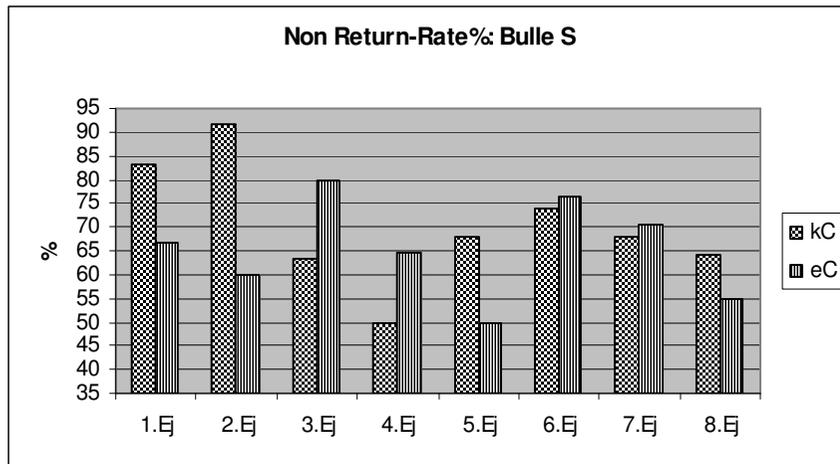


Abb.9

Untersuchungen zum Einsatz von N-Acetylcystein in einem eidotterfreien und einem eidotterhaltigem Tiefgefriererdünnern

Laborversuch: Tabellen 6 bis 19

Tab. 6: Zusatz von N-Acetyl-cystein zu Verdünnern für die Gefrierkonservierung von Bullensperma (4 Bullen, 14 Ejakulate)

Triladyl® mit Eidotter																			
mmol		Spermatologische Teste							Motilitätsanalyse Sperm Vision										
A-Cys	Statistik	V%						NAR %	SYBR % leb.	%mot	% pmot.	VAP	Lin.	ALH	% mot	% pmot.	VAP	Lin.	ALH
		5	35	95	125	MW	35/125			45 min Inkubation					125 min Inkubation				
0	MW	49	42	29	21	35	49,9	61,4	38,4	34,7	24	56	0,45	3,8	26,2	16,9	42	0,42	3,3
	STABW	±5	±5	±6	±7	±5	±15,2	±6,7	±4,6	±7,4	±6,8	±7	±0,03	±0,5	±7,5	±7,5	±7	±0,03	±0,1
4	MW	46	39	29	23	34	59	62,4	35,8	31,8	22,3	60	0,41	4,4	26,5	17	54	0,37	4,2
	STABW	±6	±6	±6	±8	±6	±13,3	±7,1	±2,4	±9,6	±8,4	±7	±0,02	±0,4	±10,7	±9,2	±9	±0,02	±0,8
6	MW	46	40	30	26	36	63,9	62,6	38,4	36,2	24,9	62	0,39	4,4	29,4	18,9	55	0,35	4,6
	STABW	±6	±4	±5	±6	±5	±12,7	±6,8	±5,6	±7,7	±6,6	±4	±0,02	±0,7	±8,5	±7,5	±8	±0,02	±0,5
8	MW	49	41	32	27	37	66,7	63,8	40,9	36,8	25,9	62	0,39	4,5	31,3	21,2	55	0,34	4,9
	STABW	±5	±6	±6	±6	±5	±11,8	±7,5	±6,4	±9,2	±8,6	±4	±0,02	±0,5	±9,3	±8,4	±6	±0,02	±1
10	MW	45	38	29	24	34	60,8	62	36,5	35,6	25	59	0,39	4,3	30,9	20,3	55	0,35	4,5
	STABW	±6	±6	±8	±7	±6	±11,5	±8,6	±4,5	±9,9	±9,1	±5	±0,04	±0,6	±9,5	±8,6	±7	±0,02	±0,5
12	MW	48	40	31	26	36	65	63,2	39,5	39	28,6	59	0,39	4,5	35,3	24,9	57	0,36	4,5
	STABW	±5	±5	±7	±7	±5	±14,8	±6,2	±4,8	±9	±8,8	±4	±0,04	±0,5	±11,1	±9,4	±6	±0,03	±0,5
gesamt	MW	47	40	30	24	35	60,9	62,6	38,3	35,7	25,1	60	0,4	4,3	29,9	19,9	53	0,36	4,3
	STABW	±5	±5	±6	±7	±5	±14	±7	±5	±8,8	±8,1	±5	±0,03	±0,6	±9,7	±8,6	±9	±0,03	±0,8

Tab. 7: Bioxcell® ohne Eidotter

mmol		Spermatologische Teste								Motilitätsanalyse Sperm Vision									
A-Cys	Statistik	V%						NAR %	SYBR % leb.	%mot	% pmot.	VAP	Lin.	ALH	% mot	% pmot.	VAP	Lin.	ALH
		5	35	95	125	MW	35/125			45 min Inkubation					125 min Inkubation				
0	MW	46	40	28	21	34	52,4	66,5	38,4	32,1	27,1	70	0,5	2,8	24,4	18,4	49	0,42	2,3
	STABW	±5	±5	±8	±8	±5	±16,6	±7,5	±5,8	±8	±7,8	±11	±0,03	±0,4	±11,2	±9,6	±18	±0,13	±0,7
4	MW	46	41	31	25	36	61,3	64,4	38,5	39,4	33,7	69	0,47	3,1	34,1	28	63	0,42	2,9
	STABW	±5	±7	±7	±8	±6	±14,3	±8,3	±4,2	±11,1	±10,8	±9	±0,04	±0,6	±12,2	±10,9	±7	±0,02	±0,3
6	MW	47	39	30	25	35	63,1	66	39	36,2	30,6	72	0,46	3,2	34,6	28,7	63	0,4	3,1
	STABW	±6	±6	±5	±7	±5	±13,7	±11,1	±4,9	±9,4	±9	±8	±0,02	±0,3	±15	±14	±9	±0,04	±0,3
8	MW	46	40	30	25	36	61,3	65,1	38,2	37,7	32,1	72	0,44	3,3	33	27,2	61	0,37	3,1
	STABW	±5	±6	±7	±6	±5	±8,8	±9,5	±5,7	±10,5	±11,5	±7	±0,02	±0,4	±9,4	±8,8	±6	±0,03	±0,3
10	MW	46	39	30	23	34	58,5	62,6	38	41,2	35,8	72	0,42	3,2	33,1	27,2	58	0,37	2,9
	STABW	±6	±6	±7	±7	±6	±11	±10,2	±4,2	±15,4	±14,9	±8	±0,03	±0,4	±14,7	±13,9	±9	±0,04	±0,4
12	MW	46	39	30	24	35	62,3	63,5	39,9	40,7	35,3	70	0,41	3,2	33	27,2	57	0,37	2,9
	STABW	±5	±4	±7	±8	±5	±19,2	±7,5	±4,7	±8,3	±7,6	±5	±0,03	±0,3	±10	±9,5	±5	±0,03	±0,3
gesamt	MW	46	39	29	23	35	58,3	65,1	38,7	36,7	31,4	71	0,46	3,1	30,4	24,5	56	0,39	2,8
	STABW	±5	±5	±7	±7	±5	±15	±8,9	±5,1	±10,6	±10,4	±8	±0,04	±0,4	±12,5	±11,7	±13	±0,08	±0,6

Tab.8: Acetyl-cystein, 0 mmol, Triladyl®																			
Bulle	Ej.	V% im Resistenztest bei 37°C						% NAR	% lebend (SY./PI)	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision									
		[Zeitdauer in min]								% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH
		5	35	95	125	MW	35/125	35 min	35 min	Messung nach 45 min					Messung nach 125 min				
B	1	45	40	30	25	35	62,5	73,0	38,0	33,3	22,2	61	0,40	4,4	30,9	17,4	49	0,47	3,3
B	2	55	50	30	20	39	40,0	54,0	42,5	51,8	39,6	66	0,41	4,4	42,2	31,0	43	0,41	3,3
B	3	55	45	35	30	41	66,7	67,5	38,5	38,7	28,1	65	0,43	4,4	30,4	20,6	37	0,42	3,0
B	4	55	50	40	30	44	60,0	56,0	43,5	38,6	27,7	61	0,42	4,2	34,7	27,3	45	0,46	3,2
Mittelwert		53	46	34	26	40	57,3	62,6	40,6	40,6	29,4	63	0,42	4,4	34,5	24,1	43	0,44	3,2
STABW		±5	±5	±5	±5	±4	±11,9	±9,1	±2,8	±7,9	±7,3	±3	±0,01	±0,1	±5,5	±6,2	±5	±0,03	±0,1
E	1	50	45	25	10	33	22,2	57,0	34,5	23,0	15,3	48	0,49	2,8	19,4	10,6	40	0,38	3,2
E	2	45	35	20	15	29	42,9	50,5	33,8	23,9	12,4	47	0,48	3,3	14,1	2,0	25	0,37	3,4
Mittelwert		48	40	23	13	31	32,5	53,8	34,2	23,5	13,9	47	0,49	3,1	16,8	6,3	33	0,38	3,3
STABW		±4	±7	±4	±4	±3	±14,6	±4,6	±0,5	±0,7	±2,0	±1	±0,01	±0,3	±3,8	±6,1	±10	±0,01	±0,1
L	1	50	45	35	30	40	66,7	60,5	32,0	33,2	23,1	59	0,49	3,2	25,6	18,0	49	0,45	3,3
L	2	45	35	25	25	33	71,4	55,0	39,0	34,6	24,8	60	0,49	3,4	31,7	23,2	40	0,40	3,4
L	3	50	45	20	20	34	44,4	66,0	40,0	42,9	32,8	57	0,44	3,9	23,3	13,4	51	0,45	3,3
L	4	45	40	25	15	31	37,5	65,0	42,0	36,0	22,8	62	0,42	4,2	19,4	11,7	45	0,43	3,3
Mittelwert		48	41	26	23	34	55,0	61,6	38,3	36,7	25,9	59	0,46	3,7	25,0	16,6	46	0,43	3,3
STABW		±3	±5	±6	±6	±4	±16,6	±5,0	±4,3	±4,3	±4,7	±2	±0,04	±0,5	±5,2	±5,2	±5	±0,02	±0,1
R	1	45	40	25	15	31	37,5	70,0	46,5	30,5	21,6	51	0,44	3,7	18,7	10,8	36	0,38	3,1
R	2	40	35	30	15	30	42,9	65,0	39,0	29,6	18,7	47	0,46	3,2	24,2	15,7	39	0,39	3,1
R	3	55	45	35	30	41	66,7	64,0	38,0	32,2	22,9	52	0,44	3,5	29,0	20,8	45	0,39	3,6
R	4	45	40	30	15	33	37,5	56,5	30,0	37,2	24,5	52	0,44	3,9	23,1	13,9	43	0,41	3,3
Mittelwert		46	40	30	19	34	46,1	63,9	38,4	32,4	21,9	51	0,45	3,6	23,7	15,3	41	0,39	3,3
STABW		±6	±4	±4	±8	±5	±13,9	±5,6	±6,8	±3,4	±2,4	±2	±0,01	±0,3	±4,3	±4,2	±4	±0,01	±0,2
MW ges		49	42	29	21	35	49,9	61,4	38,4	34,7	24,0	56	0,45	3,8	26,2	16,9	42	0,42	3,3
STABW ges		±5	±5	±6	±7	±5	±15,2	±6,7	±4,6	±7,4	±6,8	±7	±0,03	±0,5	±7,5	±7,5	±7	±0,03	±0,1

Tab. 9: Acetyl-cystein, 0 mmol, Bioxcell®																				
		V% im Resistenztest bei 37 °C						% NAR	% lebend	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision										
Bulle	Ej	[Zeitdauer in min]						35 min	35 min	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	
		5	35	95	125	MW	35/125													Messung nach 45 min
B	1	45	45	30	25	36	55,6	76,5	38,0	42,3	36,9	72	0,51	3,0	32,2	25,1	57	0,48	2,6	
B	2	45	35	35	20	34	57,1	66,0	50,0	45,7	41,9	74	0,51	2,8	30,4	22,8	50	0,42	2,4	
B	3	50	45	30	25	38	55,6	74,0	42,5	30,1	25,1	76	0,48	3,1	25,4	15,7	49	0,42	2,3	
B	4	55	45	35	35	43	77,8	69,0	38,5	36,1	27,9	82	0,50	3,4	35,7	24,6	60	0,48	2,9	
Mittelwert		49	43	33	26	38	61,5	71,4	42,3	38,5	32,9	76	0,50	3,1	30,9	22,0	54	0,45	2,5	
STABW		±5	±5	±3	±6	±4	±10,9	±4,8	±5,5	±6,9	±7,8	±4	±0,01	±0,2	±4,3	±4,3	±5	±0,03	±0,3	
E	1	50	40	15	10	29	25,0	54,5	34,0	18,2	14,6	50	0,42	2,0	5,6	2,2	28	0,46	1,6	
E	2	45	35	15	10	26	28,6	62,0	34,5	28,5	23,0	61	0,51	2,4	1,1	0,0	0	0,00	0,0	
Mittelwert		48	38	15	10	28	26,8	58,3	34,3	23,3	18,8	55	0,47	2,2	3,3	1,1	14	0,23	0,8	
STABW		±4	±4	±0	±0	±2	±2,5	±5,3	±0,4	±7,2	±5,9	±8	±0,06	±0,3	±3,1	±1,5	±19	±0,33	±1,2	
L	1	45	45	45	30	41	66,7	72,5	27,0	30,0	26,7	91	0,53	3,5	29,6	25,5	75	0,52	3,0	
L	2	50	40	20	25	34	62,5	69,0	41,0	37,4	34,4	75	0,52	2,8	33,0	27,3	64	0,50	2,7	
L	3	50	45	25	20	35	44,4	68,0	43,0	36,5	29,4	78	0,53	2,9	40,0	34,0	65	0,49	2,7	
L	4	40	35	25	20	30	57,1	60,0	37,0	27,1	23,5	72	0,54	2,6	21,3	16,6	57	0,48	2,6	
Mittelwert		46	41	29	24	35	57,7	67,4	37,0	32,7	28,5	79	0,53	2,9	31,0	25,8	65	0,50	2,7	
STABW		±5	±5	±11	±5	±5	±9,7	±5,3	±7,1	±5,0	±4,6	±8	±0,01	±0,4	±7,8	±7,2	±7	±0,02	±0,2	
R	1	45	35	25	15	30	42,9	77,0	44,5	39,9	34,8	62	0,52	2,6	26,6	19,0	42	0,35	2,3	
R	2	35	35	25	10	26	28,6	55,0	32,0	18,8	15,3	63	0,49	2,7	13,2	9,5	52	0,42	2,6	
R	3	45	40	35	30	38	75,0	70,0	40,0	29,3	24,5	60	0,48	2,6	27,7	21,8	49	0,40	2,5	
R	4	45	35	25	20	31	57,1	58,0	36,0	29,8	22,3	62	0,49	2,7	20,1	12,9	44	0,39	2,4	
Mittelwert		43	36	28	19	31	50,9	65,0	38,1	29,4	24,2	62	0,50	2,6	21,9	15,8	47	0,39	2,5	
STABW		±5	±3	±5	±9	±5	±19,9	±10,3	±5,4	±8,6	±8,0	±1	±0,02	±0,1	±6,7	±5,6	±5	±0,03	±0,1	
MW ges		46	40	28	21	34	52,4	66,5	38,4	32,1	27,1	70	0,50	2,8	24,4	18,4	49	0,42	2,3	
STABW ges		±5	±5	±8	±8	±5	±16,6	±7,5	±5,8	±8,0	±7,8	±11	±0,03	±0,4	±11,2	±9,6	±18	±0,13	±0,7	

Tab.10: Acetyl-cystein, 4 mmol, Triladyl®																				
		V% im Resistenztest bei 37°C						% NAR	% lebend	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision										
Bulle	Ej	[Zeitdauer in min]							(SY./PI)	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	
		5	35	95	125	MW	35/125	35 min	35 min	Messung nach 45 min					Messung nach 125 min					
B	1	50	40	35	25	38	62,5	71,0	36,0	39,8	31,0	59	0,40	4,3	36,0	23,1	64	0,37	3,0	
B	2	45	45	35	30	39	66,7	68,0	36,5	49,8	37,6	68	0,40	4,9	45,8	34,2	58	0,36	5,0	
B	3	55	45	35	35	43	77,8	72,0	38,5	40,6	27,7	61	0,38	4,8	38,6	24,9	61	0,34	5,3	
B	4	55	45	35	30	41	66,7	56,0	34,5	41,7	30,3	65	0,41	4,9	32,3	23,0	53	0,39	4,4	
Mittelwert		51	44	35	30	40	68,4	66,8	36,4	43,0	31,7	63	0,40	4,7	38,2	26,3	59	0,37	4,4	
STABW		±5	±3	±0	±4	±2	±6,6	±7,4	±1,7	±4,6	±4,2	±4	±0,01	±0,3	±5,7	±5,4	±5	±0,02	±1,0	
E	1	40	35	20	15	28	42,9	63,5	31,5	24,5	15,8	59	0,40	4,4	18,3	11,4	50	0,37	4,1	
E	2	45	35	20	15	29	42,9	49,5	36,0	13,7	6,5	55	0,38	4,7	11,6	4,6	35	0,38	3,5	
Mittelwert		43	35	20	15	28	42,9	56,5	33,8	19,1	11,2	57	0,39	4,5	14,9	8,0	43	0,38	3,8	
STABW		±4	±0	±0	±0	±1	±0,0	±9,9	±3,2	±7,6	±6,6	±3	±0,01	±0,2	±4,8	±4,9	±11	±0,01	±0,4	
L	1	50	50	35	35	43	70,0	67,0	36,5	35,9	27,3	73	0,44	4,7	37,7	28,8	72	0,39	5,1	
L	2	55	35	30	25	36	71,4	60,0	37,5	33,2	24,6	67	0,46	4,4	33,2	23,6	62	0,39	4,8	
L	3	40	30	25	20	29	66,7	62,5	34,0	33,8	22,4	58	0,41	4,2	24,6	14,4	56	0,40	4,2	
L	4	35	30	20	10	24	33,3	51,5	33,5	21,1	13,3	59	0,41	4,3	12,0	5,8	51	0,35	3,9	
Mittelwert		45	36	28	23	33	60,4	60,3	35,4	31,0	21,9	64	0,43	4,4	26,9	18,1	60	0,38	4,5	
STABW		±9	±9	±6	±10	±8	±18,1	±6,5	±1,9	±6,7	±6,1	±7	±0,02	±0,2	±11,3	±10,2	±9	±0,02	±0,5	
R	1	45	40	30	25	35	62,5	69,0	36,5	33,1	24,8	58	0,38	4,5	23,9	15,3	52	0,32	4,5	
R	2	40	35	30	15	30	42,9	66,0	38,5	25,8	16,7	53	0,40	3,9	16,8	8,8	59	0,33	2,8	
R	3	50	40	35	25	38	62,5	56,0	39,5	23,2	15,3	47	0,43	3,6	21,4	10,3	46	0,37	4,0	
R	4	45	35	25	20	31	57,1	62,0	32,0	29,0	18,4	58	0,44	4,3	19,5	10,4	43	0,35	3,7	
Mittelwert		45	38	30	21	33	56,3	63,3	36,6	27,8	18,8	54	0,41	4,1	20,4	11,2	50	0,34	3,7	
STABW		±4	±3	±4	±5	±3	±9,3	±5,6	±3,3	±4,3	±4,2	±5	±0,03	±0,4	±3,0	±2,8	±7	±0,02	±0,7	
MW ges		46	39	29	23	34	59,0	62,4	35,8	31,8	22,3	60	0,41	4,4	26,5	17,0	54	0,37	4,2	
STABW ges		±6	±6	±6	±8	±6	±13,3	±7,1	±2,4	±9,6	±8,4	±7	±0,02	±0,4	±10,7	±9,2	±9	±0,02	±0,8	

Tab.11: Acetyl-cystein, 4 mmol, Bioxcell®																				
		V% im Resistenztest bei 37°C						% NAR	% lebend	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision										
Bulle	Ej	[Zeitdauer in min]						35 min	35 min	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	
		5	35	95	125	MW	35/125			Messung nach 45 min					Messung nach 125 min					
B	1	45	40	30	25	35	62,5	68,5	36,0	47,0	40,7	74	0,47	3,2	42,5	34,4	71	0,45	3,1	
B	2	45	45	35	30	39	66,7	70,0	38,0	49,8	38,2	67	0,40	4,8	43,8	37,5	63	0,42	2,9	
B	3	50	50	40	35	44	70,0	70,5	43,5	56,4	51,1	85	0,46	3,7	47,3	39,6	66	0,41	3,1	
B	4	55	50	45	35	46	70,0	69,0	44,0	55,0	51,1	74	0,49	3,0	49,7	39,5	62	0,42	3,0	
Mittelwert		49	46	38	31	41	67,3	69,5	40,4	52,0	45,3	75	0,46	3,7	45,8	37,7	66	0,43	3,0	
STABW		±5	±5	±6	±5	±5	±3,6	±0,9	±4,0	±4,4	±6,8	±8	±0,04	±0,8	±3,3	±2,4	±4	±0,02	±0,1	
E	1	45	40	20	15	30	37,5	50,0	35,5	20,9	15,3	59	0,45	2,5	13,8	10,5	51	0,40	2,3	
E	2	45	35	20	10	28	28,6	50,0	34,5	32,1	28,3	64	0,52	2,6	13,6	8,2	54	0,40	2,7	
Mittelwert		45	38	20	13	29	33,0	50,0	35,0	26,5	21,8	62	0,49	2,5	13,7	9,4	52	0,40	2,5	
STABW		±0	±4	±0	±4	±2	±6,3	±0,0	±0,7	±7,9	±9,3	±3	±0,05	±0,1	±0,2	±1,6	±2	±0,00	±0,3	
L	1	50	50	35	35	43	70,0	73,0	31,5	32,7	29,1	89	0,49	3,7	49,1	42,9	78	0,46	3,4	
L	2	55	45	30	30	40	66,7	60,0	40,0	48,6	42,6	71	0,50	3,0	39,9	33,0	70	0,44	3,1	
L	3	45	45	25	20	34	44,4	70,0	40,0	40,3	36,7	68	0,50	3,3	32,5	27,8	65	0,45	2,9	
L	4	40	30	25	20	29	66,7	57,5	37,0	29,2	24,6	73	0,53	2,7	22,7	18,2	62	0,45	2,7	
Mittelwert		48	43	29	26	36	61,9	65,1	37,1	37,7	33,2	75	0,51	3,2	36,0	30,5	69	0,45	3,0	
STABW		±6	±9	±5	±8	±6	±11,8	±7,5	±4,0	±8,6	±8,0	±10	±0,02	±0,4	±11,2	±10,3	±7	±0,01	±0,3	
R	1	45	35	30	25	34	71,4	77,5	38,0	45,1	37,6	62	0,44	3,0	36,4	30,1	59	0,39	3,2	
R	2	40	35	35	25	34	71,4	59,0	41,5	36,5	31,9	66	0,47	2,8	29,4	25,5	65	0,42	3,0	
R	3	45	40	35	30	38	75,0	64,0	46,0	27,6	22,1	56	0,44	2,5	31,8	27,0	62	0,43	2,9	
R	4	45	35	25	20	31	57,1	62,0	33,5	30,0	22,4	63	0,43	2,9	24,6	18,5	57	0,38	2,7	
Mittelwert		44	36	31	25	34	68,8	65,6	39,8	34,8	28,5	62	0,45	2,8	30,6	25,3	61	0,41	3,0	
STABW		±3	±3	±5	±4	±3	±7,9	±8,2	±5,3	±7,8	±7,6	±4	±0,02	±0,2	±4,9	±4,9	±3	±0,02	±0,2	
MW ges		46	41	31	25	36	61,3	64,4	38,5	39,4	33,7	69	0,47	3,1	34,1	28,0	63	0,42	2,9	
STABW ges		±5	±7	±7	±8	±6	±14,3	±8,3	±4,2	±11,1	±10,8	±9	±0,04	±0,6	±12,2	±10,9	±7	±0,02	±0,3	

Tab.12: Acetyl-cystein, 6 mmol, Triladyl®																				
		V% im Resistenztest bei 37°C						% NAR	% lebend	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision										
Bulle	Ej	[Zeitdauer in min]						35 min	35 min	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	
		5	35	95	125	MW	35/125			Messung nach 45 min					Messung nach 125 min					
B	1	45	40	30	30	36	75,0	72,0	36,0	46,8	31,6	66	0,40	3,3	37,0	25,3	60	0,35	4,9	
B	2	50	45	30	35	40	77,8	70,0	39,5	38,5	29,5	72	0,40	5,0	37,1	28,2	62	0,34	5,3	
B	3	55	45	35	30	41	66,7	60,0	39,5	42,7	27,7	64	0,36	5,3	33,1	22,7	55	0,36	4,9	
B	4	55	45	40	30	43	66,7	61,5	35,0	45,5	32,6	61	0,39	4,9	41,3	28,8	59	0,36	4,9	
Mittelwert		51	44	34	31	40	71,5	65,9	37,5	43,4	30,3	66	0,39	4,6	37,1	26,2	59	0,35	5,0	
STABW		±5	±3	±5	±3	±3	±5,7	±6,0	±2,3	±3,7	±2,2	±4	±0,02	±0,9	±3,3	±2,8	±3	±0,01	±0,2	
E	1	50	40	20	15	31	37,5	62,5	30,0	26,7	16,9	56	0,40	3,9	21,0	11,6	50	0,37	4,0	
E	2	±45	±35	±25	±15	±30	±42,9	±54,0	±38,0	±23,7	±13,5	±64	±0,37	±3,0	±12,7	±4,2	±35	±0,37	±3,2	
Mittelwert		48	38	23	15	31	40,2	58,3	34,0	25,2	15,2	60	0,39	3,5	16,8	7,9	43	0,37	3,6	
STABW		±4	±4	±4	±0	±1	±3,8	±6,0	±5,7	±2,1	±2,4	±5	±0,02	±0,7	±5,8	±5,2	±10	±0,00	±0,6	
L	1	45	40	30	30	36	75,0	75,0	40,0	33,9	25,7	66	0,40	4,7	27,2	18,2	64	0,34	5,0	
L	2	50	40	30	25	36	62,5	58,0	39,0	36,3	25,6	61	0,42	4,6	30,4	19,8	58	0,35	4,9	
L	3	35	35	25	20	29	57,1	63,5	32,0	28,9	19,9	59	0,39	4,5	21,7	12,5	59	0,35	4,6	
L	4	35	30	25	20	28	66,7	50,0	39,0	24,4	14,2	61	0,40	4,4	17,4	8,7	48	0,34	4,2	
Mittelwert		41	36	28	24	32	65,3	61,6	37,5	30,9	21,3	62	0,40	4,6	24,1	14,8	57	0,35	4,7	
STABW		±8	±5	±3	±5	±5	±7,5	±10,5	±3,7	±5,3	±5,5	±3	±0,01	±0,1	±5,8	±5,1	±6	±0,01	±0,4	
R	1	45	40	30	30	36	75,0	66,0	50,0	43,6	33,5	59	0,37	4,8	33,9	22,8	49	0,32	4,2	
R	2	45	40	35	30	38	75,0	65,0	48,5	39,9	27,4	57	0,40	4,3	36,3	25,1	57	0,36	4,6	
R	3	50	45	35	30	40	66,7	61,5	39,0	35,3	23,0	59	0,41	4,4	34,9	21,7	57	0,34	4,8	
R	4	45	40	30	20	34	50,0	57,5	32,5	40,4	28,0	67	0,39	5,0	28,1	15,4	63	0,38	5,0	
Mittelwert		46	41	33	28	37	66,7	62,5	42,5	39,8	28,0	61	0,39	4,6	33,3	21,3	57	0,35	4,6	
STABW		±3	±3	±3	±5	±3	±11,8	±3,9	±8,3	±3,4	±4,3	±4	±0,02	±0,3	±3,6	±4,1	±6	±0,03	±0,3	
MW ges		46	40	30	26	36	63,9	62,6	38,4	36,2	24,9	62	0,39	4,4	29,4	18,9	55	0,35	4,6	
STABW ges		±6	±4	±5	±6	±5	±12,7	±6,8	±5,6	±7,7	±6,6	±4	±0,02	±0,7	±8,5	±7,5	±8	±0,02	±0,5	

Tab.13: Acetyl-cystein, 6 mmol, Bioxcell®																				
Bulle	Ej	V% im Resistenztest bei 37°C						%	%	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision										
		[Zeitdauer in min]						NAR	lebend	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	
		5	35	95	125	MW	35/125	35 min	35 min	Messung nach 45 min						Messung nach 125 min				
B	1	50	45	30	30	39	66,7	74,0	36,0	50,9	43,5	81	0,46	3,6	49,5	41,1	69	0,42	3,3	
B	2	50	45	35	30	40	66,7	71,5	38,0	44,2	40,0	80	0,47	3,3	48,4	42,8	64	0,43	3,0	
B	3	55	45	35	35	43	77,8	74,0	49,0	49,8	43,0	81	0,43	3,7	51,9	43,7	67	0,41	3,2	
B	4	55	50	40	35	45	70,0	78,0	45,0	44,4	37,8	72	0,47	3,2	62,5	54,3	74	0,42	3,5	
Mittelwert		53	46	35	33	42	70,3	74,4	42,0	47,3	41,1	78	0,46	3,5	53,1	45,5	69	0,42	3,3	
STABW		±3	±3	±4	±3	±3	±5,2	±2,7	±6,1	±3,5	±2,7	±4	±0,02	±0,2	±6,5	±6,0	±4	±0,01	±0,2	
E	1	50	35	25	15	31	42,9	51,0	32,0	21,6	17,0	59	0,46	2,4	14,4	11,1	53	0,45	2,5	
E	2	45	35	30	15	31	42,9	60,5	36,5	27,2	23,3	76	0,45	3,4	16,5	10,8	48	0,40	2,7	
Mittelwert		48	35	28	15	31	42,9	55,8	34,3	24,4	20,1	68	0,46	2,9	15,4	11,0	51	0,43	2,6	
STABW		±4	±0	±4	±0	±0	±0,0	±6,7	±3,2	±3,9	±4,5	±12	±0,01	±0,7	±1,5	±0,2	±3	±0,04	±0,1	
L	1	45	35	25	20	31	57,1	72,0	37,0	35,2	32,0	83	0,48	3,5	27,6	23,4	73	0,41	3,3	
L	2	50	40	30	30	38	75,0	57,0	44,0	40,4	33,7	74	0,47	3,2	44,7	39,5	74	0,41	3,3	
L	3	45	40	30	30	36	75,0	62,5	42,0	41,1	34,8	72	0,46	3,2	36,8	31,5	69	0,40	3,2	
L	4	35	30	30	25	30	83,3	46,0	40,0	27,6	22,8	70	0,50	2,8	25,6	20,2	61	0,45	2,7	
Mittelwert		44	36	29	26	34	72,6	59,4	40,8	36,1	30,8	75	0,48	3,2	33,6	28,6	69	0,42	3,1	
STABW		±6	±5	±3	±5	±4	±11,0	±10,9	±3,0	±6,3	±5,5	±5	±0,02	±0,3	±8,8	±8,7	±6	±0,02	±0,3	
R	1	40	30	25	20	29	66,7	79,0	37,5	29,3	22,3	67	0,44	3,3	29,9	20,7	62	0,34	3,3	
R	2	40	40	30	20	33	50,0	77,0	38,0	33,1	28,3	71	0,44	3,2	31,0	27,3	66	0,37	3,3	
R	3	50	45	35	30	40	66,7	70,0	39,5	38,2	32,7	63	0,43	2,8	31,8	26,8	56	0,39	2,8	
R	4	45	35	25	15	30	42,9	51,5	31,0	23,8	17,1	62	0,41	3,1	14,1	9,0	49	0,32	2,8	
Mittelwert		44	38	29	21	33	56,5	69,4	36,5	31,1	25,1	66	0,43	3,1	26,7	20,9	58	0,36	3,0	
STABW		±5	±6	±5	±6	±5	±12,0	±12,5	±3,8	±6,1	±6,8	±4	±0,01	±0,2	±8,4	±8,5	±7	±0,03	±0,3	
MW ges		47	39	30	25	35	63,1	66,0	39,0	36,2	30,6	72	0,46	3,2	34,6	28,7	63	0,40	3,1	
STABW ges		±6	±6	±5	±7	±5	±13,7	±11,1	±4,9	±9,4	±9,0	±8	±0,02	±0,3	±15,0	±14,0	±9	±0,04	±0,3	

Tab.14: Acetyl-cystein, 8 mmol, Triladyl®

Bulle	Ej	V% im Resistenztest bei 37 °C						% NAR	% lebend	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision									
		[Zeitdauer in min]						35 min	35 min	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH
		5	35	95	125	MW	35/125			Messung nach 45 min					Messung nach 125 min				
B	1	50	45	35	30	40	66,7	78,0	36,0	43,8	32,0	64	0,37	3,2	35,4	27,4	58	0,33	5,1
B	2	50	45	40	35	43	77,8	62,0	40,0	46,1	34,8	63	0,37	4,9	45,7	34,0	58	0,34	5,3
B	3	55	50	40	35	45	70,0	67,0	46,0	46,4	33,3	63	0,37	5,0	42,5	31,0	58	0,33	5,2
B	4	55	50	40	30	44	60,0	65,0	38,0	49,1	38,2	66	0,38	5,1	44,8	32,0	58	0,36	5,0
Mittelwert		53	48	39	33	43	68,6	68,0	40,0	46,4	34,5	64	0,37	4,5	42,1	31,1	58	0,34	5,1
STABW		±3	±3	±3	±3	±2	±7,4	±7,0	±4,3	±2,2	±2,7	±2	±0,01	±0,9	±4,7	±2,8	±0	±0,01	±0,1
E	1	50	35	25	20	33	57,1	65,0	36,0	32,5	22,5	70	0,41	4,2	21,5	12,3	52	0,34	4,0
E	2	50	40	25	15	33	37,5	50,0	49,5	25,1	14,0	54	0,39	4,5	20,3	8,5	39	0,35	3,5
Mittelwert		50	38	25	18	33	47,3	57,5	42,8	28,8	18,2	62	0,40	4,3	20,9	10,4	45	0,35	3,7
STABW		±0	±4	±0	±4	±0	±13,9	±10,6	±9,5	±5,3	±6,0	±11	±0,01	±0,1	±0,8	±2,6	±9	±0,01	±0,4
L	1	45	35	30	25	34	71,4	66,5	39,5	30,4	20,6	63	0,39	4,7	27,2	19,5	61	0,34	7,8
L	2	55	40	30	30	39	75,0	60,5	40,0	35,4	23,9	66	0,42	4,7	34,8	25,9	62	0,37	5,2
L	3	45	35	25	20	31	57,1	66,0	33,0	21,1	11,0	62	0,38	4,7	22,0	11,7	52	0,31	4,1
L	4	40	30	25	25	30	83,3	52,0	40,0	23,4	14,6	62	0,39	4,6	22,1	13,4	57	0,35	4,6
Mittelwert		46	35	28	25	33	71,7	61,3	38,1	27,6	17,5	63	0,40	4,7	26,5	17,6	58	0,34	5,4
STABW		±6	±4	±3	±4	±4	±10,9	±6,7	±3,4	±6,5	±5,8	±2	±0,02	±0,1	±6,0	±6,4	±5	±0,02	±1,7
R	1	45	40	30	30	36	75,0	75,5	51,0	44,3	34,7	62	0,37	4,8	39,7	24,8	53	0,33	4,6
R	2	45	40	35	25	36	62,5	60,0	52,0	40,4	30,0	60	0,45	3,8	23,4	18,0	55	0,33	4,5
R	3	50	45	40	35	43	77,8	63,5	39,5	40,6	29,1	57	0,40	4,5	33,3	23,9	59	0,32	5,1
R	4	45	40	30	25	35	62,5	61,5	32,0	36,5	24,5	61	0,41	4,4	25,4	14,4	50	0,35	4,3
Mittelwert		46	41	34	29	38	69,4	65,1	43,6	40,4	29,6	60	0,41	4,4	30,4	20,3	54	0,33	4,7
STABW		±3	±3	±5	±5	±3	±8,1	±7,1	±9,6	±3,2	±4,2	±2	±0,03	±0,4	±7,5	±5,0	±4	±0,01	±0,3
MW ges		49	41	32	27	37	66,7	63,8	40,9	36,8	25,9	62	0,39	4,5	31,3	21,2	55	0,34	4,9
STABW ges		±5	±6	±6	±6	±5	±11,8	±7,5	±6,4	±9,2	±8,6	±4	±0,02	±0,5	±9,3	±8,4	±6	±0,02	±1,0

Tab.15: Acetyl-cystein, 8 mmol, Bioxcell®

		V% im Resistenztest bei 37 °C						% NAR	% lebend	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision									
Bulle	Ej	[Zeitdauer in min]						(SY./PI)	% motil	% p. mot.	VA P	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	
		5	35	95	125	M W	35/125												35 min
B	1	50	40	35	25	38	62,5	78,0	36,0	37,5	34,0	72	0,45	3,3	43,6	34,4	67	0,39	3,3
B	2	40	45	30	30	36	66,7	64,5	38,0	32,7	26,1	67	0,45	3,1	30,0	24,8	59	0,39	3,0
B	3	55	50	40	35	45	70,0	76,0	45,0	60,0	57,3	81	0,43	3,5	40,7	37,0	60	0,38	2,8
B	4	55	50	40	30	44	60,0	70,0	49,5	54,2	47,5	76	0,45	3,4	54,1	46,8	67	0,41	3,3
Mittelwert		50	46	36	30	41	64,8	72,1	42,1	46,1	41,2	74	0,45	3,3	42,1	35,8	63	0,39	3,1
STABW		±7	±5	±5	±4	±4	±4,4	±6,1	±6,3	±13,1	±13,9	±6	±0,01	±0,2	±9,9	±9,0	±4	±0,01	±0,3
E	1	45	35	25	20	31	57,1	52,5	32,0	21,8	12,0	63	0,40	4,4	18,3	12,8	51	0,35	2,3
E	2	45	40	25	20	33	50,0	59,5	35,0	33,7	28,1	67	0,41	2,9	25,2	20,2	55	0,32	2,9
Mittelwert		45	38	25	20	32	53,6	56,0	33,5	27,8	20,1	65	0,41	3,7	21,7	16,5	53	0,34	2,6
STABW		±0	±4	±0	±0	±1	±5,1	±4,9	±2,1	±8,4	±11,4	±3	±0,01	±1,0	±4,9	±5,2	±3	±0,02	±0,4
L	1	45	30	25	15	29	50,0	66,0	31,0	31,3	27,5	87	0,47	3,7	32,4	28,5	73	0,40	3,6
L	2	50	35	25	20	33	57,1	57,0	38,0	28,0	22,1	69	0,45	3,1	25,0	20,3	63	0,40	3,3
L	3	45	40	20	20	31	50,0	71,0	33,0	33,9	29,0	77	0,47	3,3	28,6	23,3	69	0,40	3,2
L	4	40	35	25	20	30	57,1	50,0	36,5	27,2	21,6	65	0,47	2,7	26,2	19,8	59	0,40	3,0
Mittelwert		45	35	24	19	31	53,6	61,0	34,6	30,1	25,0	74	0,47	3,2	28,1	23,0	66	0,40	3,3
STABW		±4	±4	±3	±3	±2	±4,1	±9,3	±3,2	±3,1	±3,7	±10	±0,01	±0,4	±3,2	±4,0	±6	±0,00	±0,2
R	1	40	40	30	25	34	62,5	78,5	45,5	42,8	37,6	79	0,42	3,6	32,8	26,6	57	0,33	3,2
R	2	45	40	35	25	36	62,5	70,0	43,5	47,3	42,4	69	0,44	3,1	37,6	31,7	60	0,35	3,2
R	3	50	45	40	35	43	77,8	66,0	38,5	37,9	33,1	63	0,42	2,8	40,7	33,0	58	0,36	2,9
R	4	45	40	30	30	36	75,0	53,0	33,0	39,9	31,5	72	0,43	3,4	27,1	21,2	58	0,33	3,0
Mittelwert		45	41	34	29	37	69,4	66,9	40,1	42,0	36,1	71	0,43	3,2	34,6	28,1	58	0,34	3,1
STABW		±4	±3	±5	±5	±4	±8,1	±10,6	±5,6	±4,1	±4,9	±7	±0,01	±0,4	±5,9	±5,4	±1	±0,02	±0,1
MW ges		46	40	30	25	36	61,3	65,1	38,2	37,7	32,1	72	0,44	3,3	33,0	27,2	61	0,37	3,1
STABW ges		±5	±6	±7	±6	±5	±8,8	±9,5	±5,7	±10,5	±11,5	±7	±0,02	±0,4	±9,4	±8,8	±6	±0,03	±0,3

Tab.16: Acetyl-cystein, 10 mmol, Triladyl®

Bulle	Ej	V% im Resistenztest bei 37 °C						% NAR	% lebend	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision									
		[Zeitdauer in min]						35 min	35 min	% motil	% p. mot.	VA P	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Lineari tät	ALH
		5	35	95	125	MW	35/125			Messung nach 45 min					Messung nach 125 min				
B	1	50	40	30	20	35	50,0	73,5	34,0	46,2	35,1	62	0,40	4,5	34,4	23,7	57	0,35	4,8
B	2	50	45	35	35	41	77,8	66,0	40,0	53,3	43,8	64	0,37	4,8	46,3	34,7	71	0,37	3,2
B	3	50	45	40	35	43	77,8	66,0	38,0	43,9	31,4	61	0,34	5,4	46,8	34,7	59	0,34	5,0
B	4	55	50	40	35	45	70,0	65,5	34,0	51,8	36,6	59	0,40	4,5	40,2	26,4	57	0,37	4,7
Mittelwert		51	45	36	31	41	68,9	67,8	36,5	48,8	36,7	62	0,38	4,8	41,9	29,8	61	0,36	4,4
STABW		±3	±4	±5	±8	±4	±13,1	±3,8	±3,0	±4,5	±5,2	±2	±0,03	±0,4	±5,8	±5,7	±7	±0,02	±0,8
E	1	45	30	20	15	28	50,0	53,0	30,0	25,2	12,6	61	0,37	2,6	20,6	12,3	55	0,34	4,9
E	2	50	40	30	20	35	50,0	49,0	38,0	30,1	20,5	59	0,41	4,5	20,6	10,4	47	0,35	4,1
Mittelwert		48	35	25	18	31	50,0	51,0	34,0	27,6	16,5	60	0,39	3,6	20,6	11,4	51	0,35	4,5
STABW		±4	±7	±7	±4	±5	±0,0	±2,8	±5,7	±3,5	±5,6	±1	±0,03	±1,3	±0,1	±1,4	±5	±0,01	±0,6
L	1	40	35	30	25	33	71,4	70,5	30,0	29,2	19,9	64	0,37	4,9	24,8	18,6	56	0,35	4,9
L	2	45	40	30	25	35	62,5	50,0	43,0	38,2	30,8	64	0,48	4,3	42,1	32,3	65	0,37	5,4
L	3	45	30	15	15	26	50,0	70,0	36,0	29,1	18,2	56	0,37	4,3	19,7	11,8	50	0,36	4,3
L	4	40	35	30	20	31	57,1	48,0	42,0	26,6	17,3	65	0,40	4,6	22,9	13,0	55	0,36	4,5
Mittelwert		43	35	26	21	31	60,3	59,6	37,8	30,8	21,6	63	0,41	4,5	27,4	18,9	56	0,36	4,8
STABW		±3	±4	±8	±5	±4	±9,0	±12,3	±6,0	±5,1	±6,3	±4	±0,05	±0,3	±10,0	±9,4	±6	±0,01	±0,5
R	1	35	35	15	15	25	42,9	64,0	36,0	25,7	17,7	52	0,36	4,4	29,3	15,3	47	0,34	4,2
R	2	35	35	25	20	29	57,1	60,0	44,0	35,9	23,3	54	0,43	3,9	26,6	15,2	51	0,31	4,4
R	3	50	40	30	25	36	62,5	65,0	33,0	37,4	24,5	53	0,39	4,2	29,1	18,8	54	0,38	4,6
R	4	45	35	30	25	34	71,4	68,0	33,5	25,2	18,2	52	0,43	3,8	29,0	16,5	51	0,34	4,5
Mittelwert		41	36	25	21	31	58,5	64,3	36,6	31,1	20,9	53	0,40	4,1	28,5	16,5	51	0,34	4,4
STABW		±8	±3	±7	±5	±5	±12,0	±3,3	±5,1	±6,5	±3,5	±1	±0,03	±0,3	±1,3	±1,6	±3	±0,03	±0,1
MW ges		45	38	29	24	34	60,8	62,0	36,5	35,6	25,0	59	0,39	4,3	30,9	20,3	55	0,35	4,5
STABW ges		±6	±6	±8	±7	±6	±11,5	±8,6	±4,5	±9,9	±9,1	±5	±0,04	±0,6	±9,5	±8,6	±7	±0,02	±0,5

Tab.17: Acetyl-cystein, 10 mmol, Bioxcell®																				
		V% im Resistenztest bei 37°C						% NAR	% lebend	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision										
Bulle	Ej	[Zeitdauer in min]						35 min	35 min	(SY./PI)	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH
		5	35	95	125	MW	35/125													
B	1	50	40	30	25	36	62,5	68,0	32,0	39,4	33,2	72	0,43	3,1	44,1	35,9	62	0,41	3,2	
B	2	50	45	40	35	43	77,8	67,0	41,5	59,5	56,1	77	0,41	3,6	50,3	44,9	65	0,39	3,0	
B	3	55	50	40	35	45	70,0	77,0	47,5	71,9	67,0	77	0,41	3,4	52,1	48,1	62	0,40	2,8	
B	4	55	50	45	35	46	70,0	74,5	41,0	63,3	54,4	81	0,42	3,7	60,8	51,4	68	0,39	3,4	
Mittelwert		53	46	39	33	43	70,1	71,6	40,5	58,5	52,7	77	0,42	3,5	51,8	45,1	64	0,40	3,1	
STABW		±3	±5	±6	±5	±4	±6,2	±4,9	±6,4	±13,8	±14,1	±3	±0,01	±0,2	±6,9	±6,7	±3	±0,01	±0,3	
E	1	45	35	20	15	29	42,9	52,0	32,5	22,2	15,7	56	0,42	2,2	12,5	10,1	51	0,34	2,3	
E	2	45	40	25	20	33	50,0	50,5	40,0	30,8	26,7	69	0,40	3,2	20,6	15,3	57	0,33	3,0	
Mittelwert		45	38	23	18	31	46,4	51,3	36,3	26,5	21,2	63	0,41	2,7	16,5	12,7	54	0,34	2,6	
STABW		±0	±4	±4	±4	±3	±5,1	±1,1	±5,3	±6,1	±7,7	±9	±0,01	±0,7	±5,7	±3,7	±4	±0,01	±0,5	
L	1	50	35	30	20	34	57,1	71,0	36,0	34,3	29,9	86	0,46	3,6	32,3	27,3	68	0,40	3,4	
L	2	45	40	30	15	33	37,5	55,0	36,0	41,0	35,9	76	0,49	3,1	38,0	31,8	68	0,43	3,0	
L	3	45	35	20	20	30	57,1	70,0	40,0	43,3	35,9	69	0,43	3,1	34,0	28,1	60	0,38	3,0	
L	4	40	35	30	20	31	57,1	46,0	40,0	25,5	22,5	64	0,42	2,8	20,3	14,6	51	0,32	2,7	
Mittelwert		45	36	28	19	32	52,2	60,5	38,0	36,0	31,0	74	0,45	3,1	31,2	25,4	62	0,38	3,0	
STABW		±4	±3	±5	±3	±2	±9,8	±12,1	±2,3	±8,0	±6,3	±9	±0,03	±0,3	±7,6	±7,5	±8	±0,05	±0,3	
R	1	35	30	25	15	26	50,0	70,0	37,5	43,9	38,3	74	0,43	3,4	21,8	13,4	35	0,33	2,0	
R	2	40	35	30	20	31	57,1	68,0	40,0	41,6	35,7	69	0,43	3,0	34,4	28,5	52	0,35	2,8	
R	3	45	30	25	20	30	66,7	55,0	34,5	18,1	14,4	63	0,40	2,9	15,3	10,6	61	0,34	3,0	
R	4	45	40	30	25	35	62,5	52,5	33,5	42,6	35,7	70	0,39	3,5	27,4	21,5	51	0,32	2,7	
Mittelwert		41	34	28	20	31	59,1	61,4	36,4	36,5	31,0	69	0,41	3,2	24,7	18,5	50	0,34	2,6	
STABW		±5	±5	±3	±4	±4	±7,2	±8,9	±3,0	±12,3	±11,1	±5	±0,02	±0,3	±8,1	±8,1	±11	±0,01	±0,4	
MW ges		46	39	30	23	34	58,5	62,6	38,0	41,2	35,8	72	0,42	3,2	33,1	27,2	58	0,37	2,9	
STABW ges		±6	±6	±7	±7	±6	±11,0	±10,2	±4,2	±15,4	±14,9	±8	±0,03	±0,4	±14,7	±13,9	±9	±0,04	±0,4	

Tab.18: Acetyl-cystein, 12 mmol, Triladyl®																				
Bulle	Ej	V% im Resistenztest bei 37°C						% NAR	% lebend	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision										
		[Zeitdauer in min]						35 min	(SY./PI)	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	
		5	35	95	125	MW	35/125			Messung nach 45 min					Messung nach 125 min					
B	1	50	45	30	25	38	55,6	68,0	41,0	46,5	37,5	60	0,39	4,7	34,1	25,4	56	0,39	4,3	
B	2	50	40	40	40	43	100,0	69,0	43,5	49,1	40,0	61	0,38	4,7	53,4	41,7	65	0,37	2,9	
B	3	50	45	45	35	44	77,8	66,5	44,0	49,7	38,9	61	0,36	5,1	52,5	37,7	56	0,36	4,8	
B	4	55	50	40	35	45	70,0	65,5	35,0	54,6	43,2	63	0,38	4,9	53,4	41,3	58	0,40	4,6	
Mittelwert		51	45	39	34	42	75,8	67,3	40,9	50,0	39,9	61	0,38	4,8	48,3	36,5	59	0,38	4,2	
STABW		±3	±4	±6	±6	±3	±18,6	±1,6	±4,1	±3,4	±2,4	±1	±0,01	±0,2	±9,5	±7,6	±4	±0,02	±0,9	
E	1	50	30	20	20	30	66,7	53,0	32,0	27,7	16,3	53	0,42	4,0	25,6	15,8	53	0,36	4,3	
E	2	45	40	30	20	34	50,0	50,0	40,5	33,3	21,4	56	0,42	4,5	25,3	16,5	54	0,38	4,6	
Mittelwert		48	35	25	20	32	58,3	51,5	36,3	30,5	18,9	55	0,42	4,2	25,4	16,2	54	0,37	4,5	
STABW		±4	±7	±7	±0	±3	±11,8	±2,1	±6,0	±4,0	±3,6	±2	±0,00	±0,3	±0,2	±0,5	±1	±0,01	±0,2	
L	1	50	40	35	30	39	75,0	57,5	41,0	34,8	25,8	64	0,37	5,1	31,3	21,5	68	0,38	5,1	
L	2	45	40	25	20	33	50,0	61,0	40,0	45,0	34,1	65	0,46	4,4	38,4	27,7	58	0,39	4,7	
L	3	45	35	30	25	34	71,4	60,0	38,0	28,2	17,8	61	0,42	4,3	24,5	17,2	59	0,34	4,8	
L	4	45	35	20	20	30	57,1	67,0	33,5	29,3	21,5	63	0,35	5,0	21,2	14,7	56	0,34	4,8	
Mittelwert		46	38	28	24	34	63,4	61,4	38,1	34,4	24,8	63	0,40	4,7	28,8	20,3	60	0,36	4,9	
STABW		±3	±3	±6	±5	±4	±11,8	±4,0	±3,3	±7,7	±7,0	±2	±0,05	±0,4	±7,6	±5,7	±5	±0,03	±0,2	
R	1	35	35	30	15	29	42,9	69,0	42,0	37,5	26,0	57	0,32	3,2	25,6	15,7	45	0,32	4,1	
R	2	45	40	30	25	35	62,5	62,0	50,0	35,4	25,5	55	0,41	4,1	37,2	24,8	55	0,34	4,8	
R	3	50	40	35	30	39	75,0	66,5	39,0	30,9	21,3	53	0,36	4,5	36,1	25,9	60	0,34	5,1	
R	4	50	45	30	25	38	55,6	69,5	34,0	43,9	30,8	58	0,37	4,5	35,2	22,6	50	0,32	4,6	
Mittelwert		45	40	31	24	35	59,0	66,8	41,3	36,9	25,9	56	0,37	4,1	33,5	22,2	52	0,33	4,6	
STABW		±7	±4	±3	±6	±4	±13,4	±3,4	±6,7	±5,4	±3,9	±2	±0,04	±0,6	±5,3	±4,6	±6	±0,01	±0,4	
MW ges		48	40	31	26	36	65,0	63,2	39,5	39,0	28,6	59	0,39	4,5	35,3	24,9	57	0,36	4,5	
STABW ges		±5	±5	±7	±7	±5	±14,8	±6,2	±4,8	±9,0	±8,8	±4	±0,04	±0,5	±11,1	±9,4	±6	±0,03	±0,5	

Tab.19: Acetyl-cystein, 12 mmol, Bioxcell®

		V% im Resistenztest bei 37 °C						% NAR	% lebend	Computergestützte Motilitätsbeurteilung mit Sperm vision										
Bulle	Ej	[Zeitdauer in min]						35 min	35 min	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	% motil	% p. mot.	VAP	Linearität	ALH	
		5	35	95	125	MW	35/125													Messung nach 45 min
B	1	45	40	30	25	35	62,5	74,0	38,0	52,8	45,3	72	0,44	3,3	48,3	41,2	61	0,40	3,0	
B	2	45	35	40	40	40	114,3	70,0	41,0	46,6	40,0	69	0,41	3,3	42,1	35,9	55	0,39	2,6	
B	3	50	40	35	30	39	75,0	71,0	47,0	43,7	40,1	68	0,39	3,2	32,6	27,8	49	0,41	2,3	
B	4	55	45	40	35	44	77,8	66,5	47,0	59,2	49,5	70	0,41	3,3	53,8	47,2	62	0,41	2,9	
Mittelwert		49	40	36	33	39	82,4	70,4	43,3	50,6	43,7	70	0,41	3,3	44,2	38,0	57	0,40	2,7	
STABW		±5	±4	±5	±6	±4	±22,3	±3,1	±4,5	±6,9	±4,6	±2	±0,02	±0,1	±9,1	±8,2	±6	±0,01	±0,3	
E	1	40	35	20	20	29	57,1	53,5	35,5	30,7	23,8	61	0,38	2,5	26,0	18,5	48	0,35	2,4	
E	2	45	40	35	25	36	62,5	51,0	34,5	36,0	31,3	72	0,40	3,2	28,7	21,5	54	0,34	2,9	
Mittelwert		43	38	28	23	33	59,8	52,3	35,0	33,4	27,5	66	0,39	2,8	27,3	20,0	51	0,35	2,7	
STABW		±4	±4	±11	±4	±5	±3,8	±1,8	±0,7	±3,8	±5,4	±8	±0,01	±0,5	±1,9	±2,1	±4	±0,01	±0,3	
L	1	45	40	35	25	36	62,5	72,5	41,0	43,5	40,4	75	0,44	3,2	25,7	21,2	66	0,38	3,1	
L	2	45	40	20	20	31	50,0	60,0	47,0	37,7	34,0	72	0,48	3,1	30,1	25,6	58	0,40	2,7	
L	3	45	40	35	30	38	75,0	62,0	38,0	39,5	34,7	76	0,45	3,3	36,9	29,9	65	0,39	3,1	
L	4	45	40	20	15	30	37,5	64,0	40,0	39,0	35,0	73	0,42	3,2	36,8	32,4	60	0,37	3,0	
Mittelwert		45	40	28	23	34	56,3	64,6	41,5	39,9	36,0	74	0,45	3,2	32,4	27,2	62	0,39	3,0	
STABW		±0	±0	±9	±6	±4	±16,1	±5,5	±3,9	±2,5	±3,0	±2	±0,03	±0,1	±5,5	±4,9	±4	±0,01	±0,2	
R	1	35	35	20	15	26	42,9	60,0	36,0	39,0	34,0	81	0,42	3,7	26,7	21,3	57	0,32	3,2	
R	2	50	40	30	20	35	50,0	69,0	43,5	41,4	36,6	69	0,41	3,2	33,1	27,1	53	0,34	2,9	
R	3	45	30	25	15	29	50,0	63,0	36,5	29,8	23,9	63	0,38	2,9	15,2	12,4	55	0,35	3,1	
R	4	50	45	30	25	38	55,6	53,0	34,0	31,1	26,0	65	0,35	3,3	26,1	18,8	52	0,31	2,9	
Mittelwert		45	38	26	19	32	49,6	61,3	37,5	35,3	30,1	69	0,39	3,3	25,3	19,9	54	0,33	3,0	
STABW		±7	±6	±5	±5	±5	±5,2	±6,7	±4,1	±5,7	±6,1	±8	±0,03	±0,3	±7,4	±6,1	±2	±0,02	±0,1	
MW ges		46	39	30	24	35	62,3	63,5	39,9	40,7	35,3	70	0,41	3,2	33,0	27,2	57	0,37	2,9	
STABW ges		±5	±4	±7	±8	±5	±19,2	±7,5	±4,7	±8,3	±7,6	±5	±0,03	±0,3	±10,0	±9,5	±5	±0,03	±0,3	

Tab. 20: Befruchtungsergebnisse des Feldversuches mit den Verdünnern Triladyl® und Bioxcell® in Kombination mit 0 und 8 mmol/l NAC

Bulle	Ej.	Triladyl							Bioxcell							Differenzen % NR			Versuch	
		0 mmol A-cys		8 mmol A-cys		Diff.	gesamt		0 mmol A-cys		8 mmol A-cys		Diff.	gesamt		Triladyl - Bioxcell			gesamt	
		EB	% NR	EB	% NR	% NR	EB	% NR	EB	% NR	EB	% NR	% NR	EB	% NR	0 mmol	8 mmol	gesamt	EB	% NR
E	7	294	68,7	293	71,7	-3,0	587	70,2	267	69,3	340	68,5	0,8	607	68,9	-0,6	3,1	1,3	1194	69,5
L	7	337	68,8	332	74,1	-5,3	669	71,4	296	68,9	340	70,6	-1,7	636	69,8	-0,1	3,5	1,6	1305	70,7
S	8	484	71,7	479	68,9	2,8	963	70,3	449	69,9	506	69,4	0,6	955	69,6	1,8	-0,5	0,7	1918	70,0
gesamt	22	1115	70,0	1104	71,2	-1,2	2219	70,6	1012	69,5	1186	69,5	0,0	2198	69,5	0,6	1,7	1,1	4417	70,0

Die Abbildungen 10 bis 12 zeigen Ergebnisse des Feldversuches

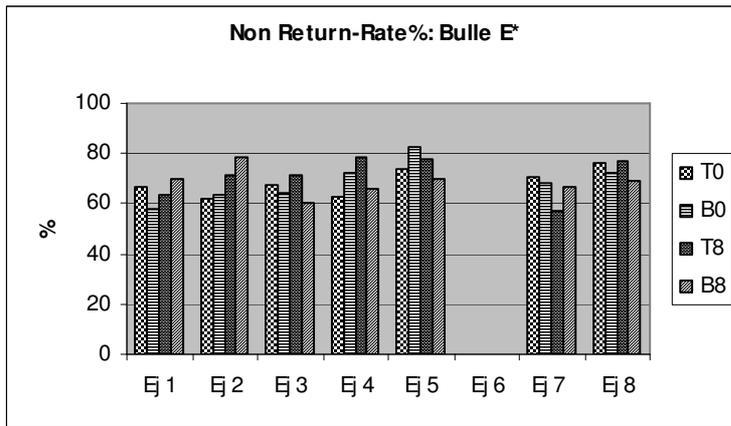


Abb. 10: *: Ejakulat 6 wurde nicht verwendet

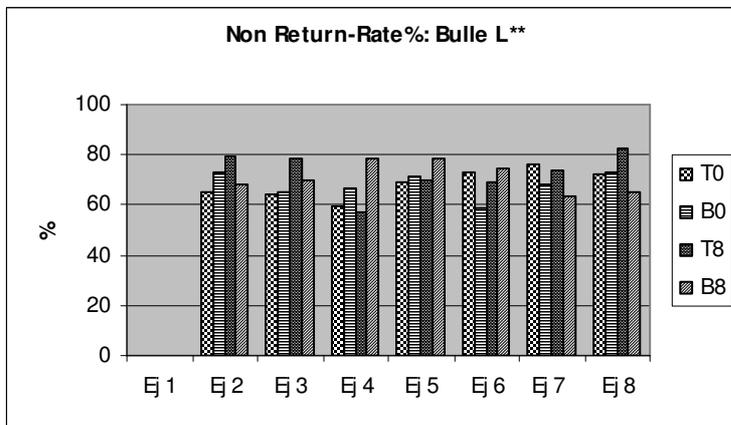


Abb. 11: **: Ejakulat 1 wurde nicht verwendet

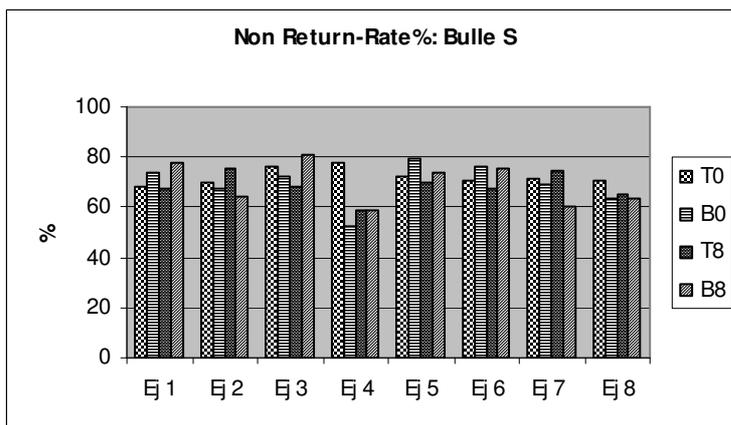


Abb. 12

Untersuchungen zum Coating-Effekt
Coating-Effekt Versuch I:

Tab. 21: Vitalitätswerte gefrierkonservierter Bullenspermien nach unterschiedlicher Behandlung bei der Spermaverdünnung (Coating-Versuch I)

Gesamt- verdünnungs- grad	Statistik	V%												% NAR		% lebend	
		5		35		95		125		MW		Diff 35/125 in %		35 min		35 min	
		Verdünnungszeitpunkt [min nach Gewinnung]															
		0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
1 : 25	MW	49	50	47	52	33	39	27	31	39	43	53,3	58,3	59,2	56,3	44,3	50,9
	STABW	±8	±8	±10	±9	±13	±10	±16	±13	±11	±9	±25,7	±18,6	±7,9	±7,6	±10,2	±5,8
1 : 50	MW	47	47	43	42	33	30	25	22	37	35	57,8	51,0	58,4	57,2	41,8	40,8
	STABW	±7	±12	±8	±12	±11	±12	±11	±14	±8	±11	±16,4	±26,4	±5,3	±6,3	±12,9	±13,4

Gesamt- verdünnungs- grad	Statistik	Computergestützte Motilitätsanalyse (Sperm Vision)																			
		Messung nach 45 Min.									Messung nach 125 Min.										
		% motil		% prog. motil		µm/s (VAP)		Linearität		ALH [µm]		% motil		% prog. motil		µm/s (VAP)		Linearität		ALH [µm]	
		Verdünnungszeitpunkt [min nach Gewinnung]																			
0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
1 : 25	MW	47,5	48,1	35,4	37,0	57	55	0,48	0,48	3,5	3,4	34,2	34,5	23,6	23,9	43	40	0,41	0,40	3,4	3,3
	STABW	±19,4	±17,2	±18,6	±16,3	±4	±5	±0,02	±0,02	±0,2	±0,2	±14,9	±14,2	±13,3	±12,2	±4	±6	±0,04	±0,06	±0,2	±0,2
1 : 50	MW	40,0	34,4	27,7	22,4	58	55	0,47	0,47	3,3	3,3	29,6	24,7	19,0	14,0	42	39	0,39	0,36	3,3	3,3
	STABW	±11,5	±14,0	±10,5	±13,1	±3	±3	±0,02	±0,02	±0,1	±0,2	±9,8	±9,1	±10,3	±8,5	±5	±5	±0,05	±0,06	±0,2	±0,3

Tab. 22: Ergebnisse der subjektiven Motilitätschätzung, Anteil der Spermien mit normaler Akrosomstruktur und Prozentsatz lebender Samenzellen
Coating-Effekt I, Verdünnung 1:25

Bulle	Ej.	V%												NAR		% lebend	
		5		35		95		125		MW		Diff 35/125		35		35	
		Verdünnungszeitpunkt [min nach Gewinnung]															
		0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
MA	1	40	50	35	50	20	35	5	35	25	43	14,3	70,0	61,0	53,0	36,7	46,2
MA	2	45	60	40	55	30	40	15	30	33	46	37,5	54,5	50,0	59,0	18,7	39,1
MA	3	60	60	55	55	45	50	35	40	49	51	63,6	72,7	64,0	54,0	53,7	59,0
MA	4	60	60	60	60	50	50	50	50	55	55	83,3	83,3	73,0	62,0	57,7	55,9
MW		51	58	48	55	36	44	26	39	40	49	49,7	70,2	62,0	57,0	41,7	50,0
STABW		±10	±5	±12	±4	±14	±8	±20	±9	±14	±5	±30,2	±11,9	±9,5	±4,2	±17,8	±9,1
IP	1	50	55	50	55	50	40	50	40	50	48	100	72,7	58,0	52,0	45,8	53,8
IP	2	50	50	50	65	30	45	35	40	41	50	70,0	61,5	71,0	73,5	52,0	58,7
IP	3	55	55	55	60	50	45	30	35	48	49	54,5	58,3	57,0	55,5	40,3	49,5
IP	4	55	50	55	55	35	50	35	40	45	49	63,6	72,7	46,0	56,0	51,2	51,1
MW		53	53	53	59	41	45	38	39	46	49	72,0	66,3	58,0	59,3	47,3	53,3
STABW		±3	±3	±3	±5	±10	±4	±9	±3	±4	±1	±19,7	±7,5	±10,2	±9,7	±5,4	±4,0
HP	1	40	45	30	40	20	30	10	20	25	34	33,3	50,0	54,5	58,0	40,5	45,3
HP	2	40	40	35	35	10	15	5	5	23	24	14,3	14,3	59,0	56,0	40,4	50,5
HP	3	40	40	45	45	30	35	25	20	35	35	55,6	44,4	54,0	40,0	48,6	53,7
HP	4	50	40	50	45	30	30	25	20	39	34	50,0	44,4	63,0	56,5	46,2	48,7
MW		43	41	40	41	23	28	16	16	30	32	38,3	38,3	57,6	52,6	43,9	49,5
STABW		±5	±3	±9	±5	±10	±9	±10	±8	±8	±5	±18,6	±16,2	±4,2	±8,5	±4,1	±3,5
MW gesamt		49	50	47	52	33	39	27	31	39	43	53,3	58,3	59,2	56,3	44,3	50,9
STABW gesamt		±8	±8	±10	±9	±13	±10	±16	±13	±11	±9	±25,7	±18,6	±7,9	±7,6	±10,2	±5,8

Tab.: 23

Coating-Effekt I, Verdünnung 1:50

Bulle	Ej.	V%												NAR		% lebend	
		5		35		95		125		MW		Diff 35/125		35		35	
		Verdünnungszeitpunkt [min nach Gewinnung]															
		0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
MA	1	45	45	45	45	25	30	20	5	34	31	44,4	11,1	55,0	61,0	37,9	30,3
MA	2	50	60	30	55	30	30	15	10	31	39	50,0	18,2	60,0	58,0	30,3	32,9
MA	3	60	60	50	55	45	35	35	30	48	45	70,0	54,5	59,5	62,0	46,9	46,3
MA	4	50	60	55	50	50	45	45	40	50	49	81,8	80,0	69,0	61,5	44,2	48,1
MW		51	56	45	51	38	35	29	21	41	41	61,6	41,0	60,9	60,6	39,8	39,4
STABW		±6	±8	±11	±5	±12	±7	±14	±17	±9	±8	±17,4	±32,2	±5,9	±1,8	±7,4	±9,1
IP	1	55	55	45	50	40	45	35	50	44	50	77,8	100,0	57,5	52,0	47,7	51,6
IP	2	45	60	50	60	35	45	30	35	40	50	60,0	58,3	65,0	66,0	49,6	49,9
IP	3	45	40	40	30	40	20	25	15	38	26	62,5	50,0	55,5	55,5	43,7	37,9
IP	4	50	45	45	40	40	30	30	25	41	35	66,7	62,5	58,0	60,0	32,3	34,4
MW		49	50	45	45	39	35	30	31	41	40	66,7	67,7	59,0	58,4	43,3	43,4
STABW		±5	±9	±4	±13	±3	±12	±4	±15	±3	±12	±7,9	±22,1	±4,1	±6,0	±7,7	±8,5
HP	1	35	35	30	30	15	15	10	10	23	23	33,3	33,3	54,0	58,0	39,9	38,7
HP	2	45	30	35	25	15	5	10	5	26	16	28,6	20,0	60,5	57,0	40,1	31,9
HP	3	40	40	40	35	30	25	25	20	34	30	62,5	57,1	48,0	41,0	44,3	44,4
HP	4	45	30	45	30	25	30	25	20	35	28	55,6	66,7	58,5	54,5	44,3	43,4
MW		41	34	38	30	21	19	18	14	29	24	45,0	44,3	55,3	52,6	42,1	39,6
STABW		±5	±5	±6	±4	±8	±11	±9	±8	±6	±6	±16,6	±21,4	±5,5	±7,9	±2,5	±5,7
MW gesamt		47	47	43	42	33	30	25	22	37	35	57,8	51,0	58,4	57,2	41,8	40,8
STABW gesamt		±7	±12	±8	±12	±11	±12	±11	±14	±8	±11	±16,4	±26,4	±5,3	±6,3	±12,9	±13,4

Tab. 24: CMA- Messergebnisse nach 45 und 125 Minuten Inkubation im Thermoresistenztest

Coating-Effekt I, Verdünnung 1:25

Bulle		Computergestützte Motilitätsanalyse (Sperm Vision)																				
		Ej.	Messung nach 45 Min.										Messung nach 125 Min.									
			% motil		% prog. motil		µm/s (VAP)		Linearität		ALH [µm]		% motil		% prog. motil		µm/s (VAP)		Linearität		ALH [µm]	
			Verdünnungszeitpunkt [min nach Gewinnung]																			
		0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	
MA	1	19,0	42,8	12,4	34,4	61	60	0,51	0,50	3,2	3,4	12,6	37,6	6,7	28,0	39	46	0,38	0,43	3,1	3,2	
MA	2	30,3	47,7	17,0	37,5	58	57	0,51	0,51	3,1	3,2	17,8	32,3	9,6	24,1	40	43	0,35	0,43	3,5	3,3	
MA	3	52,5	52,4	41,6	43,2	61	63	0,51	0,52	3,5	3,1	46,5	42,6	35,1	31,6	52	43	0,45	0,45	3,6	3,1	
MA	4	70,0	62,0	57,0	50,4	59	59	0,51	0,50	3,3	3,4	48,9	48,0	37,5	35,1	48	47	0,45	0,45	3,4	3,3	
MW		43,0	51,2	32,0	41,4	60	60	0,51	0,51	3,3	3,3	31,5	40,1	22,2	29,7	44	45	0,41	0,44	3,4	3,2	
STABW		±22,8	±8,2	±21,1	±7,1	±2	±3	±0,00	±0,01	±0,2	±0,1	±18,9	±6,7	±16,3	±4,7	±6	±2	±0,05	±0,01	±0,2	±0,1	
IP	1	69,2	50,5	57,3	37,3	52	53	0,48	0,48	3,5	3,2	52,6	42,6	43,1	30,5	43	42	0,45	0,43	3,2	3,2	
IP	2	52,6	70,6	38,5	60,0	59	58	0,48	0,47	3,6	3,7	40,5	42,0	28,5	32,6	46	43	0,46	0,43	3,2	3,2	
IP	3	53,0	70,9	41,6	55,7	54	50	0,47	0,46	3,8	3,7	37,8	44,2	25,9	30,3	41	42	0,43	0,44	3,5	3,6	
IP	4	78,3	65,6	65,1	53,7	53	49	0,46	0,47	3,8	3,6	55,8	56,9	40,1	40,9	41	43	0,44	0,44	3,5	3,5	
MW		63,3	64,4	50,6	51,7	54	53	0,47	0,47	3,6	3,5	46,7	46,4	34,4	33,6	43	42	0,45	0,44	3,3	3,4	
STABW		±12,7	±9,6	±12,7	±9,9	±3	±4	±0,01	±0,01	±0,2	±0,2	±8,8	±7,0	±8,5	±5,0	±2	±1	±0,01	±0,01	±0,2	±0,2	
HP	1	25,1	34,2	13,7	23,0	49	50	0,46	0,46	3,3	3,4	20,5	18,5	11,3	10,5	37	33	0,32	0,31	3,8	3,2	
HP	2	26,7	18,0	13,9	9,4	56	54	0,44	0,44	3,5	3,5	18,7	12,5	8,0	4,7	43	33	0,38	0,27	3,3	3,5	
HP	3	40,3	33,3	27,6	21,0	59	53	0,47	0,47	3,5	3,5	30,2	19,2	19,5	9,5	41	33	0,40	0,35	3,4	2,9	
HP	4	52,6	28,7	39,5	18,6	59	51	0,46	0,48	3,7	3,3	28,4	18,1	17,7	8,6	48	31	0,41	0,33	3,7	3,2	
MW		36,2	28,6	23,7	18,0	56	52	0,46	0,46	3,5	3,4	24,4	17,1	14,1	8,3	42	33	0,38	0,32	3,5	3,2	
STABW		±12,9	±7,4	±12,4	±6,0	±5	±2	±0,01	±0,02	±0,2	±0,1	±5,7	±3,1	±5,4	±2,5	±4	±1	±0,04	±0,03	±0,2	±0,2	
MW gesamt		47,5	48,1	35,4	37,0	57	55	0,48	0,48	3,5	3,4	34,2	34,5	23,6	23,9	43	40	0,41	0,40	3,4	3,3	
STABW gesamt		±19,4	±17,2	±18,6	±16,3	±4	±5	±0,02	±0,02	±0,2	±0,2	±14,9	±14,2	±13,3	±12,2	±4	±6	±0,04	±0,06	±0,2	±0,2	

Tab.: 25:

Coating-Effekt I, Verdünnung 1:50

Bulle	Ej.	Computergestützte Motilitätsanalyse (Sperm Vision)																			
		Messung nach 45 Min.										Messung nach 125 Min.									
		% motil		% prog. motil		µm/s (VAP)		Linearität		ALH [µm]		% motil		% prog. motil		µm/s (VAP)		Linearität		ALH [µm]	
		Verdünnungszeitpunkt [min nach Gewinnung]																			
		0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10	0	10
MA	1	35,1	18,9	23,7	10,7	60	58	0,48	0,47	3,3	3,4	23,9	21,4	15,1	12,6	49	45	0,41	0,43	3,3	3,3
MA	2	27,1	30,7	17,5	16,1	58	58	0,49	0,48	3,3	3,1	22,7	29,1	12,3	13,7	43	44	0,45	0,43	3,1	3,1
MA	3	51,6	53,8	38,2	40,5	65	61	0,50	0,52	3,3	3,2	42,8	32,9	32,5	22,2	46	46	0,44	0,43	3,2	3,3
MA	4	44,2	44,4	29,5	33,8	62	59	0,51	0,50	3,2	3,1	43,2	36,9	33,6	24,6	48	43	0,44	0,43	3,4	3,4
MW		39,5	37,0	27,2	25,2	61	59	0,50	0,49	3,3	3,2	33,2	30,1	23,4	18,3	46	44	0,44	0,43	3,3	3,3
STABW		±10,7	±15,3	±8,8	±14,2	±3	±1	±0,01	±0,02	±0,0	±0,1	±11,4	±6,6	±11,3	±6,0	±3	±1	±0,02	±0,00	±0,1	±0,1
IP	1	56,3	53,9	44,1	41,7	56	52	0,47	0,48	3,2	3,1	37,9	36,7	27,2	25,8	44	39	0,42	0,39	3,3	3,2
IP	2	51,9	56,0	38,6	42,2	63	56	0,50	0,47	3,1	3,4	36,4	35,7	25,9	25,8	42	42	0,43	0,41	3,1	3,1
IP	3	46,7	25,7	34,2	13,4	55	51	0,48	0,48	3,5	3,2	25,0	16,3	15,4	7,7	38	34	0,38	0,29	3,3	3,7
IP	4	43,2	30,6	31,8	20,5	54	56	0,47	0,47	3,2	3,7	38,9	22,3	30,0	12,6	40	37	0,42	0,37	3,1	3,2
MW		49,5	41,5	37,2	29,4	57	54	0,48	0,48	3,3	3,4	34,5	27,7	24,6	18,0	41	38	0,41	0,37	3,2	3,3
STABW		±5,8	±15,6	±5,4	±14,7	±4	±3	±0,01	±0,01	±0,2	±0,2	±6,4	±10,1	±6,4	±9,3	±3	±3	±0,02	±0,05	±0,1	±0,2
HP	1	22,2	20,3	12,9	12,8	58	51	0,43	0,46	3,6	3,1	14,6	13,6	4,3	5,8	34	42	0,30	0,32	3,2	4,0
HP	2	22,4	20,3	10,9	8,5	55	54	0,44	0,44	3,4	3,3	17,6	12,5	5,9	2,6	36	31	0,34	0,26	2,9	3,0
HP	3	35,9	33,6	22,4	16,0	58	57	0,46	0,47	3,3	3,5	25,2	20,8	13,6	7,8	41	33	0,35	0,32	3,5	3,0
HP	4	43,2	24,5	27,9	13,2	58	53	0,46	0,45	3,4	3,3	27,6	18,7	11,8	7,0	41	36	0,35	0,29	3,7	3,5
MW		30,9	24,7	18,6	12,6	57	54	0,45	0,46	3,4	3,3	21,2	16,4	8,9	5,8	38	36	0,34	0,30	3,3	3,4
STABW		±10,4	±6,3	±8,0	±3,1	±2	±2	±0,01	±0,01	±0,1	±0,2	±6,1	±4,0	±4,5	±2,3	±4	±5	±0,02	±0,03	±0,3	±0,5
MW gesamt		40,0	34,4	27,7	22,4	58	55	0,47	0,47	3,3	3,3	29,6	24,7	19,0	14,0	42	39	0,39	0,36	3,3	3,3
STABW gesamt		±11,5	±14,0	±10,5	±13,1	±3	±3	±0,02	±0,02	±0,1	±0,2	±9,8	±9,1	±10,3	±8,5	±5	±5	±0,05	±0,06	±0,2	±0,3

Coating-Effekt Versuch II: Tabellen 26 bis 32

Tab. 26.: Vitalitätswerte gefrierkonservierter Bullenspermien nach unterschiedlicher Behandlung bei der Spermaverdünnung (Coating-Versuch II)

Gesamtverdünnungsgrad	Statistik	V% im Resistenztest [min]																								% NAR				% lebend (Rh/PI)			
		5				35				95				125				MW				Differenz 35/125 in %				35 min				35 min			
		Aufbewahrungsdauer des unverdünnten Spermias bei 32°C																															
		5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
1:25	MW	51	52	46	43	52	50	43	40	42	39	34	31	35	34	25	22	45	44	37	34	67	68	57	54	58,0	57,7	49,6	49,8	47,7	48,3	37,6	39,8
	STABW	±4	±4	±3	±6	±4	±5	±6	±6	±6	±7	±6	±7	±9	±10	±10	±8	±5	±5	±6	±6	±15	±17	±19	±16	±7,9	±10,5	±8,6	±7,3	±5,3	±7,9	±11,6	±5,4
1 : 50	MW	50	49	45	41	48	48	43	38	38	37	32	27	31	28	24	21	42	40	36	32	64	59	57	56	60,5	53,8	51,7	49,1	42,1	39,0	38,3	36,5
	STABW	±4	±6	±7	±8	±6	±8	±8	±8	±8	±6	±8	±8	±8	±10	±8	±7	±7	±6	±5	±6	±6	±18	±15	±15	±16	±7,8	±8,1	±8,0	±10,9	±5,7	±7,9	±7,3

Gesamtverdünnungsgrad	Statistik	Computergestützte Motilitätsanalyse (Sperm vision)																											
		Messung nach 45 min																											
		% motil				% progr. motil				µm/s (VAP)				Linearität				ALH [µm]											
		Aufbewahrungsdauer des unverdünnten Spermias bei 32°C																											
		5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30				
1 : 25	MW	49,5	53,8	41,7	37,1	36,3	41,5	30,3	25,1	58	59	58	54	0,46	0,46	0,48	0,48	4,0	3,9	3,6	3,5								
	STABW	±10,5	±12,3	±11,7	±9,3	±11,8	±13,9	±11,2	±9,6	±4	±4	±4	±4	±0,04	±0,04	±0,02	±0,03	±0,6	±0,6	±0,4	±0,4								
1 : 50	MW	45,5	46,9	40,8	36,4	31,1	33,4	27,2	22,4	62	61	59	55	0,46	0,47	0,47	0,48	3,9	3,8	3,5	3,3								
	STABW	±11,2	±11,3	±6,9	±12,3	±12,2	±12,5	±7,1	±12,0	±3	±4	±4	±3	±0,04	±0,03	±0,03	±0,03	±0,5	±0,5	±0,5	±0,4								

Gesamtverdünnungsgrad	Statistik	Computergestützte Motilitätsanalyse (Sperm vision)																											
		Messung nach 125 min																											
		% motil				% progr. motil				µm/s (VAP)				Linearität				ALH [µm]											
		Aufbewahrungsdauer des unverdünnten Spermias bei 32°C																											
		5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30								
1 : 25	MW	40,0	41,5	29,6	28,4	28,1	29,5	18,6	16,7	45	44	40	37	0,44	0,43	0,39	0,40	3,4	3,4	3,1	3,0								
	STABW	±9,2	±12,3	±12,0	±9,0	±8,8	±12,1	±11,6	±8,3	±7	±7	±8	±8	±0,05	±0,06	±0,04	±0,06	±0,5	±0,5	±0,6	±0,3								
1 : 50	MW	37,2	32,1	30,7	26,8	24,0	18,8	17,9	14,5	45	43	42	38	0,42	0,41	0,39	0,37	3,2	3,3	3,3	3,1								
	STABW	±10,3	±6,9	±8,2	±7,8	±10,8	±7,4	±7,8	±7,5	±6	±8	±8	±7	±0,03	±0,04	±0,05	±0,05	±0,6	±0,5	±0,5	±0,5								

Tab. 27: Ergebnisse der subjektiven Motilitätsschätzung, Anteil der Spermien mit normaler Akrosomstruktur und Prozentsatz lebender Samenzellen
Coating-Effekt II, Verdünnung 1 : 25

Bulle	Ej.	V% im Resistenztest [min]																								% NAR				% lebend (Rh/PI)			
		5				35				95				125				MW				Differenz 35/125 in %				35 min				35 min			
		Aufbewahrungsdauer des unverdünnten Spermias bei 32°C																															
		5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
HA	1	50	45	45	50	55	50	45	45	30	40	30	30	20	20	15	10	39	39	34	34	36,4	40,0	33,3	22,2	66,0	70,0	50,0	53,5	43,0	36,8	35,1	32,4
HA	2	50	55	45	45	50	50	40	40	40	30	30	30	35	35	20	20	44	43	34	34	70,0	70,0	50,0	50,0	53,0	53,5	38,0	41,0	44,6	38,8	25,5	35,2
HA	3	50	50	50	45	45	45	45	40	40	35	35	30	25	20	20	20	40	38	38	34	55,6	44,4	44,4	50,0	51,0	41,0	56,0	54,0	41,6	50,7	38,3	37,3
MW		50	50	47	47	50	48	43	42	37	35	32	30	27	25	18	17	41	40	35	34	54,0	51,5	42,6	40,7	56,7	54,8	48,0	49,5	43,1	42,1	33,0	35,0
STABW		±0	±5	±3	±3	±5	±3	±3	±3	±6	±5	±3	±0	±8	±9	±3	±6	±3	±3	±2	±0	±16,9	±16,2	±8,5	±16,0	±8,1	±14,5	±9,2	±7,4	±1,5	±7,5	±6,7	±2,5
IM	1	55	50	45	40	55	50	35	30	45	30	30	25	35	45	15	15	48	44	31	28	63,6	90,0	42,9	50,0	55,0	55,0	54,0	48,0	48,6	46,4	39,6	40,6
IM	2	50	55	45	35	50	40	30	30	40	35	25	20	35	25	15	10	44	39	29	24	70,0	62,5	50,0	33,3	51,5	55,0	36,5	46,0	45,0	49,7	21,6	35,5
IM	3	55	55	55	50	55	55	55	50	45	45	50	45	40	40	45	30	49	49	51	44	72,7	72,7	81,8	60,0	55,5	53,5	49,5	46,0	46,2	52,8	44,5	44,1
MW		53	53	48	42	53	48	40	37	43	37	35	30	37	37	25	18	47	44	37	32	68,8	75,1	58,2	47,8	54,0	54,5	46,7	46,7	46,6	49,6	35,2	40,0
STABW		±3	±3	±6	±8	±3	±8	±13	±12	±3	±8	±13	±13	±3	±10	±17	±10	±3	±5	±12	±11	±4,7	±13,9	±20,7	±13,5	±2,2	±0,9	±9,1	±1,2	±1,8	±3,2	±12,1	±4,3
HI	1	55	55	45	45	55	55	45	45	45	45	35	30	30	30	25	25	46	46	38	36	54,5	54,5	55,6	55,6	66,5	66,5	55,5	47,0	53,1	51,6	37,9	42,3
HI	2	55	55	45	40	55	55	40	35	50	45	35	30	50	50	40	25	53	51	40	33	90,9	90,9	100	71,4	65,0	75,0	65,0	62,5	55,3	46,0	37,2	37,7
HI	3	50	55	45	50	55	55	45	45	50	50	35	45	45	45	25	30	50	51	38	43	81,8	81,8	55,6	66,7	70,5	65,5	51,5	57,0	44,3	43,5	23,9	38,0
MW		53	55	45	45	55	55	43	42	48	47	35	35	42	42	30	27	50	50	38	37	75,8	75,8	70,4	64,6	67,3	69,0	57,3	55,5	50,9	47,0	33,0	39,3
STABW		±3	±0	±0	±5	±0	±0	±3	±6	±3	±3	±0	±9	±10	±10	±9	±3	±3	±3	±1	±5	±18,9	±18,9	±25,7	±8,1	±2,8	±5,2	±6,9	±7,9	±5,8	±4,1	±7,9	±2,6
HU	1	45	45	45	35	45	45	45	40	35	30	35	30	30	30	25	25	39	38	38	33	66,7	66,7	55,6	62,5	46,0	44,0	40,0	38,0	45,0	48,2	48,4	42,0
HU	2	45	50	45	40	50	50	45	40	40	45	35	30	40	35	25	30	44	45	38	35	80,0	70,0	55,6	75,0	58,0	56,0	50,0	55,0	57,6	66,4	61,8	52,3
MW		45	48	45	38	48	48	45	40	38	38	35	30	35	33	25	28	41	41	38	34	73,3	68,3	55,6	68,8	52,0	50,0	45,0	46,5	51,3	57,3	55,1	47,1
STABW		±0	±4	±0	±4	±4	±4	±0	±0	±4	±11	±0	±0	±7	±4	±0	±4	±4	±5	±0	±2	±9,4	±2,4	±0,0	±8,8	±8,5	±8,5	±7,1	±12,0	±8,9	±12,8	±9,5	±7,3
MW ges		51	52	46	43	52	50	43	40	42	39	34	31	35	34	25	22	45	44	37	34	67	68	57	54	58,0	57,7	49,6	49,8	47,7	48,3	37,6	39,8
STABW ges		±4	±4	±3	±6	±4	±5	±6	±6	±6	±7	±6	±7	±9	±10	±10	±8	±5	±5	±6	±6	±15	±17	±19	±16	±7,9	±10,5	±8,6	±7,3	±5,3	±7,9	±11,6	±5,4

Tab. 28

Coating-Effekt II, Verdünnung 1 : 50

Bulle	Ej.	V% im Resistenztest [min]																				% NAR				% lebend (Rh/PI)							
		5				35				95				125				MW				Differenz 35/125 in %				35 min				35 min			
		Aufbewahrungsdauer des unverdünnten Spermias bei 32°C																															
		5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
HA	1	40	55	50	50	45	50	55	50	30	30	35	35	20	15	25	10	34	38	41	36	44,4	30,0	45,5	20,0	66,0	60,0	57,5	56,5	33,1	32,8	30,9	32,2
HA	2	50	50	50	45	50	50	45	40	30	30	35	35	30	25	30	25	40	39	40	36	60,0	50,0	66,7	62,5	60,0	46,0	41,5	31,0	36,6	32,4	31,7	28,0
HA	3	50	45	40	35	45	45	40	35	35	35	30	20	20	20	15	15	38	36	31	26	44,4	44,4	37,5	42,9	50,0	48,5	40,0	46,0	39,7	36,0	33,5	36,1
MW		47	50	47	43	47	48	47	42	32	32	33	30	23	20	23	17	37	38	38	33	49,6	41,5	49,9	41,8	58,7	51,5	46,3	44,5	36,5	33,8	32,0	32,1
STABW		±6	±5	±6	±8	±3	±3	±8	±8	±3	±3	±3	±9	±6	±5	±8	±8	±3	±1	±5	±6	±9,0	±10,3	±15,1	±21,3	±8,1	±7,5	±9,7	±12,8	±3,3	±2,0	±1,3	±4,0
IM	1	50	45	30	25	50	50	30	20	45	45	15	15	35	25	15	15	45	41	23	19	70,0	50,0	50,0	75,0	56,0	55,0	53,0	35,5	39,2	41,7	37,1	41,0
IM	2	50	45	45	40	35	35	35	35	30	35	20	20	30	25	25	20	36	35	31	29	85,7	71,4	71,4	57,1	58,5	56,0	54,0	51,0	43,3	37,2	35,7	31,9
IM	3	55	55	50	50	55	60	50	40	50	45	40	30	45	35	30	25	51	49	43	36	81,8	58,3	60,0	62,5	57,0	48,0	47,0	38,0	44,5	47,5	44,3	48,3
MW		52	48	42	38	47	48	38	32	42	42	25	22	37	28	23	20	44	42	32	28	79,2	59,9	60,5	64,9	57,2	53,0	51,3	41,5	42,3	42,1	39,0	40,4
STABW		±3	±6	±10	±13	±10	±13	±10	±10	±10	±6	±13	±8	±8	±6	±8	±5	±8	±7	±10	±9	±8,2	±10,8	±10,7	±9,2	±1,3	±4,4	±3,8	±8,3	±2,8	±5,2	±4,6	±8,2
HI	1	55	55	50	50	55	55	50	45	40	40	40	35	35	30	35	30	46	45	44	40	63,6	54,5	70,0	66,7	71,0	61,5	61,0	58,0	50,2	30,9	44,6	40,2
HI	2	50	55	55	35	50	50	40	35	45	40	35	25	45	40	30	25	48	46	40	30	90,0	80,0	75,0	71,4	70,0	64,0	61,5	64,5	48,6	42,3	41,2	34,4
HI	3	55	45	45	45	55	50	50	45	45	40	35	35	40	35	20	30	49	43	38	39	72,7	70,0	40,0	66,7	66,0	65,0	59,5	59,0	44,2	32,4	29,0	32,8
MW		53	52	50	43	53	52	47	42	43	40	37	32	40	35	28	28	48	45	40	36	75,5	68,2	61,7	68,3	69,0	63,5	60,7	60,5	47,6	35,2	38,3	35,8
STABW		±3	±6	±5	±8	±3	±3	±6	±6	±3	±0	±3	±6	±5	±5	±8	±3	±1	±2	±3	±5	±13,4	±12,8	±18,9	±2,7	±2,6	±1,8	±1,0	±3,5	±3,1	±6,2	±8,2	±3,9
HU	1	45	45	45	40	40	35	35	35	30	30	30	20	20	25	25	15	34	34	34	28	50,0	71,4	71,4	42,9	47,0	42,0	42,0	45,0	35,7	38,7	39,7	42,0
HU	2	50	40	40	40	50	50	40	40	40	35	40	30	20	35	15	20	40	40	34	33	40,0	70,0	37,5	50,0	64,0	46,0	52,0	56,0	48,5	57,1	53,6	34,6
MW		48	43	43	40	45	43	38	38	35	33	35	25	20	30	20	18	37	37	34	30	45,0	70,7	54,5	46,4	55,5	44,0	47,0	50,5	42,1	47,9	46,7	38,3
STABW		±4	±4	±4	±0	±7	±11	±4	±4	±7	±4	±7	±7	±0	±7	±7	±4	±4	±4	±0	±4	±7,1	±1,0	±24,0	±5,1	±12,0	±2,8	±7,1	±7,8	±9,0	±13,0	±9,8	±5,3
MW ges		50	49	45	41	48	48	43	38	38	37	32	27	31	28	24	21	42	40	36	32	64	59	57	56	60,5	53,8	51,7	49,1	42,1	39,0	38,3	36,5
STABW ges		±4	±6	±7	±8	±6	±8	±8	±8	±8	±6	±8	±8	±10	±8	±7	±7	±6	±5	±6	±6	±18	±15	±15	±16	±7,8	±8,1	±8,0	±10,9	±5,7	±7,9	±7,3	±5,8

Tab. 29: CMA- Messergebnisse nach 45 Minuten Inkubation im Thermoresistenztest

Coating-Effekt II, Verdünnung 1 : 25

		Computergestützte Motilitätsanalyse (Sperm vision)																			
		Messung nach 45 min																			
Bulle	Ej.	% motil				% progr. motil				µm/s (VAP)				Linearität				ALH [µm]			
		Aufbewahrungsdauer des unverdünnten Spermias bei 32 °C																			
		5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
HA	1	38,0	56,7	50,2	43,8	23,9	50,0	36,8	29,8	63	58	57	58	0,48	0,50	0,48	0,52	4,1	3,6	3,5	3,5
HA	2	46,7	52,8	23,9	24,9	25,5	34,8	11,6	15,5	61	65	66	62	0,45	0,45	0,44	0,46	4,2	4,1	3,8	3,8
HA	3	35,1	37,3	38,2	32,5	21,7	22,0	26,6	18,4	53	56	58	54	0,50	0,49	0,52	0,52	3,5	3,5	3,4	3,4
MW		39,9	48,9	37,4	33,7	23,7	35,6	25,0	21,2	59	60	60	58	0,48	0,48	0,48	0,50	3,9	3,7	3,6	3,6
STABW		±6,0	±10,3	±13,2	±9,5	±1,9	±14,0	±12,7	±7,6	±5	±5	±5	±4	±0,03	±0,03	±0,04	±0,03	±0,4	±0,3	±0,2	±0,2
IM	1	52,3	49,3	38,3	31,4	36,9	32,0	26,3	15,1	59	55	57	45	0,49	0,49	0,50	0,49	3,7	3,6	3,1	2,9
IM	2	49,2	37,7	26,3	27,6	36,6	27,8	17,7	16,4	57	55	59	54	0,50	0,48	0,50	0,51	3,4	3,2	3,4	3,4
IM	3	59,1	50,9	66,5	52,5	43,5	36,6	54,5	42,0	56	54	58	53	0,49	0,49	0,47	0,50	3,9	3,6	4,0	3,4
MW		53,5	46,0	43,7	37,2	39,0	32,1	32,8	24,5	57	55	58	51	0,49	0,49	0,49	0,50	3,7	3,5	3,5	3,2
STABW		±5,1	±7,2	±20,6	±13,4	±3,9	±4,4	±19,3	±15,2	±2	±1	±1	±5	±0,01	±0,01	±0,02	±0,01	±0,3	±0,2	±0,5	±0,3
HI	1	66,6	66,2	47,5	48,8	57,7	56,4	35,7	38,3	55	60	56	57	0,42	0,42	0,45	0,45	4,3	4,6	4,2	4,3
HI	2	62,3	75,6	48,2	30,5	53,0	64,6	36,7	20,5	58	62	55	53	0,41	0,39	0,46	0,44	4,8	4,9	4,0	4,0
HI	3	53,4	69,6	42,9	44,9	40,4	59,5	31,4	31,9	65	61	55	56	0,38	0,40	0,47	0,46	5,0	4,9	3,9	3,8
MW		60,8	70,5	46,2	41,4	50,4	60,2	34,6	30,2	59	61	55	55	0,40	0,40	0,46	0,45	4,7	4,8	4,0	4,0
STABW		±6,7	±4,8	±2,9	±9,6	±8,9	±4,1	±2,8	±9,0	±5	±1	±1	±2	±0,02	±0,02	±0,01	±0,01	±0,4	±0,2	±0,2	±0,3
HU	1	44,0	46,0	35,7	31,2	34,4	34,5	26,8	19,1	57	58	52	51	0,47	0,48	0,49	0,48	3,5	3,3	3,0	3,1
HU	2	37,5	49,9	41,1	40,5	26,2	38,5	29,3	29,6	57	65	62	55	0,47	0,48	0,48	0,49	3,4	3,6	3,4	3,2
MW		40,7	48,0	38,4	35,8	30,3	36,5	28,1	24,3	57	61	57	53	0,47	0,48	0,49	0,49	3,5	3,5	3,2	3,1
STABW		±4,6	±2,8	±3,8	±6,5	±5,8	±2,8	±1,8	±7,4	±0	±5	±7	±3	±0,00	±0,00	±0,01	±0,01	±0,1	±0,2	±0,3	±0,0
MW ges		49,5	53,8	41,7	37,1	36,3	41,5	30,3	25,1	58	59	58	54	0,46	0,46	0,48	0,48	4,0	3,9	3,6	3,5
STABW ges		±10,5	±12,3	±11,7	±9,3	±11,8	±13,9	±11,2	±9,6	±4	±4	±4	±4	±0,04	±0,04	±0,02	±0,03	±0,6	±0,6	±0,4	±0,4

Tab. 30

Coating-Effekt II, Verdünnung 1 : 50

Bulle		Computergestützte Motilitätsanalyse (Sperm vision)																			
		Messung nach 45 min																			
		% motil				% progr. motil				µm/s (VAP)				Linearität				ALH [µm]			
		Aufbewahrungsdauer des unverdünnten Spermias bei 32°C																			
Ej.	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	
HA	1	36,0	45,1	41,7	47,7	18,6	28,2	24,6	28,0	61	68	62	60	0,47	0,47	0,46	0,49	3,9	3,9	3,7	3,4
HA	2	46,2	36,5	41,1	25,2	28,7	21,2	25,0	11,6	68	66	67	56	0,44	0,47	0,46	0,46	4,0	4,0	4,2	3,7
HA	3	44,8	38,5	35,7	23,5	27,5	23,5	22,3	11,8	67	65	57	56	0,48	0,51	0,51	0,49	3,8	3,5	3,1	3,2
MW		42,3	40,0	39,5	32,1	24,9	24,3	24,0	17,1	65	66	62	57	0,46	0,48	0,48	0,48	3,9	3,8	3,7	3,4
STABW		±5,5	±4,5	±3,3	±13,5	±5,5	±3,6	±1,5	±9,4	±4	±2	±5	±2	±0,02	±0,02	±0,03	±0,02	±0,1	±0,3	±0,6	±0,3
IM	1	47,2	41,4	39,6	22,4	29,0	26,2	22,7	5,9	62	55	51	52	0,51	0,50	0,47	0,45	3,5	3,4	2,7	3,6
IM	2	29,1	36,5	36,0	32,0	16,0	24,5	21,8	19,0	59	59	57	53	0,47	0,48	0,51	0,50	3,4	3,2	3,0	2,7
IM	3	48,7	66,1	51,3	39,9	33,0	52,0	37,6	26,5	60	60	61	52	0,49	0,48	0,49	0,50	3,6	3,7	3,4	3,1
MW		41,7	48,0	42,3	31,4	26,0	34,2	27,4	17,1	60	58	56	52	0,49	0,49	0,49	0,48	3,5	3,4	3,0	3,1
STABW		±10,9	±15,9	±8,0	±8,8	±8,9	±15,4	±8,9	±10,4	±2	±3	±5	±1	±0,02	±0,01	±0,02	±0,03	±0,1	±0,3	±0,4	±0,5
HI	1	66,4	61,1	47,7	59,3	56,3	49,8	37,9	46,4	60	59	56	57	0,41	0,43	0,44	0,47	4,3	4,2	3,8	3,4
HI	2	42,7	63,2	51,2	48,3	30,7	53,4	38,3	36,0	62	59	60	55	0,41	0,42	0,43	0,43	4,3	4,3	4,1	3,8
HI	3	62,6	41,0	40,6	43,7	49,9	29,5	26,4	28,3	64	63	56	59	0,39	0,41	0,46	0,48	4,9	4,8	3,7	3,7
MW		57,2	55,1	46,5	50,4	45,6	44,2	34,2	36,9	62	60	57	57	0,40	0,42	0,44	0,46	4,5	4,4	3,9	3,6
STABW		±12,7	±12,3	±5,4	±8,0	±13,3	±12,9	±6,8	±9,1	±2	±2	±2	±2	±0,01	±0,01	±0,02	±0,03	±0,3	±0,3	±0,2	±0,2
HU	1	34,3	38,1	30,1	24,0	21,7	23,0	19,8	13,8	56	56	57	55	0,47	0,48	0,48	0,53	3,30	3,3	3,2	2,8
HU	2	42,2	48,2	33,7	34,9	30,5	36,2	22,3	19,4	63	58	61	55	0,47	0,48	0,49	0,47	3,36	3,4	3,2	2,9
MW		38,2	43,1	31,9	29,5	26,1	29,6	21,0	16,6	60	57	59	55	0,47	0,48	0,49	0,50	3,33	3,4	3,2	2,8
STABW		±5,6	±7,1	±2,5	±7,7	±6,3	±9,3	±1,7	±3,9	±5	±2	±3	±0	±0,00	±0,00	±0,01	±0,04	±0,04	±0,1	±0,0	±0,1
MW ges		45,5	46,9	40,8	36,4	31,1	33,4	27,2	22,4	62	61	59	55	0,46	0,47	0,47	0,48	3,9	3,8	3,5	3,3
STABW ges		±11,2	±11,3	±6,9	±12,3	±12,2	±12,5	±7,1	±12,0	±3	±4	±4	±3	±0,04	±0,03	±0,03	±0,03	±0,5	±0,5	±0,5	±0,4

Tab. 31: CMA- Messergebnisse nach 125 Minuten Inkubation im Thermoresistenztest
Coating-Effekt II, Verdünnung 1 : 25

		Computergestützte Motilitätsanalyse (Sperm vision)																			
		Messung nach 125 min																			
		% motil				% progr. motil				µm/s (VAP)				Linearität				ALH [µm]			
		Aufbewahrungsdauer des unverdünnten Spermias bei 32°C																			
Bulle	Ej.	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
HA	1	41,0	46,2	30,3	39,0	28,9	36,2	20,8	26,5	43	41	35	33	0,46	0,47	0,39	0,38	3,2	2,9	2,9	2,8
HA	2	36,1	42,9	24,1	22,0	24,8	29,1	13,2	10,7	40	42	35	30	0,47	0,47	0,38	0,35	2,8	2,9	2,9	2,6
HA	3	25,4	23,0	24,5	21,5	12,3	7,7	10,0	7,0	28	28	26	25	0,32	0,30	0,34	0,28	2,8	2,9	2,6	2,7
MW		34,2	37,4	26,3	27,5	22,0	24,3	14,7	14,7	37	37	32	29	0,42	0,41	0,37	0,34	2,9	2,9	2,8	2,7
STABW		±8,0	±12,6	±3,5	±10,0	±8,6	±14,8	±5,5	±10,4	±8	±8	±5	±4	±0,08	±0,10	±0,03	±0,05	±0,2	±0,0	±0,2	±0,1
IM	1	45,4	51,1	27,3	28,4	31,2	34,5	15,7	14,6	47	48	34	36	0,50	0,50	0,36	0,44	3,3	3,2	3,1	2,7
IM	2	39,6	30,8	21,9	16,5	28,3	19,9	10,7	8,1	41	39	46	33	0,46	0,46	0,34	0,39	3,0	2,9	1,9	3,0
IM	3	39,4	38,7	45,9	32,5	28,7	28,4	34,8	22,7	47	45	45	39	0,48	0,46	0,47	0,46	3,4	3,4	3,4	2,8
MW		41,5	40,2	31,7	25,8	29,4	27,6	20,4	15,1	45	44	42	36	0,48	0,47	0,39	0,43	3,2	3,2	2,8	2,8
STABW		±3,4	±10,2	±12,6	±8,3	±1,6	±7,3	±12,7	±7,3	±3	±5	±7	±3	±0,02	±0,02	±0,07	±0,04	±0,2	±0,3	±0,8	±0,2
HI	1	55,9	48,6	29,0	43,9	44,4	36,4	17,8	31,0	48	50	43	51	0,44	0,44	0,39	0,45	3,7	3,7	3,9	2,8
HI	2	51,4	64,2	58,3	31,9	38,4	51,7	46,2	19,3	49	54	55	44	0,42	0,42	0,46	0,44	4,2	4,4	3,8	3,7
HI	3	41,9	45,8	23,1	25,5	29,4	33,8	13,5	16,8	54	51	40	42	0,40	0,45	0,36	0,41	4	4,1	3,5	3,4
MW		49,7	52,9	36,8	33,8	37,4	40,6	25,8	22,4	50	52	46	46	0,42	0,44	0,40	0,43	4,0	4,1	3,7	3,3
STABW		±7,1	±9,9	±18,9	±9,3	±7,5	±9,7	±17,8	±7,6	±3	±2	±8	±5	±0,02	±0,02	±0,05	±0,02	±0,3	±0,4	±0,2	±0,5
HU	1	26,3	22,9	17,7	16,2	17,2	13,7	8,9	5,7	47	39	36	32	0,39	0,37	0,36	0,33	3,7	3,2	3,4	3,1
HU	2	37,8	42,5	23,2	35,0	25,5	32,7	12,8	20,9	48	50	47	45	0,46	0,44	0,41	0,46	3,3	3,4	3,2	3,1
MW		32,0	32,7	20,5	25,6	21,3	23,2	10,9	13,3	47	44	42	39	0,43	0,41	0,39	0,40	3,5	3,3	3,3	3,1
STABW		±8,1	±13,9	±3,9	±13,3	±5,9	±13,4	±2,8	±10,7	±0	±8	±8	±9	±0,05	±0,05	±0,04	±0,09	±0,3	±0,1	±0,1	±0,0
MW ges		40,0	41,5	29,6	28,4	28,1	29,5	18,6	16,7	45	44	40	37	0,44	0,43	0,39	0,40	3,4	3,4	3,1	3,0
STABW ges		±9,2	±12,3	±12,0	±9,0	±8,8	±12,1	±11,6	±8,3	±7	±7	±8	±8	±0,05	±0,06	±0,04	±0,06	±0,5	±0,5	±0,6	±0,3

Tab. 32

Coating-Effekt II, Verdünnung 1 : 50

		Computergestützte Motilitätsanalyse (Sperm vision)																			
		Messung nach 125 min																			
		% motil				% progr. motil				µm/s (VAP)				Linearität				ALH [µm]			
		Aufbewahrungsdauer des unverdünnten Spermas bei 32°C																			
Bulle	Ej.	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
HA	1	38,1	36,0	37,6	37,0	18,9	18,3	20,2	19,3	46	41	38	35	0,41	0,43	0,43	0,42	1,8	2,8	2,8	2,9
HA	2	32,0	23,3	38,5	31,0	14,5	9,0	23,9	16,7	43	40	39	34	0,44	0,45	0,46	0,41	3,0	3,0	2,8	2,6
HA	3	23,9	21,1	22,5	13,7	10,2	8,1	8,7	3,3	31	27	26	27	0,34	0,34	0,29	0,30	2,6	2,8	2,7	2,8
MW		±31,3	±26,8	±32,9	±27,2	±14,5	±11,8	±17,6	±13,1	±40	±36	±34	±32	±0,40	±0,41	±0,39	±0,38	±2,5	±2,9	±2,8	±2,8
STABW		7,1	8,0	9,0	12,1	4,4	5,6	7,9	8,6	8	8	7	4	0,05	0,06	0,09	0,07	0,6	0,1	0,1	0,2
IM	1	39,1	37,8	27,0	20,2	22,4	19,0	11,8	4,0	44	33	33	32	0,45	0,35	0,36	0,31	3,0	2,9	3,0	2,8
IM	2	30,6	32,4	26,6	24,5	17,3	17,0	15,7	15,4	41	43	40	37	0,40	0,46	0,42	0,41	3,1	3,0	2,9	2,7
IM	3	47,5	35,0	33,1	33,3	39,1	25,9	21,5	23,2	43	44	44	38	0,45	0,43	0,41	0,40	3,0	3,4	3,5	2,9
MW		39,1	35,1	28,9	26,0	26,3	20,6	16,3	14,2	43	40	39	36	0,43	0,41	0,40	0,37	3,0	3,1	3,1	2,8
STABW		±8,5	±2,7	±3,6	±6,7	±11,4	±4,7	±4,9	±9,7	±2	±6	±6	±3	±0,03	±0,06	±0,03	±0,06	±0,1	±0,3	±0,3	±0,1
HI	1	47,7	38,7	46,1	36,9	34,8	28,7	33,8	26,7	50	48	53	49	0,42	0,41	0,41	0,41	3,9	3,7	4,0	3,8
HI	2	55,9	42,4	36,8	27,3	43,0	31,0	25,2	13,2	50	54	52	42	0,41	0,41	0,39	0,34	3,9	4,0	4,1	3,7
HI	3	35,1	31,1	24,9	25,7	25,3	20,3	14,6	15,0	52	52	45	45	0,44	0,41	0,39	0,35	4,0	4,0	3,6	3,8
MW		46,2	37,4	35,9	30,0	34,4	26,7	24,5	18,3	51	51	50	45	0,42	0,41	0,40	0,37	3,9	3,9	3,9	3,8
STABW		±10,5	±5,8	±10,6	±6,1	±8,9	±5,6	±9,6	±7,3	±1	±3	±4	±4	±0,02	±0,00	±0,01	±0,04	±0,1	±0,2	±0,3	±0,1
HU	1	21,7	23,9	21,2	15,7	13,6	13,0	8,8	6,3	43	42	40	31	0,40	0,39	0,36	0,32	3,3	3,4	3,6	3,1
HU	2	37,1	30,9	23,2	29,0	24,9	16,7	12,8	16,1	50	49	47	44	0,41	0,38	0,41	0,45	3,4	3,8	3,2	2,8
MW		29,4	27,4	22,2	22,4	19,3	14,9	10,8	11,2	46	45	44	38	0,41	0,39	0,39	0,39	3,4	3,6	3,4	3,0
STABW		±10,9	±5,0	±1,4	±9,4	±8,0	±2,6	±2,9	±6,9	±5	±5	±5	±9	±0,01	±0,01	±0,04	±0,09	±0,1	±0,3	±0,3	±0,2
MW ges		37,2	32,1	30,7	26,8	24,0	18,8	17,9	14,5	45	43	42	38	0,42	0,41	0,39	0,37	3,2	3,3	3,3	3,1
STABW ges		±10,3	±6,9	±8,2	±7,8	±10,8	±7,4	±7,8	±7,5	±6	±8	±8	±7	±0,03	±0,04	±0,05	±0,05	±0,6	±0,5	±0,5	±0,5

Abkürzungen:

A-Cys:	N-Acetylcystein
ALH:	amplitude of lateral head displacement = seitlicher Ausschlag des Kopfes
B:	Bioxcell
B0 bis B12:	Bioxcell mit einer Konzentration von 0 bis 12 mmol/l N-Acetylcystein
CMA:	computerized motility assessment = computergestützte Motilitätsanalyse
EB:	Erstbesamung
eC:	Caprogenverdünner aus eigener Herstellung
Eosin % lebend:	Prozentsatz der mit Eosinfarbstoff angefärbten lebenden Zellen
kC:	kommerziell hergestellter Caprogen
Lin:	linearity = Geradlinigkeit
mot.	= motil = beweglich
p.mot.	= progressiv beweglich = vorwärts beweglich
NAC:	N-Acetylcystein
NAR:	Spermien mit normaler akrosomaler Randverdickung
NR:	Non-Return
SV:	„Sperm Vision“ = benutztes System computergesteuerter Motilitätsanalyse
SYBR % lebend:	mit Vitalfärbung SYBR/Propidiumiodid ermittelter Anteil lebender Spermien
V%:	subjektiv geschätzte Motilität in Prozent
T:	Triladyl
T0 bis T12:	Triladyl mit einer Konzentration von 0 bis 12 mmol/l N-Acetylcystein
VAP:	velocity average path = Geschwindigkeit Durchschnittsstrecke
VZP:	Verdünnungszeitpunkt

Lebenslauf:

Am 23. August 1977 wurde ich als Tochter des Maschinenbauingenieurs Herbert Sehner und dessen Ehefrau Vivienne Sehner (Lehrerin), geb. Farcey in Zagreb/Kroatien geboren. Da meine Mutter aus England stammt, genoss ich eine zweisprachige Erziehung. Neben englisch beherrsche ich die französische Sprache fließend in Wort und Schrift.

Ab September 1984 bis 1988 besuchte ich die Grundschule Kirchenthumbach im Landkreis Neustadt a. d. Waldnaab. Daraufhin besuchte ich das Gymnasium Pegnitz, wo ich 1997 den Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife absolvierte. Im Wintersemester 1997 begann ich an der Ludwig- Maximilians- Universität das Studium der Tiermedizin, das ich am 21. Februar 2003 mit dem dritten Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung abschloss. Praxiserfahrung während der Studienzeit wurde durch zwei Praktika in einer Tierklinik in Südafrika, ein weiteres an der gynäkologischen und ambulatorischen Tierklinik der Tierärztlichen Fakultät der LMU und ein weiteres in einer Tierklinik in Nürnberg erlangt.

Von Juli 2003 bis August 2004 war ich mit dem experimentellen Teil meiner Dissertation in der Besamungsstation Neustadt a. d. Aisch beschäftigt. Danach widmete ich mich dem schriftlichen Teil der Doktorarbeit bis April 2005 und bin seit dem in der Tierarztpraxis Dr. Gerhard Bausewein in Schwandorf als Assistentztierärztin beschäftigt.

Herrn Dr. H. Nehring von IFN Schönow e. V. danke ich für seine gute Betreuung und die stets freundliche Unterstützung in vielen Fragen.

Herrn Prof. Dr. J. Braun danke ich sehr für seine Unterstützung beim Abschluß dieser Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. C. Leiding für die Vermittlung dieser Dissertation, für die Möglichkeit der Versuchsdurchführung und die großzügige Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen.

Herrn Dr. J. Aumann möchte ich für seine entgegenkommende Beratung bei statistischen Fragen danken.

Herzlich danken möchte ich der Laborleiterin des Besamungsvereins Neustadt a. d. Aisch Frau H. Göbel für ihre fachliche und freundschaftliche tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter von Labor und Stall danke ich sehr herzlich für ihre Hilfe bei der praktischen Umsetzung der Versuche, sowie Herrn Eder für seine Unterstützung bei der Versuchsauswertung.

Vom Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere danke ich außerdem Herrn Rothe und Frau Reguszynski für ihre unentbehrliche Hilfe und Unterstützung.

Für die finanzielle Unterstützung bin ich der Dr. Dr. h. c. Karl-Eibl-Stiftung zu besonderem Dank verpflichtet.