

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Stolla

**Untersuchungen über die Bestimmung der Spermaqualität
- insbesondere Motilität und Membranintegrität -
und Zusammenhänge zur Fertilität von Besamungshengsten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ursula Domes

aus Immenstadt

München 2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. S. Kölle

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

Ein Magister hochgelahrt
Mit einem silberweißen Bart
Denkt: Welch ein Unikum
Ist wirklich so ein Spermium!
Hat Zunge nicht und Zähne gar,
auf seinem Kopf kein einzig Haar,
kein Vorn und Hint und kein Gesicht
und nichts, was sonst auch nützlich ist.
Der Mund fehlt völlig. Oh Wunder der Natur!
Auch vom Gegenteil fehlt jede Spur.

Und doch wird aus dem armen Tropf
Ein großes Tier mit Schwanz und Kopf,
Vielleicht ein Walfischtier im Meer,
 ein Tiger oder Grizzlybär,
ein wachsam Hund, wohl für dein Haus,
für deine Speisekammer eine Maus,
ein Pferd, ein Esel oder Schwein,
oder gar ein kleines Menschelein?

Doch bist du ganz in meinem Reich,
zum Mikroskop ich schlepp' dich gleich.
Ein Deckglas kriegst du auf die Stirn,
das quetscht dir Hals, Kopf und Hirn.
Im Lichte kannst du dann ersaufen,
die letzten Tränlein dir dann laufen.

Was sagst du dann du armer Wicht?

Das Spermlein flüstert mit der letzten Kraft:
„Ist das die ganze Wissenschaft?“

Anonymus

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	8
2	LITERATUR	9
2.1	Samenuntersuchung	9
2.1.1	Makroskopische Untersuchung	10
2.1.2	Mikroskopische Untersuchung	11
2.1.2.1	Motilität	11
2.1.2.1.1	Beurteilung der Motilität durch Schätzung	11
2.1.2.1.2	Computerassistierte Motilitätsauswertung	11
2.1.2.1.3	Vergleich Schätzung- Computerauswertung	14
2.1.2.2	Membranintegrität der Spermien	15
2.1.2.2.1	Kopfmembran	15
2.1.2.2.2	Akrosomintegrität	17
2.1.2.2.3	Mitochondrienmembran	20
2.1.2.3	Morphologie der Spermien	22
2.1.3	Spermienkonzentration	23
2.2	Beziehungen zwischen Samenqualität und Fertilität	24
2.2.1	Motilität	26
2.2.2	Membranintegrität	28
2.2.3	Morphologie	29
2.2.4	Konzentration	31

3	VERSUCHSANSATZ UND METHODEN	33
3.1	Methodische Voruntersuchungen zur Kovács-Foote Färbung	33
3.1.1	Einfluß des Schockgefrierens auf das Färbeverhalten der Spermien	36
3.1.2	Einfluß der Akrosomreaktion auf die Anfärbbarkeit des Akrosoms	36
3.1.3	Nachweis der Immotilität mittelstückgeschädigter Spermien	36
3.1.4	Wiederholungsauszählung	37
3.1.5	Einfluß des Samenverdünners und der Verdünnungsstufe	37
3.1.6	Veränderung der Mittelstückmembran nach dem Einfrieren/ Auftauen	40
3.2	Hengste und Samenproben	40
3.3	Untersuchungsablauf	41
3.3.1	Motilität	41
3.3.2	Membranintegrität	42
3.3.3	Morphologie	43
3.3.4	Konzentration	43
3.4.	Insemination der Stuten	43
3.5	Statistische Auswertung	45
4	ERGEBNISSE	46
4.1	Ergebnisse der methodischen Voruntersuchungen zur Kovács-Foote Färbung	46
4.1.1	Einfluß des Schockgefrierens auf das Färbeverhalten der Spermien	46

4.1.2	Einfluß der Akrosomreaktion auf die Anfärbbarkeit des Akrosoms	46
4.1.3	Nachweis der Immotilität mittelstückgeschädigter Spermien	47
4.1.4	Wiederholungsauszahlung	48
4.1.5	Einfluß des Samenverdünners und der Verdünnungsstufe	49
4.1.6	Veränderung der Mittelstückmembran nach dem Einfrieren/ Auftauen	54
4.2	Vergleich der Ergebnisse der computerassistierten Motilitätsanalyse mit denen der Schätzung	56
4.3	Subjektive Beurteilung der Spermienmotilität durch mehrere Personen im Vergleich zur computerassistierten Motilitätsanalyse	60
4.4	Vergleich Schätzen- Auszählen der Spermienkonzentration	69
4.5	Membranintegrität von Spermien aus Besamungsdosen	70
4.5.1	Spermienkopfmembranen	70
4.5.2	Mittelstückmembran	73
4.5.3	Kopfkappenmembran	76
4.6	Spermienmorphologie	78
4.7	Beziehungen zur Fertilität	79
4.7.1	Spermaproben von den Besamungen in der Klinik	79
4.7.1.1	Trächtigkeitsergebnisse der Stuten	79
4.7.1.2	Einfluß der Samenqualität auf die Fruchtbarkeit	80

4.7.2	Spermaproben von der Besamungsstation Schwaiganger	82
4.7.2.1	Trächtigkeitsergebnisse der Stuten	82
4.7.2.2	Einfluß der Samenqualität auf die Fruchtbarkeit	82
5	DISKUSSION	87
6	ZUSAMMENFASSUNG	93
7	SUMMARY	95
8	LITERATURVERZEICHNIS	97
9	ANHANG	111

1 EINLEITUNG

Bei der künstlichen Besamung von Pferden ist es aus vielerlei Gründen, nicht zuletzt auch aus wirtschaftlichen und forensischen Überlegungen von nicht unerheblichem Interesse, die Qualität einer Samenportion zu definieren. Da viele der üblicherweise angewendeten Samenuntersuchungsmethoden auf einer subjektiven Grundlage beruhen, sind sie nur schwer standardisierbar und die Ergebnisse verschiedener Untersucher folglich nur bedingt vergleichbar. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, verschiedene Samenparameter hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit und ihrer Relevanz für die Beurteilung der voraussichtlichen Befruchtungsfähigkeit zu überprüfen.

Für die beiden zentralen Samenparameter Spermienmotilität und –membranintegrität wurden zwei praxisnahe Untersuchungsmethoden getestet und beurteilt. Dazu gelangte bei der Untersuchung der Membranintegrität neben der bewährten Bromphenolblau-Nigrosin die sogenannte Kovács-Foote Färbung, eine bereits bei Bullen- und Ebersperma angewendete, lichtmikroskopische Färbemethode, erstmalig bei Hengstsamen zum Einsatz. Im Gegensatz zur herkömmlichen Bromphenolblau-Nigrosin Färbung erlaubt sie eine differenzierte Beurteilung der Integrität der Kopf- und Mittelstückmembran sowie des Akrosoms (KOVÁCS und FOOTE, 1992).

Die Motilität einer Besamungsdosis wird routinemäßig meist geschätzt oder neuerdings auch durch computerassistierte Analysesysteme bestimmt. In der vorliegenden Arbeit werden die Motilitätsschätzungen von sieben verschiedenen Untersuchern und die Ergebnisse zweier Computereinstellungen verglichen.

Einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Studie bildeten schließlich Untersuchungen über die möglichen Zusammenhänge verschiedener Spermparameter mit den erreichten Befruchtungsergebnissen.

2 LITERATUR

2.1 Samenuntersuchung

Die Untersuchung des Samens ist ein wichtiger Bestandteil der Zuchttauglichkeitsuntersuchung eines männlichen Tieres. Sie dient der Analyse verschiedener Charakteristika des Spermias, welche man mit den Standardwerten für diese Tierart vergleichen kann. Dieses Übereinstimmen oder Abweichen, zusammen mit dem Ermitteln der gedeckten, tragenden weiblichen Tieren ist nach HAFEZ (1989) die ideale Methode, um die Fruchtbarkeit eines männlichen Tieres zu bestimmen.

Die Samenuntersuchungsmethoden müssen schnell, zuverlässig und einfach sein. Diese Forderungen sind nicht leicht einzuhalten, weil jede Spermaprobe eine heterogene Population von Spermien darstellt, welche bestimmte Eigenschaften besitzen und zu verschiedenen Funktionen befähigt sein müssen, um ihrer physiologischen Aufgabe gerecht zu werden. Von einem biologischen Standpunkt aus sind nur vitale Spermien potentiell befruchtungsfähig. Deswegen stützen sich die meisten Untersuchungsmethoden auf die Überprüfung der Vitalität (JANUSKAUSKAS, 1999).

Neben den herkömmlichen Verfahren gibt es eine Reihe von modernen spermatologischen Tests, welche die Eigenschaften der Spermien, die eine mögliche Bedeutung für den Befruchtungsvorgang besitzen, überprüfen. Zur Zeit werden die Meisten noch ausschließlich für Forschungszwecke gebraucht, doch sie könnten unter der Voraussetzung, daß sie an die Bedürfnisse der Praxis angepaßt sind, auch in der Routinediagnostik eingesetzt werden und so die Sicherheit der Qualitätsbeurteilung verbessern (WABERSKI et al., 1999).

Beim Hengst sollte das Ejakulat routinemäßig einmal im Jahr vor der Saison, bei Verdacht auf beeinträchtigte Zuchttauglichkeit, bei abnormalem sexuellen Verhalten, bei vermuteten geni-

talen Infektionen, vor dem Verkauf sowie im Rahmen der künstlichen Besamung und Spermakonservierung untersucht werden (ENGLAND, 1996). Zusätzliche Anlässe einer spermatologischen Untersuchung sind Gewährungsfälle und Kontrollen von importierten Samenchargen (WEITZE, 2001a).

Die Zusammensetzung des Samens variiert nicht nur zwischen Tierarten, sondern auch zwischen Individuen der gleichen Spezies und den verschiedenen Ejakulaten des gleichen Individuums. Die Samenprobe kann durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden, wie Krankheiten, Ejakulationsfrequenz, Ernährung und andere Haltungsfaktoren, Jahreszeit, Alter, Grad der sexuellen Präparation, Samengewinnungsmethode, Behandlungsmethoden des Samens während und nach der Gewinnung, analytische Techniken, Variationen zwischen den Untersuchern, Pharmaka und letztendlich auch normale physiologische Variationen. Diese Variationsquellen sollten erkannt und bei der Ergebnisinterpretierung berücksichtigt werden. Sie sollten so weit wie möglich kontrolliert und standardisiert werden, insbesondere die Samengewinnung, -behandlung und Analysetechniken der Proben. Letztere sollten so objektiv und wiederholbar wie möglich sein. Beim Hengst basiert die routinemäßige Spermauntersuchung neben einer makroskopischen Betrachtung im wesentlichen auf der mikroskopischen Beurteilung von Motilität, Morphologie und Konzentration (McDONALD und PINEDA, 1989).

2.1.1 Makroskopische Untersuchung

Zu der makroskopischen Samenanalyse gehört die Bestimmung des Ejakulatvolumens, das beim Hengst zwischen 30 und 300 ml beträgt (ENGLAND, 1996). Das normale Hengstejakulat ist matt weiß, magermilchähnlich. Eine veränderte Farbe kann auf Beimengungen mit Blut oder Urin hinweisen (DÍAZ und DÍAZ, 1989; ENGLAND, 1996). Es wird auch der

Geruch, die Farbe und der pH- Wert geprüft (HAFEZ, 1989; McDONALD und PINEDA, 1989).

2.1.2 Mikroskopische Untersuchung

Bei der initialen mikroskopischen Untersuchung der Spermaprobe wird die Konzentration und Motilität geschätzt und die Anwesenheit von Agglutinationen und Zellen, die nicht Spermien sind, bestimmt (WHO, 1992).

2.1.2.1 Motilität

2.1.2.1.1 Beurteilung der Motilität durch Schätzung

Aufgrund ihrer Einfachheit ist die mikroskopische Schätzung der Motilität die wohl am häufigsten gebrauchte routinemäßige Untersuchungsmethode (JANUSKAUSKAS, 1999). Sie verschafft schnell und einfach einen Überblick über die Samenqualität (WABERSKI et al., 1999). Es wird normalerweise der Prozentsatz aller motilen Spermien geschätzt und dieser dann in vorwärts-, orts- und pathologisch motile Spermien aufgeteilt. LUDWIG und FRICK (1987) dagegen bewerten beim Mann nur die „für die Befruchtung wichtigen progressiven (zielgerichteten) Motilitäten“ und trennen die kreisförmige, am Ort pendelnde und zitternde Bewegung als unbeweglich ab.

Die Genauigkeit der so durchgeführten visuellen Beurteilung ist naturgemäß jedoch gering, sie hängt darüber hinaus sehr vom Untersucher ab (JANUSKAUSKAS, 1999). Man hat deshalb versucht, objektive Methoden zu entwickeln. Unter diesen hat die computerassistierte Analyse der Spermienmotilität die größte Bedeutung erlangt.

2.1.2.1.2 Computerassistierte Motilitätsauswertung

Nach den ursprünglich angewandten Methoden der manuellen Motilitätsauswertung von Spermaproben, deren mikroskopisches Bild auf Videosystemen aufgezeichnet wurde (z.B. von RIEMKE, 1983), kamen computerassistierte Spermaanalyse-Programme (computer-assisted sperm analysis, CASA) zum Einsatz, welche schneller und effektiver sind. Am Modell vom Bullen wurden sie unter anderem von GSCHWEND (1986), LEIDL et al. (1987), LEIDL et al. (1989) und beim Hengst von ZIEGLER (1991) geprüft. Diese CASA Programme können eine große Anzahl von Spermien auswerten und deren Art der Bewegung und Geschwindigkeit, sowie auch andere Parameter wie den lateralen Spermienkopfausschlag messen (WABERSKI et al., 1999). Es werden die einzelnen Bahnen der Spermien, ihre Geschwindigkeit und Richtung untersucht. Die wirkliche Bewegung des Spermienkopfes wird mit der kurvilinearen Geschwindigkeit beschrieben (VCL). Daraus wird die mittlere Geschwindigkeit entlang der ermittelten Bahn berechnet (VAP). Die lineare Geschwindigkeit (VSL) stellt den Weg pro Zeiteinheit entlang einer geraden Linie von der ersten Position des Kopfes bis zu seiner letzten Position dar. Die seitliche Kopfauslenkung (ALH) beschreibt die Amplitude der Abweichungen des Kopfes von der durchschnittlichen Bahn (Abb. 1, DAVIS und SIEMERS, 1995).

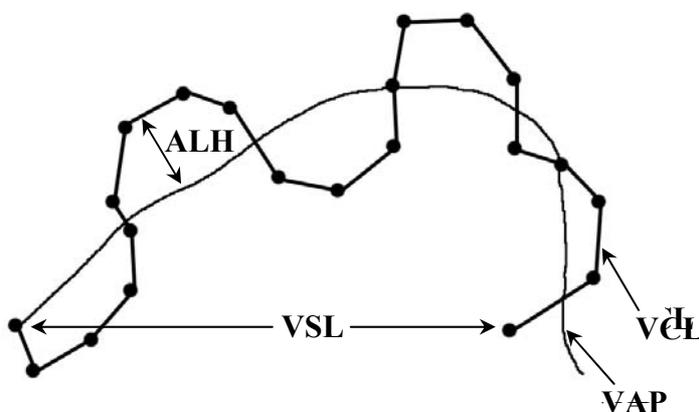


Abb. 1: Schematisches Diagramm der Spermienkinetik.

VCL: velocity curvilinear line; VAP: velocity average path, VSL: velocity straight line, ALH: amplitude of lateral head displacement (nach DAVIS und SIEMERS, 1995).

Diese kinetischen Parameter wurden nicht entwickelt, weil sie der biologischen Funktion der Spermien entsprechen, sondern weil es technisch möglich ist diese zu ermitteln. Sie sind vereinfachte, lineare Motilitäten, welche nicht die komplette, natürliche Spermienbewegungen beschreiben (DAVIS und SIEMERS, 1995). Zudem bewegt sich ein Spermium nicht immer gleich schnell und in die gleiche Richtung, weswegen die extrem kurze Untersuchungsspanne der CASA Programme irreführende Ergebnisse liefern kann (VANTMAN et al., 1988).

Die Aussagekraft und Wiederholbarkeit dieser Messungen werden durch viele technische Faktoren beeinflusst, wie die Konditionen der Probe (Temperatur, Konzentration, Kammerart und –tiefe, Verdünner, Detritus), des Mikroskops (Optik, Lichtintensität), Anzahl der ausgewerteten Felder, Videoaufnahme, etc. (DAVIS und KATZ, 1993). Der Untersucher kann das Computerprogramm unter anderem durch die Auswahl der Meßfelder und Adaptationszeit beeinflussen (RIEMKE, 1983). Auch unterschiedliche Objektive, Computereinstellungen und –programme ergeben verschiedene Ergebnisse (WIEDERMANN, 1992). Zu den vielen Variablen, welche die Motilitätsmessung der CASA Programme beeinflussen, gehören auch die Samengewinnungsmethode, Konzentration der Probe und Erfahrung des Untersuchers (VETTER et al, 1998).

Wenn jedoch möglichst alle Faktoren standardisiert sind, ist die Wiederholbarkeit der Messungen mit einem einzelnen Computersystem gut. Nur die Qualität und Auswahl des mikroskopischen Bildes sind vom Untersucher abhängig und stellen nicht standardisierbare Einflüsse dar (LEIDL et al., 1989). Bei einem gleichen System müssen mindestens 200 Spermien ausgewertet werden, damit die Meßgenauigkeit der Geschwindigkeit reproduzierbar ist. Zur Einteilung in die unterschiedlichen Bewegungsformen müssen dagegen 1000 Zellen erfaßt werden (RIEMKE und LEIDL, 1985).

Dagegen ist es schwierig die Ergebnisse verschiedener Computersysteme miteinander, oder die mit einem Computersystem erfaßten mit Schätzwerten zu vergleichen, weil die wirkliche Spermienmotilität nicht bekannt ist. So kann bei divergierenden Resultaten nicht ermittelt werden, welche von beiden Methoden besser die reele Spermienmotilität wiedergibt. Um diese unbekannt Variable festzulegen, wurde in einem Experiment mit Computergrafikprogrammen ein synthetisches Video, das die Bewegungen eines Spermiums simuliert, hergestellt. So waren die Geschwindigkeiten und Bewegungsarten dieser „künstlichen Spermien“ bekannt und das Video wurde mit zwei Computersystemen ausgewertet (CellTrak-S und Hamilton-Thorn). Die Variationen lagen unter 8% mit Korrelationen von $r=0,994$ bei der VCL und $r=0,996$ bei der VSL (DAVIS und SIEMERS, 1995; SIEMERS, 1994), was zeigt, daß verschiedene Computersysteme doch ähnliche Ergebnisse liefern können.

VARNER et al. (1991) verglichen, trotz der zuvor beschriebenen Einschränkungen, zwei CASA Systeme (Hamilton-Thorn und frame-by-frame playback video micrography) bei Hengstsperma. Sie kamen auf Grund der hohen Korrelation zwischen beiden Systemen ($r=0,97$) zu dem Schluß, daß „Computerprogramme zuverlässige Methoden zum Bestimmen von Spermienmotilität und –geschwindigkeit sind“. JASKO et al. (1988, 1991) testeten das CellSoft CASA Programm bei Hengstsamen und erreichten wiederholbare und für den klinischen Gebrauch ausreichend genaue Motilitätsanalysen. Allerdings ist die Auswertung von Hengstsperma schwieriger als bei anderen Spezies, da der Computer den wesentlich kleineren Spermienkopf von Hengsten schwerer erkennt (LEIDL et al., 1987; LEIDL et al., 1989; ZIEGLER, 1991).

2.1.2.1.3 Vergleich Schätzung - Computerauswertung

Es gibt unterschiedliche Meinungen, inwieweit Schätzungen und Computeranalysen der Spermienmotilität vergleichbare Ergebnisse liefern. LEIDL et al. (1987) fanden bei einer

Untersuchung an Bullensamen eine relativ hohe Korrelation von $r=0,81$ zwischen Schätzung und Computerauswertung der vorwärtsbeweglichen Spermien (GRIPS, Graphic Imaging Processing Software). Dagegen variierten bei der Publikation von O'CONNOR et al. (1981) die Korrelationen zwischen Schätzung und Computerauswertung von $r=0,44$ bis $r=0,77$ (Penn State System, USA). Diese Autoren fanden, daß die Computermethode keinen Vorteil gegenüber herkömmlichen Alternativen bietet.

In einem umfangreichen Versuch zum Vergleich der Schätzung mit der Computerauswertung auf 11 Besamungsstationen mit 127 Bullen wurden Korrelationen von $r=0,56$ bis $r=0,85$ ($p<0,01$) gefunden (STUMPE, 1989). Teilweise wurden bei Bullensamen signifikant abweichend niedrigere Werte geschätzt als gemessen (GSCHWEND, 1986). Eine Korrelation von $r=0,78$ ($p<0,01$) wurde bei Humansperma beschrieben (VANTMAN et al., 1988).

JASKO et al. (1991) verglichen bei Hengstsperma die Wiederholbarkeit der Schätzwerte mit den Ergebnissen des CellSoft- Programms, wobei der Erstere einen höheren Variationskoeffizienten (20,8%) aufwies als das Computer-Programm (15,5%).

Die meisten Autoren sind jedoch der Meinung, daß eine objektive Methode, zusätzlich zur Schätzung, notwendig ist und Computerprogramme zufriedenstellende Ergebnisse liefern.

2.1.2.2 Membranintegrität der Spermien

2.1.2.2.1 Kopfmembran

Sogenannte Vitalfärbungen differenzieren Spermien mit intakter und geschädigter Kopfmembran. Diese werden auch „Supravitalfärbung“, „Farbstoffabsorptionstest“ oder „Lebend/Tot“- Färbung genannt. Das Prinzip dieser Färbungen beruht darauf, daß geschädigte Membranen für den Farbstoff permeabel sind, so daß die Spermien dementsprechend angefärbt

werden. Intakte Membranen sind dagegen undurchlässig, die Spermien bleiben also farblos. Einige Spermien werden nur teilweise angefärbt, meistens im postakrosomalen Bereich. Manche Autoren zählen sie zu den intakten Spermien, da es sich nur um „geschwächte Spermien“ handelt (GEISLER, 1990), andere zu den „toten“ (SCHERK, 1963; VÁSQUEZ et al., 1992). Meistens ist die Anzahl dieser halbgefärbten Spermien beim Hengst so gering, daß sie keinen Einfluß auf den Prozentsatz der intakten Spermien hat (GEISLER, 1990).

Es gibt viele verschiedene Methoden der Supravitalfärbung, jedoch wird bei fast allen ein Samentropfen mit einer Farbstofflösung vermischt und ausgestrichen. Beim Hengst werden z.B. die Eosin-Nigrosin (ENGLAND, 1996) und die Eosin-Färbung beschrieben (KLUG, 1993). Diese sind eher für flüssigkonserviertes Sperma geeignet, weniger für tiefgefrorene, glycerinhaltige Proben (WEITZE, 2001a).

Bei Hengstsamen wurden die Bromphenolblau, Bromphenolblau-Nigrosin und Eosin-Nigrosin Färbung verglichen. Die beiden letzteren hatten eine geringere toxische Wirkung auf die Spermien und sollten bevorzugt verwendet werden. Die Einwirkungszeit bei der Bromphenolblau Färbung sollte so kurz wie möglich gehalten werden, da schon nach 2 Minuten die Zahl der gefärbten Spermien deutlich ansteigt. Die Variationskoeffizienten bei wiederholter Beurteilung eines Ausstriches durch den gleichen Untersucher lagen unter 10%. Größer waren die Variationen zwischen verschiedenen Ausstriche eines gleichen Ejakulates. Auch nach sechsmonatiger Aufbewahrung lieferten die gefärbten Proben noch brauchbare Ergebnisse (GEISLER, 1990).

Die Mindestanforderungen an Hengtsamen von ungefärbten, intakten Spermien liegen je nach Autor bei 60% (DÍAZ und DÍAZ, 1989) bzw. bei 80% (WEITZE, 2001b).

Es werden auch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zur Untersuchung der Plasmamembranintegrität verwendet, wie z.B. Propidiumiodid (PI), Carboxyfluoreszein-Diacetat (CFDA), SYBR-14 und Hoechst 33258. Die angefärbten Spermien werden im Fluoreszenzmikroskop oder mit Hilfe eines Flowzytometers erfasst (WABERSKI et al., 1999). Nach Ansicht von LICHTENSTERN (1995) läßt sich eine Membranschädigung der Spermien jedoch durch die Bromphenolblau-Färbung ebenso zuverlässig ermitteln wie mit den aufwendigen fluoreszenzmikroskopischen Verfahren.

Ein anderes Überprüfungsverfahren der Funktionsfähigkeit der Plasmamembran ist der Hypoosmotische Resistenztest, auch hypoosmotic swelling (HOS) test genannt, welcher von JEYENDRAN et al. (1984) entwickelt wurde. Im hypoosmotischen Medium lassen Spermien mit intakter und funktionell aktiver Plasmamembran Wasser eindringen, um ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulären Kompartimenten zu erstellen. Diese Schwellung läßt sich in verschiedene Stufen einteilen: So krümmt sich zuerst die Schwanzspitze und schließlich quillt der gesamte Schwanz auf. Spermien, welche die größere Schwellung aufweisen, besitzen die funktionell aktivere Membran. Die Plasmamembran der nicht geschwellenen Spermien wird als funktionell inaktiv oder geschädigt eingestuft. Die Spermien kann man im Lichtmikroskop auszählen oder die relative Volumenverschiebung mit einem elektronischen Partikelzähler messen (LUDWIG und FRICK, 1987; CORREA et al., 1997; WABERSKI et al., 1999).

2.1.2.2.2 Akrosomintegrität

Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung der Spermaqualität ist die Bestimmung der Integrität des Akrosoms. Das Akrosom sollte zum Zeitpunkt der Besamung intakt sein, damit es später im weiblichen Genitaltrakt zur Kapazitation der Spermien und zur Penetration der

Eizelle kommen kann. Bei aufgetauten Tiefgefriersamen vom Hengst sollten mindestens 50% der Akrosome intakt sein (McDONALD und PINEDA, 1989).

Es wurden verschiedene Färbemethoden zur Darstellung des Akrosoms entwickelt. Die Flüssigfixierung von Spermien nach Hancock ermöglicht eine Differenzierung des Akrosomstatus im Phasenkontrast bei unterschiedlichen Tierarten. Bei Hengstspermien jedoch ist dies aufgrund ihrer geringen Größe nicht möglich (BAUMGARTL, 1980; RAUHAUS, 1990).

Von besonderen Interesse ist die gleichzeitige Bestimmung des akrosomalen und „lebend/tot“ Status der Spermien, um eine echte (lebende Spermien mit verändertem Akrosom) von einer falschen Akrosomreaktion unterscheiden zu können, wie z.B. durch den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (DE LEEUW et al., 1991; LICHTENSTERN, 1995) oder durch eine Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen (SUKARDI et al., 1997).

Eine lichtmikroskopische Methode ist die „triple stain“ Technik, die für Humansperma entwickelt wurde. Die drei Färbemittel sind Bengalrosa, Bismarckbraun und Trypanblau. Das erste färbt das Akrosom an und die beiden letzteren den postakrosomalen Bereich: braun bei den „lebenden“ bzw. dunkelblau bei den „toten“ Spermien (TALBOT und CHACON, 1981; VÁSQUEZ et al., 1992).

Ein Nachteil der sehr komplexen „triple stain“ Technik ist, daß die Einwirkungszeiten der Färbelösungen individuell an jeden Samenspender angepasst werden müssen, um verlässliche Daten zu erhalten (POPE et al., 1991; SLOTTE et al., 1993). Es ist schwierig, die Färbung zu standardisieren und zu reproduzieren und die Differenzierung des Akrosoms ist oft unklar (BRAUN et al. 1991). Die akrosomreagierten lebenden Spermien sind sehr sensibel und viele

sterben bei dieser Färbemethode ab und ergeben so eine erhöhte Anzahl von „falschen“ Akrosomreaktionen (DIDION und GRAVES, 1986).

Bei Hengstsamen liefert die „triple stain“ Methode vergleichbare Ergebnisse über den Akrosomstatus wie die CTC-Fluoreszenzfärbung („chlortetracycline fluorescence assay“) und die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie. Der postakrosomale Bereich von Hengst-spermien nimmt jedoch bei der „triple stain“ Technik kein Trypanblau auf. Er zeigt also nicht die dunkelblaue Farbe, durch die man tote Spermien erkennen kann. Mit dieser Färbemethode ist es folglich nur möglich den Zustand des Akrosoms, nicht aber die Vitalität der Hengst-spermien zu messen. Außerdem sind die Färbeschritte sehr zeitaufwendig (VARNER et al., 1987).

DIDION et al. (1989) entwickelten eine „dual stain“ Methode, bei der eine Giemsa-Färbelösung mit Trypanblau bei verschiedenen Haustieren verwendet wurde. „Tote“ Spermien zeigen aufgrund der Färbung mit Trypanblau einen blauen und „lebende“ einen farblosen postakrosomalen Bereich. Vorhandene Akrosome werden durch die Giemsa-Lösung hellviolett gefärbt. Für den Hengst ist sie jedoch nicht empfehlenswert, da sie unbefriedigende Ergebnisse liefert. Für andere Tierarten, wie z.B. auch Wasserbüffel, eignet sich die Färbung gut (SIDHU et al., 1992).

Wegen der komplizierten Färbe- und Waschvorgänge, Artefakte und variierenden Ergebnisse der vorher genannten Färbungen, die ihre Verwendung in der Routinediagnostik verhinderten, entwickelten KOVÁCS und FOOTE (1992) eine einfachere und zuverlässigere Methode, die eine gleichzeitige Bestimmung von Vitalität und Akrosomintegrität erlaubt. Diese basiert auch auf Trypanblau zur Darstellung des „lebend/tot“ Status und einer Giemsa-Lösung zur Anfärbung der Kopfkappe. In der Fixierlösung ist Neutralrot enthalten, welches das erste

Färbemittel bindet und bei den folgenden Färbegängen schützt. Man kann nicht nur die Anwesenheit des Akrosoms oder seine Ablösung untersuchen, sondern auch die Zwischenstufen, wie geschädigtes oder sich ablösendes Akrosom (siehe Zeichnung und Fotos unter 3.1). So kann man „lebende“ von „toten“ Spermien unterscheiden, da sie einen hellblauen bzw. einen dunkelblauen postakrosomalen Bereich aufweisen. Intakte Akrosome färben sich rosa an, geschädigte violett und bei abgelösten Akrosomen ist der vordere Bereich des Spermiums hellgrau. Beim Bullen und Eber wird der postakrosomale Ring rot gefärbt, was eine zusätzliche Beurteilung erlaubt. Das Mittelstück färbt sich bei intakten Membranen rosa und bei geschädigten dunkelblau an.

Die Trypanblau- und die Fixierlösungen sind stabil und können mehrfach verwendet werden. Es ist möglich, den Vorgang nach der ersten Färbung oder nach dem Fixieren zu unterbrechen und später weiterzufärben. Bei Hengst-, Maus- und Humansperma erhielten KOVÁCS und FOOTE (1992) keine zufriedenstellende Ergebnisse, da sich das ganze Spermium dunkel anfärbte und so keine Beurteilung erlaubte. Erst im Jahr 1999 gelang Kovács durch leichte Modifizierung der Färbung eine Darstellung von Hengstspermien (persönliche Mitteilung, NAGY, 2000).

2.1.2.2.3 Mitochondrienmembran

Das Mittelstück der Spermien enthält Mitochondrien, welche die für die Fortbewegung erforderliche Energie liefern. Eine intakte mitochondriale Funktion ist nötig, damit die Spermienmotilität erhalten bleibt. Somit sind Membranintegrität der Mitochondrien und des Mittelstücks wichtige Parameter beim Bestimmen der Fertilität (VETTER et al., 1998).

Die Kovács-Foote Färbung zeigt nicht nur den „Lebend/Tot“- und den Akrosomstatus an, sondern färbt auch geschädigte Mittelstückmembranen. So können Spermien erkannt werden,

die intakte Kopfmembran und -kappe haben, aber gleichzeitig ein durchlässige Mittelstückmembran. Es wird vermutet, daß diese Spermien aufgrund der Mitochondrienschädigung immotil sind. Trotz der intakten Kopfmembran sollten sie eher zu den „toten“ als zu den „lebenden“ Spermien gezählt werden, da sie sich nicht aktiv der Eizelle nähern können (NAGY et al., 1999). Bei Bulle, Eber und Schafbock wurde gezeigt, daß der Anteil der angefärbten Mittelstücke mit dem Anteil der geschädigten Membranen nach dem Hypoosmotischen Resistenztest korreliert ($r=0,81$ bis $r=0,94$). Daraus wurde geschlossen, daß die angefärbten Mittelstücke wirklich eine Membranschädigung darstellen (NAGY et al., 1999).

Bei anderen lichtmikroskopischen Vitalfärbungen wurde der Status des Spermischwanzes nie diskutiert, obwohl mehrfach beschrieben wurde, daß die Anzahl der ungefärbten Spermien höher ist als die Motilität. NAGY et al. (1999) vermuteten deshalb, daß wohl nicht alle „lebenden“ Spermien auch motil sind.

Seit einigen Jahren gibt es auch Fluoreszenzfarbstoffe, welche die Integrität der Mitochondrien anzeigen, wie zum Beispiel Rhodamin (Rh 123) und das sogenannte JC-1 (REERS et al., 1991). Diese können mit anderen Fluoreszenz-Markern für Akrosomintegrität und Vitalität kombiniert werden, so daß sie wie die Kovács-Foote Färbung gleichzeitig den „Lebend/Tot“- , Akrosom- und Mitochondrienstatus anzeigen können.

Auch bei diesen Untersuchungen wurde meistens ein Zusammenhang zwischen Mitochondrienmembranintegrität und Motilität gefunden. Bullenspermien mit geschädigter Mitochondrienmembran in der Rhodamin 123- Darstellung waren meistens tot, oder bewegten sich langsamer als $10 \mu\text{m}/\text{sek.}$; Zellen mit intakten Mitochondrien waren dagegen motil (AUGER et al., 1989). Die Korrelation der Bullenspermien mit hohem Mitochondrienpotenzial zu der Vorwärtsbeweglichkeit betrug $r=0,96$ (GARNER et al., 1997). Von einigen Autoren wurde

die Zuverlässigkeit dieses Verfahren allerdings in Zweifel gestellt. TROIANO et al. (1998) vermuten, daß die Rh 123 Färbung eine niedrige Sensibilität zeigt und keine zuverlässige Ergebnisse liefert.

Zudem werden diese fluoreszenzangefärbten Spermien meistens mit Flowzytometern analysiert, welche zwar viele Spermien auswerten können, jedoch sehr teuer sind. Bei tiefgefrorenen Hengstspermien scheint Flowzytometrie ungenauere Ergebnisse zu liefern, als bei Frischsamen (MERKIES et al., 2000).

2.1.2.3 Morphologie der Spermien

Die morphologische Untersuchung ist die qualitative und quantitative Differenzierung von normal und pathologisch geformten oder destrukturierten Spermien und die Erkennung von anderen Zellen. Es gibt viele Morphologiefärbungen, aber auch die für die Beurteilung der Vitalität und anderer Spermaparameter gedachten, können für die Morphologiebestimmung benützt werden (LUDWIG und FRICK, 1987). Beispiele sind die Hämatoxylin-Eosin, Bromphenolblau-Nigrosin und Kovács-Foote Färbungen.

Für genauere Bestimmungen, z.B. der Kopfgröße und -form, wurden verschiedene computer-assistierte Morphometriesysteme entwickelt. Ein Beispiel ist der Hamilton Thorne Morphology (HTM) Analyzer IVOS, dessen Eignung von RABHOFER (1999) bei Bullenspermien und von UHLENBROCK (1999) bei Hengstspermien getestet wurde. HIRAI (2000) prüfte die Ergebnisse des Mika Morphology Analyzer bei Nutztierspermien.

Die Klassifizierung der Anomalien wird in der Tiermedizin meistens nach dem Schema von LEIDL et al. (1971) getroffen. Je nach Tierart wird ab einem Prozentsatz von 15- 30% missgebildeter Spermien von Teratozoospermie gesprochen. Eine umfassende Darstellung

über Ursachen und Bedeutung der Teratozoospermie sowie die diagnostischen Verfahren ist bei STOLLA (1984) zu finden.

Die Form des Spermiums kann aufgrund vieler Ursachen verändert sein. Diese werden normalerweise in primäre - Fehler in der Spermatogenese –, sekundäre – Fehler in der Reifung – und tertiäre Anomalien – Schaden während oder nach der Ejakulation – eingeteilt (DOTT, 1975). Diese können auch als testikuläre, posttestikuläre und artifiziell erzeugte Mißbildungen bezeichnet werden. Die beiden Letzteren werden oft zusammengefaßt. Die häufigste Ursache der Spermienmißbildungen sind jedoch die Ersteren, erzeugt aufgrund von Störungen in der Spermatogenese (STOLLA, 1984). Beim Hengst sollten mehr als 70% Zellen morphologisch normal sein (McDONALD und PINEDA, 1989). Die häufigsten Spermienanomalien beim Hengst sind abgetrennter Kopf, Akrosom- und Mittelstückdefekte, Zytoplasmatröpfchen (proximal und distal, als Rest des Zytoplasmas ein Zeichen von Unreife), geknicktes Mittelstück und aufgerollter oder gedrehter Schwanz. Beim Hengst ist die abaxiale Insertion des Mittelstücks am Kopf ein charakteristisches morphologisches Merkmal (ENGLAND, 1996).

2.1.3 Spermienkonzentration

Meistens werden zum Bestimmen der Spermienkonzentration Zählkammern, wie z.B. die nach Neubauer, Thoma-Zeiß oder Bürker-Türk, benützt (LUDWIG und FRICK, 1987). Sie kann auch mit einem elektronischen Zählgerät oder mit einem für Hengstsperma kalibrierten Photometer bestimmt werden, jedoch sind beide Systeme relativ ungenau (ENGLAND, 1996; KLUG, 1993). Die gleichzeitige Konzentrationsbestimmung mit einem computerassistierten Motilitätsanalyseprogramm ist laut VANTMAN et al. (1988) nicht empfehlenswert, da sie sehr ungenau ist.

Die Konzentration von Sperma variiert stark zwischen den Hengsten. Die Normalwerte liegen zwischen 30×10^6 und 800×10^6 Spermien/ml, mit einem Durchschnitt von 120×10^6 Spermien/ml (McDONALD und PINEDA, 1989). Die Spermienanzahl im gesamten Ejakulat ist ein besserer Parameter als die Konzentration und sollte zwischen 4×10^9 und 14×10^9 Spermien betragen (ENGLAND, 1996). Als Besamungsdosis wird eine Anzahl von mindestens 100, besser 500 Millionen vorwärts motiler und morphologisch normaler Spermien empfohlen (MORROW, 1986).

2.2 Beziehungen zwischen Samenqualität und Fertilität

In der Reproduktionsmedizin ist die Vorhersage der Befruchtungsfähigkeit von großem Interesse. Die Ansichten darüber, ob und in welchem Maße In-vitro Untersuchungen von Sperma auf dessen Befruchtungsfähigkeit schließen lassen, sind allerdings sehr unterschiedlich.

Die meisten Autoren sind der Meinung, daß die klassische Beurteilung der Motilität, Konzentration und Morphologie der Spermien keine sichere Vorhersage der Fertilität erlaubt, sondern nur eine grobe Abschätzung der Ejakulatqualität zur Selektion für den Besamungseinsatz bietet. Somit können Samenproben, die den jeweiligen Mindestanforderungen nicht gerecht werden, verworfen werden (JANUSKAUSKAS, 1999; LINFORD et al., 1976; MAGISTRINI et al., 2001; WABERSKI et al., 1999). LUDWIG und FRICK (1987) dagegen finden, daß diese drei Spermaparameter die wichtigsten Kriterien sind und die Befruchtungsfähigkeit des Ejakulats bestimmen können.

Eine Kombination von ausgewählten moderneren Methoden verspricht dagegen eine höhere Präzision als ein einziger Test. Dies ist besonders dann von großer praktischer Bedeutung,

wenn das Ejakulat maximal ausgenutzt werden soll, also bei geringer Konzentration eine gute Lager- und Befruchtungsfähigkeit haben soll (WABERSKI et al., 1999).

Eine bessere Aussage als konventionelle Labortests ergibt die In-vitro Befruchtung, da sie komplizierte biologische Vorgänge wie Kapazitation, Akrosomenreaktion und Fertilisation mit berücksichtigt (LONERGAN, 1994).

Die aussagefähigste Methode zur Spermaevaluierung ist die retrospektive Beurteilung anhand der sogenannten Non-Return-Rate (NRR) der mit einem bestimmten Vatertier besamten Tiere. Dieses Verfahren ist jedoch relativ zeitaufwendig und teuer und man benötigt eine große Anzahl von weiblichen Tieren (JANUSKAUSKAS, 1999). Um die Variation aufgrund der weiblichen Population möglichst gering zu halten, sollten mit dem gleichen Ejakulat so viele weibliche Tiere wie möglich besamt werden (McDONALD und PINEDA, 1989). Dies ist jedoch praktisch nur bei Rindern möglich. CORREA et al. (1997) untersuchten über 5 Jahre den Samen von 22 Bullen von unterschiedlicher Fruchtbarkeit und die NR-Rate der über 130.000 besamten Kühe. Sie sind der Meinung, daß es möglich ist, die Variationen der NR-Raten auf die unterschiedlichen Samencharakteristika zurückzuführen. Die durchschnittlichen prozentualen Spermawerte waren in der Gruppe der fertileren Bullen besser als in der Gruppe der weniger fertilen.

SIEME et al. (2001) konnten dagegen bei 30 in der Besamung eingesetzten Warmbluthengsten keine Zusammenhänge zwischen den Samenparametern und Trächtigkeitsraten der Stuten feststellen.

McDONALD und PINEDA (1989) weisen darauf hin, daß die Spermaparameter besser mit der Fruchtbarkeit korrelieren, wenn sie von einer unselektierten männlichen Population

stammen und nicht von Tieren, die schon aufgrund ihrer hohen Fruchtbarkeit ausgewählt wurden, was jedoch bei den meisten Nutztieren der Fall ist. Die Korrelation zwischen Samenqualität und Fruchtbarkeit ist nicht über den ganzen Verlauf linear, sondern erreicht an einen gewissen Punkt ein Maximum (Abb. 2).

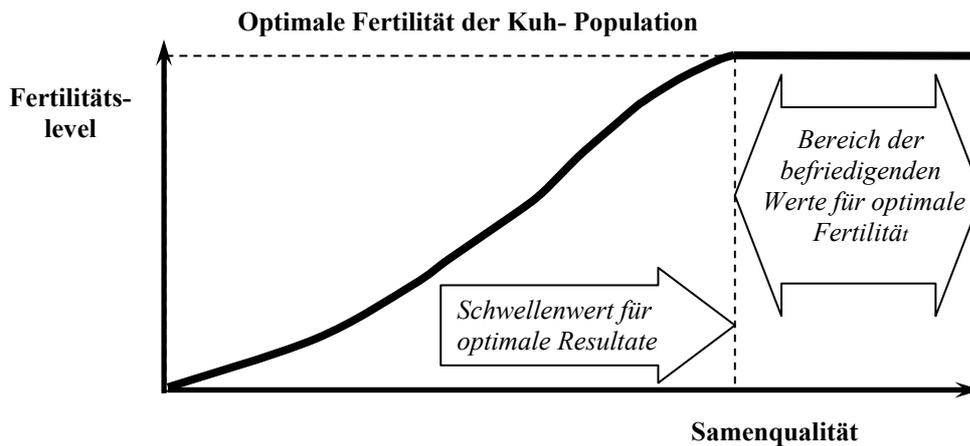


Abb. 2: Zunehmende Fertilität bei ansteigenden Werten der Bullensamencharakteristika bis ein Schwellenwert für optimale Fruchtbarkeit erreicht ist (nach SALISBURY und VanDENMARK, 1961).

2.2.1 Motilität

Motilität ist eine Vitalitäts-Eigenschaft, die Spermien besitzen müssen, um die Befruchtung zu vollenden (JANUSKAUSKAS, 1999). Sie wird deshalb auch als der „für die Fertilität prognostisch wichtigste Faktor“ bezeichnet (KRAUSE, 1991).

Der Grenzwert zwischen normaler und reduzierter Fertilität bei Humansamen wird bei 20% beweglichen Spermien definiert (BOSTOFE et al., 1984). In Einzelfällen ist eine Schwangerschaft mit niedrigeren Motilitätswerten möglich, was sich auch auf sämtliche andere Spermaparameter übertragen lässt. Die Beweglichkeit steht in Korrelation zur Kapazitationsfähigkeit der Spermien und hat somit eine zentrale Bedeutung in der natürlichen Konzeption und in der In-vitro-Fertilisation (LUDWIG und FRICK, 1987).

Auch bei anderen Species, wie beim Bullen, wurde festgestellt, daß die höchsten Korrelationen zwischen einem Samenparameter und der Fruchtbarkeit, gemessen als NR-Rate der Kühe, bei dem Faktor Motilität gegeben ist ($r=0,53$). In der Gruppe der fertileren Bullen betrug diese $r=0,61$ und bei den weniger fruchtbaren Tieren $r=0,39$ (alle $p<0,01$; CORREA et al., 1997). Bei Schätzung von Motilität und Geschwindigkeit von Bullenspermien wurde eine Korrelation zu extremen Non-Return-Raten von $r=0,55$ bzw. $r=0,64$ ($p<0,02$) gefunden (KJÆSTAD et al., 1993).

Die bisher präsentierten Ergebnisse über den Zusammenhang zwischen der Motilität von Hengstpermien und der Fruchtbarkeit sind zum Teil widersprüchlich. DÍAZ und DÍAZ (1989) sind der Meinung, daß die Motilität von Hengstesperma signifikant mit der Fruchtbarkeit korreliert, auch wenn diese nur geschätzt wird. Bei Hengsten mit niedrigerer Fertilität als der Durchschnitt, wurde eine geringere Anzahl motiler und vorwärts motiler Spermien festgestellt. Die Motilität wurde sowohl subjektiv, als auch computergestützt ausgewertet, bei letzterer fand sich zusätzlich eine langsamere Spermengeschwindigkeit (Daten von 64 Hengsten, JASKO et al., 1992). Dagegen fanden SIEME et al. (2001) bei 30 untersuchten Hengsten keine derartigen Zusammenhänge.

GODEAUX und KREIDER (1978) führten einen Versuch durch, bei dem die motilere Spermafraktion von 3 Hengsten abgetrennt wurde. 30 Stuten wurden nach dem Split Sample Verfahren mit diesem und dem ursprünglichen Sperma als Kontrolle besamt. Die Besamungsdosen hatten die gleiche Spermienzahl. Mit dem motileren Samen wurde höhere Trächtigkeitsraten (80%) als bei der Kontrolle (70%) erreicht.

Andere Arbeitsgruppen konnten allerdings keine deutlichen Zusammenhänge zwischen Motilität und Fruchtbarkeit finden. Bei einem Vergleich von zwei Tiefgefrierverdünnern von Hengstsamen zeigte sich in beiden Gruppen ähnliche Motilität, aber eine signifikante unterschiedliche In-vivo-Fertilität (ECOT et al., 2001). MÜLLER et al. (2000) fanden keine Korrelation zwischen CASA-bestimmten Motilität von Hengstsperma und der In-vivo Fruchtbarkeit, allerdings untersuchten sie nur 6 Hengste. Auch KATILA (2001) schreibt, daß bis jetzt kein Forscher einen Zusammenhang zwischen einem CASA-ermittelten Motilitätswert und Befruchtungsvermögen von tiefgefrorenen Hengstsperma darstellen konnte.

2.2.2 Membranintegrität

Für den Hengst gibt es nur relativ wenige Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der Membranintegrität der Spermien und der Fruchtbarkeit. Ein Grund dafür ist die vermutete Annahme, daß sie mit der Motilität korreliert und es deswegen ausreicht, diese letztere zu bestimmen (DÍAZ und DÍAZ, 1989). Die Integrität der Membranen kann durch die Vitalität, Akrosom- und Mittelstückmembranintegrität angezeigt werden.

Bei Hengstjakulaten fanden LAGARES et al. (2000) eine signifikante Korrelation ($r=0,73$) zwischen membranintakten – nach Eosin ungefärbten - Spermien und der saisonalen Fruchtbarkeit von Stuten. Auch bestand eine Korrelation ($r=0,64$, $p<0,05$) zwischen den Spermato-kritwerten von Hengstsperma nach dem HOS-Test (die geschwollenen Spermien haben größeres Volumen) und der Fruchtbarkeit.

FERNANDES et al. (1997) untersuchten einen Hengst mit variablen Anteil von Akrosomdefekten, hauptsächlich „knobbed acrosomes“, und fanden eine signifikante Korrelation zwischen den Prozentsätzen der Akrosomdefekte und der Trächtigkeiten ($r= -0,87$). MÜLLER et al. (2000) beschrieben eine Korrelation ($p<0,05$) zwischen den lebenden, akrosomrea-

gierten Hengstpermatozoen nach Heparin- oder Calciumionophor-Zugabe und der In-vivo Trächtigkeit. Dagegen war eine negative Korrelation zwischen dem Anteil der lebenden Spermien, die trotz der Zugabe von Heparin keine Akrosomreaktion aufwiesen, und der Fertilität der Stuten zu sehen.

Eine signifikant positive Korrelation zwischen Vitalität und Fruchtbarkeit In-vivo ermittelte JANUSKAUSKAS (1999) bei Bullensperma. CORREA et al. (1997) fanden bei ihren Untersuchungen einen Korrelationskoeffizient von $r=0,52$ ($p<0,01$) zwischen der Akrosomintegrität und der durchschnittlichen Fruchtbarkeit. Diese Korrelation war allerdings nicht signifikant, wenn man nur die Gruppe der Bullen mit niedriger Fertilität betrachtete und auch deutlich geringer ($r=0,04$) als bei Bullen mit hoher Fruchtbarkeit ($r=0,38$). KJÆSTAD et al. (1993) fanden eine Korrelation von $r=0,45$ ($p<0,06$) zwischen Spermien mit intakten Akrosomen und extrem niedrigen bzw. extrem hohen Non-Return-Raten. Die Anzahl der Bullenspermien mit intakter Kopf- und Mitochondrienmembran, die durch Flowzytometrie ermittelt wurde, korrelierte mit dem Prozentsatz normaler Morphologie ($r=0,82$; $p=0,01$) und Motilität ($r=0,78$; $p=0,02$), aber nicht mit der individuellen Non-Return-Rate (ERICSSON et al., 1993).

Bei Männern mit verminderter Fertilität jedoch wurde eine geringere Motilität und weniger intakte Mitochondrien (Rh 123, Flowzytometrie) gefunden, als bei denen mit höherer Fertilität (EVENSON et al., 1982).

2.2.3 Morphologie

Es gibt viele Meinungen, wie stark die Anzahl von Spermienanomalien im Ejakulat die Fruchtbarkeit beeinflusst und ob bestimmte Anomalien einen größeren Einfluß haben als andere. Allgemein ist man sich jedoch darüber einig, daß mit steigendem Anteil von morphologischen Anomalien die Befruchtungsfähigkeit des Samens fällt. Aufgrund der

fehlenden Standardisierung und Subjektivität der Morphologieauswertung sind die Ergebnisse verschiedener Veröffentlichungen jedoch nur bedingt vergleichbar (STOLLA, 1984).

In der Untersuchung von CORREA et al. (1997) korrelierte der Prozentsatz morphologisch normaler Spermien mit der NR-Rate nur signifikant in der Gruppe der fertileren Bullen und der Gesamtgruppe ($r=0,42$ bzw. $r=0,59$; $p<0,01$) und nicht in der Gruppe der weniger fruchtbaren Stiere ($r=0,17$; $p=0,08$).

CASEY et al. (1997) meinen, daß die morphologische Beurteilung von Hengstspermien von klinischer Bedeutung ist, um die männliche Fertilität von Pferden zu bestimmen. Bei der Untersuchung von 64 Warm- und Vollbluthengsten fanden JASKO et al. (1992) eine signifikante Korrelation zwischen dem Prozentsatz morphologisch normaler Spermien und der Fertilisationsrate der Stuten. In Übereinstimmung damit stellten LARSSON und BANE (1987) bei Traberhengsten, die niedrigere Abfohlraten als 45% erreichten, einen signifikant größeren Anteil von Spermienanomalien fest als bei Hengsten, die höhere Abfohlraten erzielten.

CLÉMENT et al. (2001) untersuchten 160 fertile Hengste und fanden signifikante Korrelationen zwischen der Stutenfertilität pro Zyklus und der Summe der Spermienanomalien und dem Anteil von Kopf-, Mittelstück- und Schwanzanomalien, abgelösten Köpfen und proximalen Zytoplasmatröpfchen. Sie entdeckten keine Korrelation zwischen der Fertilität und dem Prozentsatz von „crater“ und „knobbed“ Akrosomen, distalen Zytoplasmatröpfchen und der Summe der Haupt- und Endstückanomalien. In einem anderen Experiment verglichen CLÉMENT et al. (2001) 30 subfertile und 29 fertile Hengste. Die Spermien der subfertilen Tiere wiesen signifikant mehr Anomalien insgesamt auf (52% zu 30%), sowie mehr Kopfmalformationen (3,9% zu 2,1%), abgelöste Köpfe (9,7% zu 2,4%) und Schwanzdefekte (2,9% zu

1,5%). Der Anteil von proximalen und distalen Zytoplasmatröpfchen war in beiden Gruppen ähnlich. Die Autoren schlossen daraus, daß die Anomalien von Kopf bis Mittelstück mehr Einfluß auf die Fertilität haben als die übrigen Abweichungen.

HELLANDER et al. (1991) untersuchten einen Warmbluthengst mit circa 90% Anomalien im Bereich des Spermienmittelstücks und -schwanzes, welche hauptsächlich aus fehlenden Mikrotubuli im Axonem und unorganisierten Mittelstücke bestanden. Trotzdem erreichte der Hengst eine Trächtigkeitsrate von 24% pro Zyklus und 44% in der Saison. Die Autoren folgerten daraus, daß dieser Defekt, ähnlich dem „Dag defect“ bei Bullen, keinen Einfluß auf die Fruchtbarkeit hat. LANDIM et al. (1997) beschrieben dagegen einen Fall eines infertilen Araberhengstes, dessen Spermienhals in der Elektronenmikroskopie ein- oder beidseitig hervorquellendes Zytoplasma und unorganisierte Mikrotubuli aufwies. Die Spermien-schwänze zeigten zwar normale Schlagfrequenz, aber erreichten keine Vorwärtsbewegung. Die Autoren vermuten, daß ein primärer Defekt der Mikrotubulisyntese die Ursache der Infertilität war.

2.2.4 Konzentration

In der Humanmedizin wird bei Ejakulaten mit einer Konzentration von weniger als 10 Millionen Spermien/ml eine reduzierte Fertilität erwartet (HOFMANN und FREUNDL, 1986). LUDWIG und FRICK (1987) weisen allerdings darauf hin, daß zusätzlich andere Spermaparameter untersucht werden müssen und selbst dann eine sichere prognostische Aussage für den Einzelfall nicht möglich ist. Bei erhöhter Spermiendichte, der Polyzospermie, wird von einer verringerten Fruchtbarkeit und erhöhter Abortquote berichtet (REHAN et al., 1975).

In der Tiermedizin bietet sich im Rahmen der künstlichen Besamung die Möglichkeit, die Zusammenhänge zwischen der Qualität der Besamungsdosen und der erzielten Trächtigkeitsraten an einem relativ großen Zahlenmaterial zu überprüfen. So stellten JANUSKAUSKAS (1999) und JANUSKAUSKAS et al. (1996) beispielsweise fest, daß die Konzentration von aufgetauten TG Spermaproben vom Bullen signifikant positiv mit der In-vivo-Fruchtbarkeit korreliert. Proben mit 15×10^6 Spermien erzielten signifikant höhere Non-Return-Raten als die mit 10×10^6 Spermien.

CORREA et al. (1997) jedoch fanden bei den untersuchten tiefgefrorenen Proben nur eine positive Korrelation in der Gruppe der fertileren Bullen ($r=0,35$; $p<0,05$). In der Gruppe der weniger fertilen Bullen war die Korrelation zur Konzentration jedoch negativ ($r= -0,44$; $P<0,01$), wie auch in der Summe beider Gruppen ($r= -0,11$; $p=0,12$). Die Autoren kombinierten dann noch die Spermienzahl pro Besamungsdosis mit verschiedenen Faktoren, wie Motilität, normale Morphologie, intakten Akrosomen, etc. und gewannen so ähnliche Korrelationskoeffizienten wie zuvor beschrieben. Sie fanden signifikante Differenzen zwischen den Gruppen der mehr und der weniger fertilen Bullen bei den Werten der Gesamtzahl von geschwollenen Spermien ($10,2$ zu $7,7 \times 10^6$) und auch bei der „total function sperm fraction“ ($6,2$ zu $4,0 \times 10^6$), welche aus einer Multiplikation der Spermienzahl, Prozentteil der Motilität, normaler Morphologie und geschwollenen Spermien errechnet wird.

Bei Traberhengsten, die eine Abfohlrate von weniger als 45% erreichten, fanden LARSSON und BANE (1987) signifikant niedrigere Spermatozoenkonzentrationen als bei Hengsten, die höhere Abfohlraten erzielten.

3 VERSUCHSANSATZ UND METHODEN

3.1 Methodische Voruntersuchungen zur Kovács-Foote Färbung

Zur Überprüfung, ob die von Kovács und Foote ursprünglich für Bullen- und Eberspermien entwickelte Färbung auch für unterschiedlich aufbereitete Samenproben des Hengstes verwendet werden kann, weiterhin für die Bestimmung des optimalen Verdünnungsgrades und für die Darstellung der durch Einfrieren geschädigten Mittelstückmembran wurden zunächst mehrere Voruntersuchungen durchgeführt.

Die von Kovács für den Hengst modifizierte, aber an nur 3 Hengstspermaausstrichen getestete Färbung sieht im einzelnen folgende Schritte vor (KOVÁCS et al., 2000; persönliche Mitteilung NAGY, 2000):

Der Samen wird im Verhältnis 1:4 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Ein Tropfen dieser Mischung wird mit einem Tropfen 0,2%iger Trypanblaulösung (hergestellt aus 0,4% iger Trypanblaulösung, Sigma T 8154, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA, verdünnt 1:1 mit 0,9% NaCl-Lösung) auf einem Objektträger mit einem anderen Objektträger gemischt und sehr dünn ausgestrichen. Dieser wird fast senkrecht zum Luftrocknen aufgestellt.

Die Ausstriche werden für 2 Minuten in einer Fixierlösung, die aus 86 ml 1N HCl-Lösung, 14 ml 37%-ige Formaldehydlösung und 0,2 g Neutral Rot (Sigma N 2880) angerührt wurde, belassen. Diese Fixierlösung kann mehrfach verwendet werden. Es folgt ein Waschen mit Leitungswasser und destilliertem Wasser.

Für jeden Färbvorgang wird eine frisch zubereitete Giemsalösung benützt, bestehend aus 4 ml GiemsaGrundlösung (Sigma GS-500) und 50 ml destilliertem Wasser. Diese wird in

kleinen Färbeküvetten, mit 8 Schlitzten, gefüllt und 16 Objektträger werden darin über Nacht, für 15 Stunden, ohne Zudecken gefärbt.

Am nächsten Morgen werden die Ausstriche mit Leitungs- und destillierten Wasser gewaschen und in $H_2O_{\text{dest.}}$ für 2 Minuten belassen, um eine bessere Differenzierung der Zellen zu ermöglichen. Die Objektträger werden auf Rückseite mit einem Papiertuch von den Färberrückständen gereinigt und senkrecht zum Lufttrocknen aufgestellt. Dann deckt man die Ausstriche mit 24 x 60 mm großen Deckgläsern und Eukitt® (O. Kindler GmbH & Co., Freiburg i. Br.) ein. Pro Ausstrich werden 300 Spermien (1000-fache Vergrößerung, Hellfeld, Ölimmersion) ausgezählt und in die sieben Kategorien oder Spermienklassen nach KOVÁCS et al. (2000) eingeteilt (Abb. 3, Abb. 4).

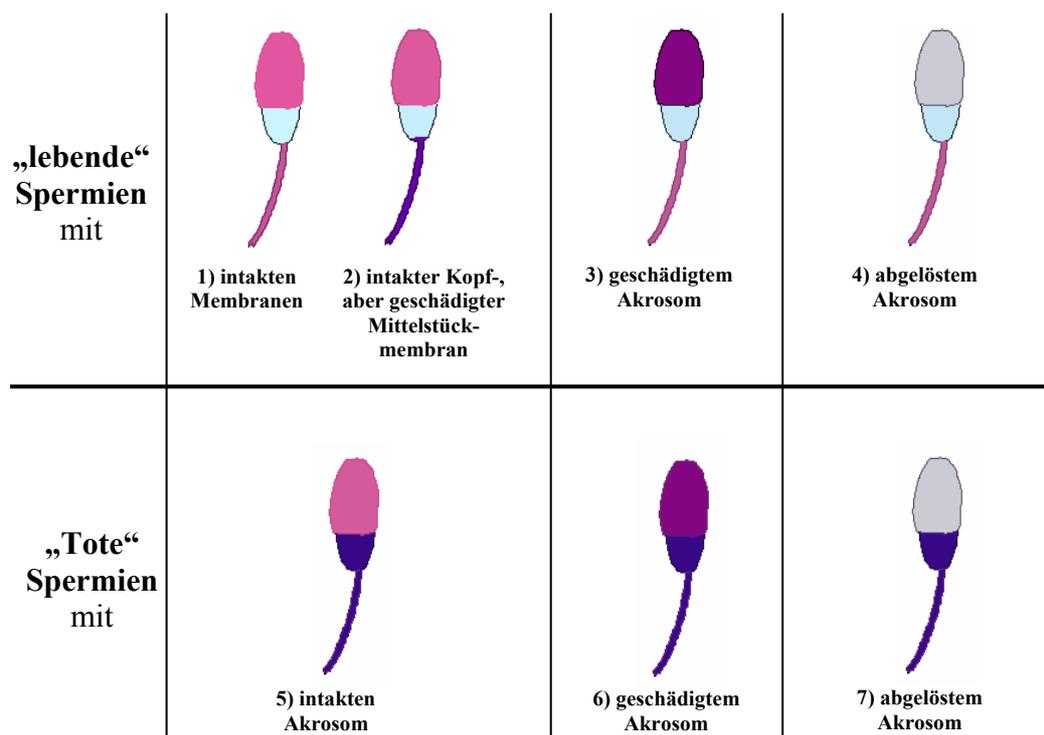


Abb. 3: Darstellung der 7 Spermienklassen der Kovács-Foote Färbung.

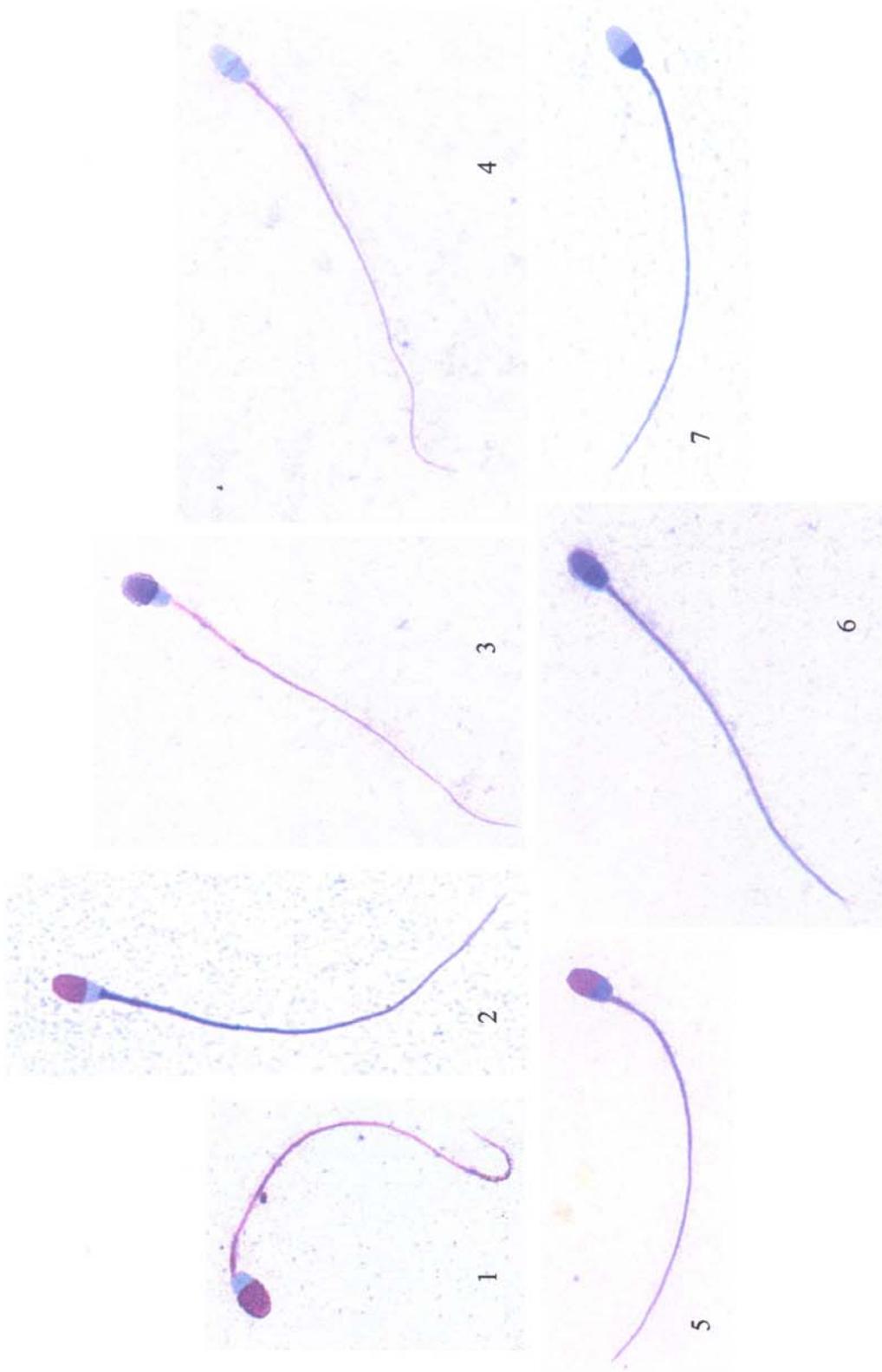


Abb. 4: Fotos der 7 Spermienklassen der Kovács-Footé Färbung: "lebende" Spermien mit intakten Membranen (1), mit intakter Kopf-, aber geschädigter Mittelstückmembran (2), mit geschädigtem (3) und abgelöstem Akrosom (4). „Tote“ Spermien mit intaktem (5), geschädigtem (6) und abgelöstem Akrosom (7).

Spermien mit geschädigten Membranen („tote Spermien“) sind im postakrosomalen Bereich und im Mittelstück für Trypanblau durchlässig, was eine dunkelblaue Färbung ergibt. Nicht geschädigte („lebende“) Spermien erscheinen im postakrosomalen Bereich hellblau und das intakte Mittelstück ist rosa angefärbt. Die Giemsa-Lösung färbt in einem weiteren Schritt die Akrosome an und zeigt durch unterschiedliche Farben, ob sie intakt (rosa), geschädigt (violett) oder abgelöst (hellgrau) sind (persönliche Mitteilung NAGY, 2000).

3.1.1 Einfluß des Schockgefrierens auf das Färbeverhalten der Spermien

Zum Überprüfen, ob die Spermien mit hellblau bzw. dunkelblau gefärbten postakrosomalen Bereich wirklich jeweils die „lebenden“ bzw. „toten“ Spermien darstellen, wurden vor der eigentlichen Untersuchung zwei Samenproben überprüft (Probe 1: Warmbluthengst α , Nativsamensamen; Probe 2: Warmbluthengst β , Samen mit Magermilchverdünner). Beide Proben wurden in der oben genannten Weise gefärbt, dann ein Teil in flüssigen Stickstoff schockgefroren und dieser im Verhältnis 1:1 mit dem ursprünglichen Samen vermischt. Diese drei Untergruppen (Ausgangssamen, schockgefroren, gemischt) wurden jeweils mit der Kovács-Foote und Bromphenolblau-Nigrosin Färbung untersucht.

3.1.2 Einfluß der Akrosomreaktion auf die Anfärbbarkeit des Akrosoms

Zum Kontrollieren der Akrosomanfärbung wurde eine Nativsamensamenprobe mit Kalziumionophoren (A 23187) versetzt, um eine künstliche Akrosomreaktion auszulösen. Es wurden von der Ausgangsprobe und nach $\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$ und 2 Stunden Reaktionszeit Ausstriche mit der Kovács-Foote Färbung angefertigt.

3.1.3 Nachweis der Immotilität mittelstückgeschädigter Spermien

Von drei Hengsten (Araber, Haflinger, Warmblut) wurde je ein Ejakulat vor und nach dem Tiefgefrieren untersucht (Verdünner nach MARTIN et al. (1979), computerassistiertes Ein-

friergerät Ice Cube *Minitüb*, 0,5 ml Pailletten). Nach dem von MEYERS et al. (1995) beschriebenen Percoll-Verfahren wurden diese beide Proben jeweils zusätzlich in eine mehr und eine weniger motile Fraktion aufgeteilt. Anhand von Ausstrichen mit der Kovács-Foote Färbung wurde der Anteil der komplett membranintakten Spermien und den Zellen mit Mittelsstückschädigungen ausgewertet.

3.1.4 Wiederholungsauszahlung

Alle Ausstriche der Arbeit wurden durch den selben Untersucher ausgewertet. Die Kovács-Foote Färbung ist eine neue Methode, die hier erstmals in größeren Umfang für Hengstsamen verwendet wurde. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden 10 zufällig ausgewählte, codierte Ausstriche nochmals ausgewertet. Es handelte sich um eine Nativsamen-Probe, zwei flüssigkonservierte mit Eidotterverdünner, fünf mit Magermilchverdünner und zwei tiefgefrorene Samenproben.

Zur Überprüfung, daß der Ausstrich gleichmäßig ist und in verschiedenen Regionen ähnliche Ergebnisse liefert, wurden bei allen Kovács-Foote Ausstrichen die 300 Spermien in drei unterschiedlichen Bereichen des Objektträgers ausgezählt (à 100 Spermien).

3.1.5 Einfluß des Samenverdünners und der Verdünnungsstufe

Von drei Hengsten, einem Warmblut- und zwei Araberhengsten, wurde je ein Ejakulat verwendet. Dieser Samen wurde nach dem split-sample Verfahren in Nativsamen, mit Magermilch- (Kenney), Eidotter- (Dimitropoulos) und Tiefgefriererdünner (Tischner bei Warmbluthengst, Kenney bei Araberhengsten, je vor und nach dem Einfrieren) unterteilt (Abb. 5). Die Zusammensetzung der Verdünner ist im Anhang angegeben.

Für die Kovács-Foote Färbung muß der Samen mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden, das Verdünnungsverhältnis ist jedoch bei verschiedenen Tierarten und Samenverdünnern unterschiedlich (4-100fach). Es wird vermutet, daß beim Hengst die beste Verdünnung diejenige von 1 Teil Samen und 4 Teilen NaCl-Lösung ist. Bei eidotterhaltigem Verdünnner sollte diese höher sein, weil sonst die Eidotterpartikel den Farbstoff absorbieren und falsch positive Ergebnisse mit vermehrt „membranintakten“ Spermien entstehen (persönliche Mitteilung, NAGY, 2000). Deswegen wurden hier verschiedene Verdünnungsstufen bei unterschiedlichen Samenaufbereitungsarten getestet.

Die Differenzierbarkeit der Spermien variiert stark bei verschiedenen Ausstrichen, dies wurde jedoch noch nie untersucht. So wurden die 5 vorher genannten Proben jeweils unverdünnt und im Verhältnis 1:1, 1:4 und 1:6 mit NaCl-Lösung verdünnt gefärbt. Um ein verlässlicheres Zahlenmaterial zu haben, wurde von jeder dieser Untergruppen je 3 Ausstriche angefertigt (Abb. 5).

Zur Kontrolle wurden zusätzlich von den Ausgangsproben je drei Bromphenolblau-Nigrosin Ausstriche angefertigt. Diese insgesamt 225 Ausstriche wurden kodiert, um eine Beeinflussung beim Auswerten zu vermeiden. Es wurden pro Ausstrich je 300 Spermien ausgezählt und in membrangeschädigt oder -intakt bei den Bromphenolblau-Nigrosin Ausstrichen und in die 7 Klassen bei den Kovács-Foote Färbung eingeteilt.

Bei der Kovács-Foote Färbung wurde noch zusätzlich die Auswertbarkeit des Ausstriches bewertet, um den idealen Verdünnungsgrad mit NaCl-Lösung zu erforschen. Der Ausstrich

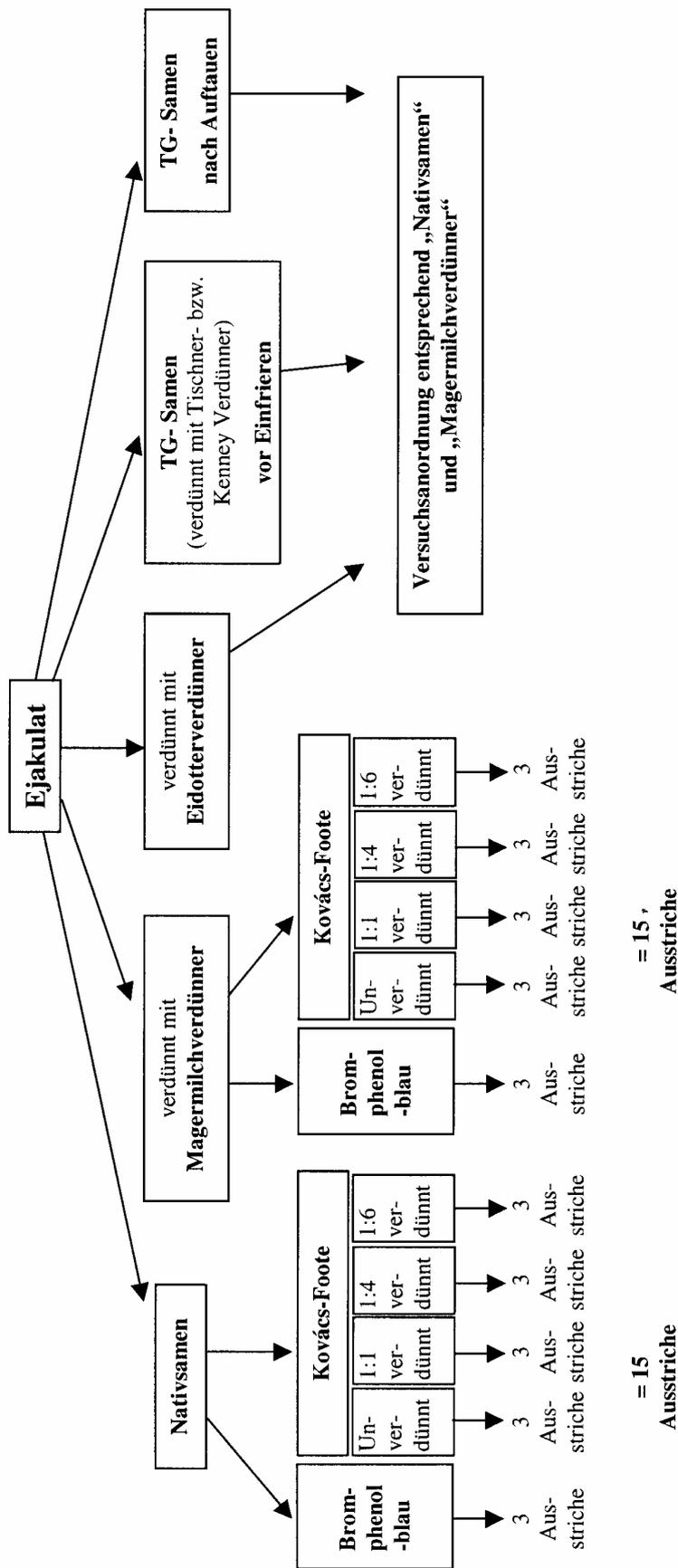


Abb. 5: Split- Sample Versuchsanordnung von jedem der drei Ejakulate. Pro Hengst wurden also 5 x 15 = 75 Ausstriche untersucht. Zu der Untersuchung wurden 3 Hengste à 75 Ausstriche einbezogen.

wurde bewertet aufgrund der Differenzierbarkeit der Spermienklassen, Spermienkonzentration und Hintergrund. Bei manchen Ausstrichen lassen sich die Spermien sehr gut differenzieren, die Farben der einzelnen Spermienabschnitte setzen sich deutlich ab und bei anderen ist dies nicht der Fall. Die Konzentration der Spermien auf dem Ausstrich sollte normal sein, d.h. zu dichte, übereinanderliegende oder sehr vereinzelt Spermien erschweren das Auszählen. Der Hintergrund bei der Kovács-Foote Färbung ist relativ schmutzig, was auch die Auswertung erschwert, und so wurden Ausstriche mit sauberem Hintergrund besser benotet. Aufgrund der Endbewertung der genannten Kriterien wurde der Ausstrich in 7 Notenstufen eingeordnet, von + + + als idealer Ausstrich über +/- bis - - - als sehr schlechter Ausstrich.

3.1.6 Veränderung der Mittelstückmembran nach dem Einfrieren/Auftauen

Ein zusätzliches Experiment wurde durchgeführt, um das regelmäßige Vorkommen und die Häufigkeit geschädigter Mittelstückmembranen nach dem Tiefgefriervorgang zu untersuchen. Von drei Hengsten (X: Araber, Y: Haflinger, Z: Warmblut) wurden je 10 Ejakulate gewonnen und direkt vor und nach dem Tiefgefrieren Ausstriche angefertigt (Verdünner nach MARTIN et al. (1979), computerassistiertes Einfriergerät Ice Cube *Minitüb*, 0,5 ml Pailletten).

Zur Überprüfung des Vorkommens der Mittelstückschädigung bei einer größeren Anzahl von Hengsten wurde je ein Ejakulat von 21 verschiedenen Hengsten (Hengste A-U: 18 Warmblut, 2 Araber, 1 Traber) vor und nach dem Tiefgefrieren (Verdünner nach MARTIN et al. (1979), Computer-Einfriergerät) mit beiden Färbungen gefärbt.

3.2 Hengste und Samenproben

Es wurde insgesamt 181 Besamungsdosen von 34 in der Besamung eingesetzten Hengsten untersucht. Die Proben stammten aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik

(70 Proben) und von der bayerischen Pferdebesamungsstation Schwaiganger (111 Proben, Tabelle 1). In den meisten Fällen handelte es sich um mit Eidotterverdünner versetzten flüssigkonservierten Proben, gefolgt von Proben mit Magermilchverdünner, den nativen Samenportionen und tiefgefrorenem (TG-) Samen.

Tabelle 1: Anzahl, Alter (Durchschnitt, Minimum, Maximum) und Rassen der Hengste und die Art der untersuchten Samenproben.

Rassen	Anzahl der Hengste	Alter in Jahren	Anzahl der Samenproben				Summe
			Nativ	flüssigkonserviert mit Eidotterverdünner	Magermilchverdünner	TG-Samenportionen	
Warmblut	20	7,6 (3-22)	5	83	35	4	127
Araber	8	9,8 (5-21)	8	5	2	9	24
Kaltblut	2	5,5 (5-6)	-	19	2	-	21
Quarter Horse	2	8 (6-10)	1	1	1	-	3
Vollblut	1	18	-	-	4	-	4
Traber	1	16	-	-	2	-	2
Summe	34	Ø= 8,5	14	108	46	13	181

Das Volumen betrug bei Nativsamen und flüssigkonservierten Samen 15-30 ml. Das tiefgefrorene Sperma war in 0,5 ml Pailletten (1 Ausnahme als 4 ml Makrotüb) portioniert. Alter und Rasse der eingesetzten Hengste sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

3.3 Untersuchungsablauf

Die Temperatur der flüssigkonservierten Besamungsdosen wurde bei Ankunft mit einem digitalen Thermometer kontrolliert.

3.3.1 Motilität

Direkt nach der Besamung folgte in der Restmenge der Besamungsdosis eine Schätzung der Spermienmotilität von der Autorin und bis zu 6 weiteren Personen (Tierärzten und technischen Assistenten). Die Spermien wurden in immotile, lokal motile, Kreisläufer und vorwärtsbewegliche eingeteilt und dies als Prozentsatz ausgedrückt. Dafür wurde ein Samentropfen auf einem vorgewärmten Objektträger mit einem Deckglas abgedeckt und durch ein Mikroskop mit vorgewärmten Heiztisch bei Phasenkontrast und 400-facher Vergrößerung betrachtet.

Zusätzlich wurde die Motilität der Proben mit einem computerassistierten Samenanalyseprogramm (CMA Motion Analyser, V 2.0, Fa. *Strömberg-Mika*, 1993-1997 MTM SA, Schweiz; Computer *ARTIST* Pentium I 64 KB RAM, Monitor *Panasonic* WV-5350) ausgewertet. Dafür wurden von 3 Samentropfen jeweils 4 unterschiedliche Felder in einer Makler-Kammer (Fa. *Sefi-Medical Instruments*, Haifa, Israel) mit einem Videomikrographieset (Mikroskop *Olympus* BH-2, Videokamera *AVT-Horn* 14520, S-VHS Videorekorder *Panasonic* AG-7330, Monitor *Sony* PVM-1442QM) auf Video aufgenommen. Alle Samenproben wurden unverdünnt gefilmt.

Die Einstellungsparameter der Datei „cma.ini“ der Software wurden leicht modifiziert, um eine korrekte Erkennung der Spermien und ihrer Bewegungen zu ermöglichen (genaue Einstellungen siehe Anhang). Zusätzlich wurden die Spermien mit den erprobten Einstellungen für Hengstsperma von Frau Dr. Warnke (Forschungsinstitut für die Biologie landwirtschaftlicher Nutztiere Dummerstorf) nochmals ausgewertet. Bei jeweils ca. 500 Spermien pro Probe wurde ihre Bewegungsform (inmotil, lokal motil, Kreisläufer und vorwärtsbeweglich) und Geschwindigkeit erfaßt (velocity curvilinear line: VCL, straight line: VSL und averaged path: VAP).

3.3.2 Membranintegrität

Von der Samenprobe wurden zügig dünne Bromphenolblau-Nigrosin Ausstriche auf ange-wärmten Objektträgern angefertigt. Die Einteilung der je 300 ausgezählten Spermien erfolgte in Zellen mit durchlässiger (gefärbt), geschädigter (teilweise angefärbt) und intakter Membran (ungefärbt; 1000fache Vergrößerung, Hellfeld, Ölimmersion).

Zusätzlich wurden von allen Samenproben Ausstriche mit der Kovács-Foote Färbung, wie zuvor unter 3.1 beschrieben, angefertigt. Es wurde bei allen Samenproben der gleiche Ver-dünnungsgrad (1:4 Samen zu physiologischer Kochsalzlösung) verwendet.

3.3.3 Morphologie

Der Anteil morphologisch anormaler Zellen wurde bei je 300 Spermien anhand der Kovács-Foote Ausstriche ermittelt. Nach dem Schema von LEIDL et al. (1971) wurden die Spermien in normale Formen, primäre (Kopf-, Mittelstück-, Schwanz-Anomalien, Doppelmissbildun-gen) und sekundäre Missbildungen (abgelöste Köpfe, abgelöste Akrosome, Krümmlinge) eingeteilt. Gleichzeitig wurde die Anzahl der proximalen und distalen Zytoplasmatröpfchen ausgezählt.

3.3.4 Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration der Spermaprobe erfolgte durch Schätzung und mit der Bürker-Türk Zählkammer.

3.4 Insemination der Stuten

Mit diesen 181 Samenportionen wurden insgesamt 143 Stuten während der Saison 2000 (Februar- August) besamt (Tabelle 2). Ein Teil der Stuten (35) stand in der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der LMU. Die anderen 108 Stuten, welche die Samendosen

von der Besamungsstation Schwaiganger zugeschickt bekamen, waren in ganz Deutschland verteilt. Die Rassen der besamten Stuten waren jeweils die gleichen wie die der Hengste.

Tabelle 2: Stuten, die in der Klinik bzw. mit Samen von der Besamungsstation besamt wurden, ihre Anzahl und Alter (Durchschnitt, Minimum, Maximum) und die Anzahl und Art der Samenportionen.

	Anzahl der Stuten	Alter in Jahren	Anzahl der Samenportionen				Summe	Dosen pro Stute
			Nativ	flüssigkonserviert mit Eidotterverdünner	Magermilchverdünner	TG-Samenportionen		
Klinik	35	10,8 (3-21)	14	17	26	13	70	2,0 (1-7)
Schwaiganger	108	9,5 (2-22)	-	91	20	-	111	1,0 (1-3)
Summe	143	$\bar{\varnothing}=9,8$	14	108	46	13	181	$\bar{\varnothing}=1,3$

Die 35 in der Klinik besamten Stuten wurden routinemäßig einer gynäkologischen Untersuchung inklusive regelmäßiger Follikelkontrolle (im circa 8-stündigen Abstand) mit Hilfe der Ultraschall-Methode unterzogen. Auf diese Weise konnte der Ovulationszeitpunkt relativ genau bestimmt werden. Bei den meisten Besamungen (56 von 70) wurde die Ovulation hormonell eingeleitet. Neun Stuten waren nullipar und 26 multipar (1- 8 Fohlen).

Die übrigen 108 Stuten wurden von unterschiedlichen Tierärzten besamt. Es konnte nur das Datum der Besamung und der Besamungserfolg, nicht die Vorgeschichte und Ovulationszeitpunkt der Stute ermittelt werden.

Da aus organisatorischen Gründen eine Untersuchung der von der Besamungsstation Schwaiganger an die Besamungstierärzte ausgelieferten Portionen nicht möglich war, versandte die Besamungsstation montags, mittwochs und freitags per Nachtexpress Parallelproben an die Klinik in München. Auf diese Weise konnten diese am nächsten

Morgen ungefähr zeitgleich mit der Ankunft der Samenproben bei den Tierärzten untersucht werden. In den meisten Fällen konnte pro Stute jeweils nur eine Besamungsdosis beurteilt werden, weil bei Nachbesamungen, für die Sperma an den restlichen Wochentagen versandt wurde, keine Parallelproben für die Untersuchung an die Klinik verschickt werden konnten.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SAS System und mit dem Programm StatView® (beide von SAS Institute Inc., North Carolina, USA). Es wurden Mittelwerte, Standardabweichungen, Korrelationskoeffizienten und Differenzen berechnet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der methodischen Voruntersuchungen zur Kovács-Foote Färbung

4.1.1 Einfluß des Schockgefrierens auf das Färbeverhalten der Spermien

Mit diesem Versuch wurde überprüft, ob der Anteil gefärbter bzw. ungefärbter Spermien mit dem Anteil der „lebenden“ bzw. „toten“ Spermien übereinstimmt. Im Nativ- bzw. flüssigverdünnten Samen wurde bei der Bromphenolblau-Nigrosin und der Kovács-Foote Färbung ein ähnlicher Anteil an kopfmembranintakten Spermien gefunden (Tabelle 3). Nach dem Schockgefrieren in flüssigen Stickstoff waren in Probe 1 keine „lebenden“ Spermien vorhanden, in Probe 2 noch ca. 10%. Nach Mischen von Nativ- bzw. flüssigkonservierten und schockgefrorenen Samen in Verhältnis von 1:1 sank der Anteil kopfmembranintakter Spermien in beiden Proben sowohl nach der Bromphenolblau- als auch nach der Kovács-Foote-Färbung auf annähernd die Hälfte der Werte im Nativ- (bzw. flüssigkonservierten) Samen ab (Tabelle 3). Die Kovács-Foote Färbung erkennt also ebenso wie die erprobte Bromphenolblau-Nigrosin Färbung relativ korrekt den Anteil an membranintakten Spermien.

Tabelle 3: Vergleich des Gesamtanteils der „lebenden“, d.h. kopfmembranintakten, Spermien bei der Kovács-Foote und Bromphenolblau-Nigrosin Färbung (je 2 Samenproben), in Nativ- (Probe 1) bzw. flüssigkonservierten Samen (Probe 2), nach Schockgefrieren mit flüssigen N₂ und nach Mischung 1:1.

	kopfmembranintakte Spermien Probe 1 (%)		kopfmembranintakte Spermien Probe 2 (%)	
	Bromphenolblau- Nigrosin	Kovács-Foote	Bromphenolblau- Nigrosin	Kovács-Foote
Ausgangssamen	57,3	52	97,1	91,5
Schockgefroren	0	0	11,7	7,5
Mischung 1:1	21,6	23,5	59,1	60

4.1.2 Einfluß der Akrosomreaktion auf das Färbeverhalten der Spermien

Ein intaktes, geschädigtes oder abgelöstes Akrosom wird von der Kovács-Foote Färbung durch unterschiedliche Farben dargestellt. So wurde bei einer Samenprobe mit Calcium-

Ionophoren eine künstliche Akrosomreaktion eingeleitet, um zu überprüfen, ob diese Farben wirklich dem beschriebenen Akrosomzustand entsprechen. Es wird erwartet, daß die Akrosome erst geschädigt werden und sich dann ablösen, sowohl bei den „lebenden“ als auch bei den „toten“ Spermien, letztere werden nach längerer Inkubationszeit wohl überwiegen.

In diesem Versuch fiel bei zunehmender Einwirkungszeit der Ca-Ionophoren die Anzahl der „lebenden“ Spermien mit intakten Akrosom steil ab (Abb. 6). Der Anteil der „lebenden“ Spermien mit geschädigten Akrosom stieg nach einer halben Stunde auf 6%, um danach wieder abzufallen. Der Prozentsatz der abgelösten Akrosome bei den „lebenden“ Spermien stieg stetig von 0% am Anfang, bis auf 5% nach 2 Stunden der Calcium-Ionophoren-Behandlung. Aufgrund ihrer geringen Anzahl wurden beide letzteren und die Spermien mit Mittelstückschädigungen nicht in der Grafik dargestellt. Bei den „toten“ Spermien ist der Anteil der geschädigten und abgelösten Akrosomen erst annähernd gleich hoch. Zum Schluß überwiegt der Anteil von Zellen mit abgelösten Akrosomen (Abb. 6).

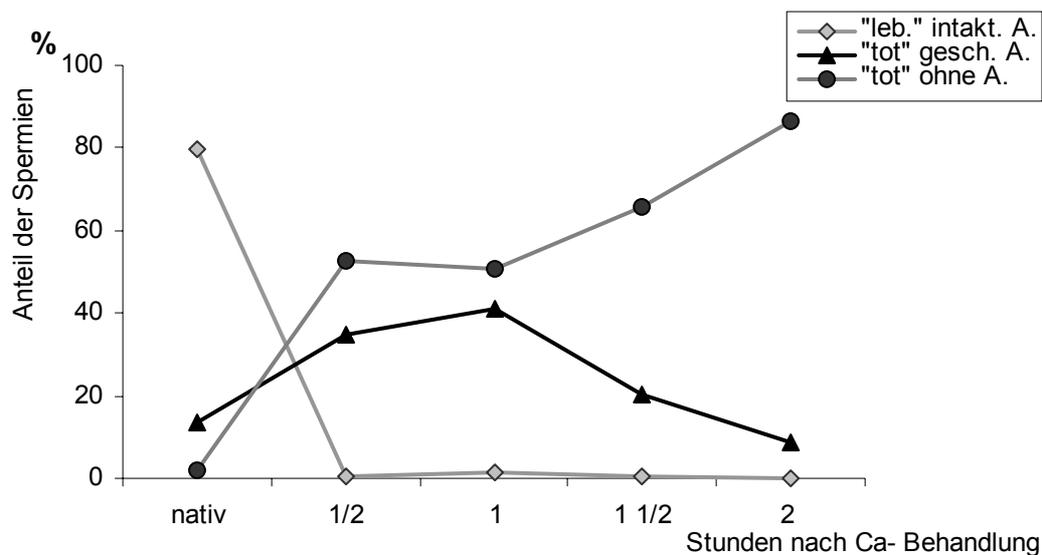


Abb. 6: Akrosombeschaffenheit nach Behandlung mit Ca- Ionophoren bei drei Spermienklassen der Kovács-Foote Färbung („lebende“ Spermien mit intakten Akrosom, „tote“ Spermien mit geschädigten bzw. ohne Akrosom).

4.1.3 Nachweis der Immotilität mittelstückgeschädigter Spermien

Je ein Ejakulat von drei Hengsten (jeweils vor und nach Tiefgefrieren) wurde durch ein Percoll-Verfahren in eine motilere und weniger motile Fraktion getrennt. Vor der Percoll-Behandlung betrug die Vorwärtsmotilität 25-50%. In der angereicherten Fraktion erreichte diese dann einen Prozentsatz von 40-65% und in der weniger motilen Fraktion betrug sie 5-15%.

Beim Vergleich der Membranintegrität und den Mittelstückschädigungen aus den beiden Fraktionen zeigte sich, daß in der motilen Fraktion sich viele membranintakte und wenige mittelstückgeschädigte Spermien befanden. In der weniger motilen Fraktion war das Verhältnis umgekehrt (Abb. 7). Diese Verteilung fand sich bei allen 6 Proben.

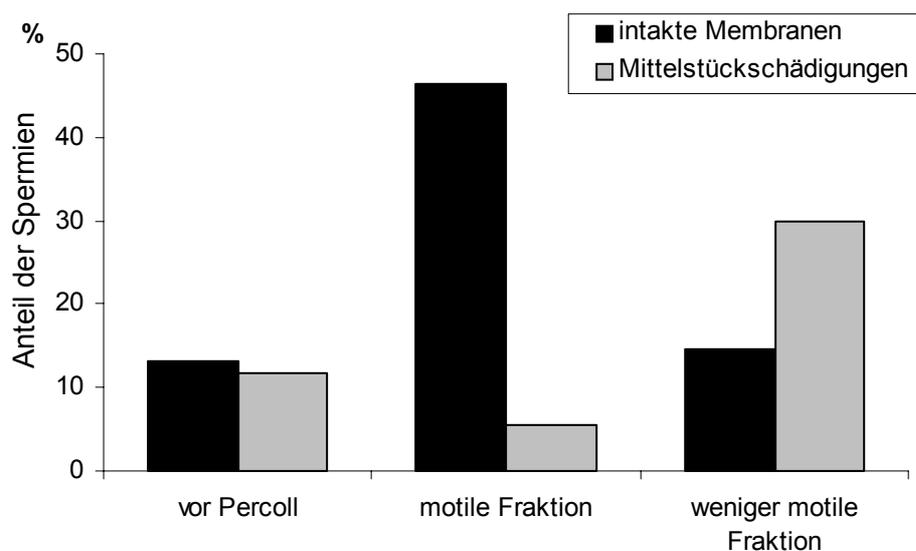


Abb. 7: Anzahl der Spermien mit intakten Membranen, bzw. Mittelstückschädigungen bei 6 Samenproben vor Percoll-Verfahren und den beiden Fraktionen nach Percoll.

4.1.4 Wiederholungsauszahlung

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Kovács-Foote Färbung wurden 10 zufällig ausgewählte, codierte Ausstriche zweimal ausgewertet. Die Abweichungen zwischen beiden Auswertungen variierten von 0,3 bis 6% in den jeweiligen Spermienklassen nach Kovács-Foote (Abb. 8).

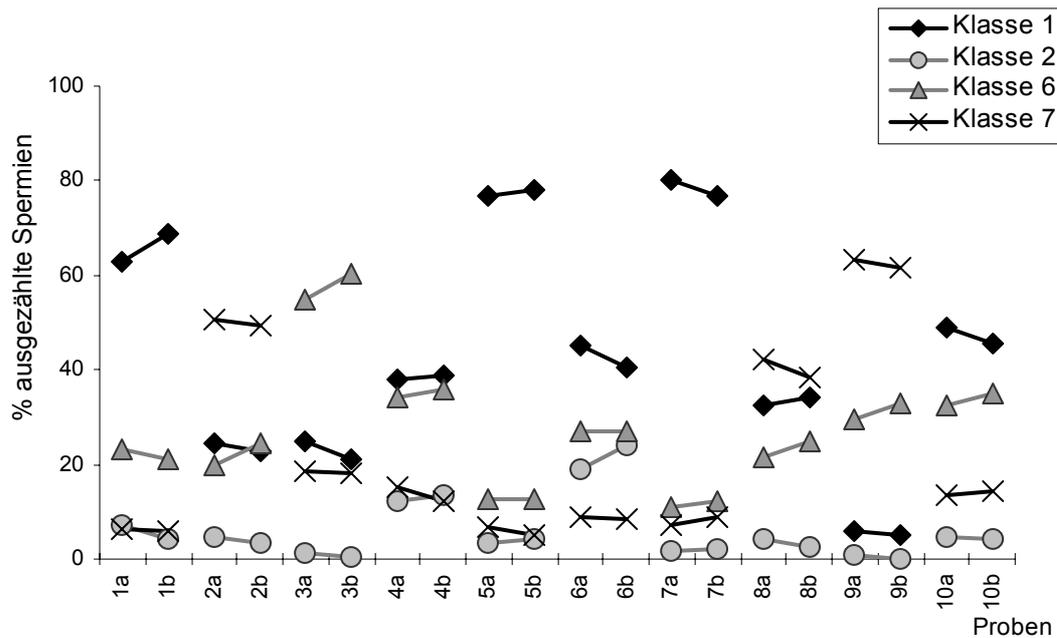


Abb. 8: Abweichungen der Spermienprozentzahlen bei der Wiederholungsauswertung (b) im Vergleich zur ersten Auszählung (a) in vier verschiedenen Spermienklassen nach der Kovács-Foote Färbung (Klasse 1: intakte Kopf- und Mittelstückmembran; 2: intakte Kopf-, geschädigte Mittelstückmembran; 6: geschädigte Kopfmembran und Akrosom; 7: geschädigte Kopfmembran, abgelöstes Akrosom).

Bei allen Ausstrichen, auch in den folgenden Kapiteln, wurden dreimal je 100 Spermien an unterschiedlichen Bereichen des Objektträgers ausgezählt. Dies dient der Überprüfung, daß der Ausstrich gleichmäßig ist und an den verschiedenen Stellen ähnliche Ergebnisse liefert. Es gab keine Unterschiede zwischen den 3 einzelnen Teilwerten in den verschiedenen Spermienklassen der Kovács-Foote Färbung ($p > 0,05$).

4.1.5 Einfluß des Samenverdünnerns und der Verdünnungsstufe

Von den drei Hengsten wurde jeweils 5 unterschiedliche Samenaufbereitungsarten untersucht: Nativsamen, flüssigkonserviert mit Magermilch- und Eidotterverdünner, mit Tiefgefrier- verdünner vor und nach dem Einfrieren. Zur Überprüfung des besten Verdünnungsgrades mit physiologischer Kochsalzlösung, wurden 4 unterschiedliche Grade getestet (unverdünnt, 1 Portion Samen: 1 Portion NaCl, 1:4 NaCl, 1:6 NaCl).

Wenn man die Anzahl der komplett membranintakten (sowohl Kopf- als auch Mittelstückmembranen) Spermien betrachtet, gibt es Unterschiede zwischen den NaCl-Verdünnungen (Abb. 9). Nicht mit NaCl-Lösung verdünnter Samen zeigte bei allen Aufbereitungsarten den größten Anteil an intakten Spermien. Mit Ausnahme der Proben mit Magermilchverdünner fiel bei steigendem Verdünnungsgrad der Prozentsatz der membranintakten Zellen ab.

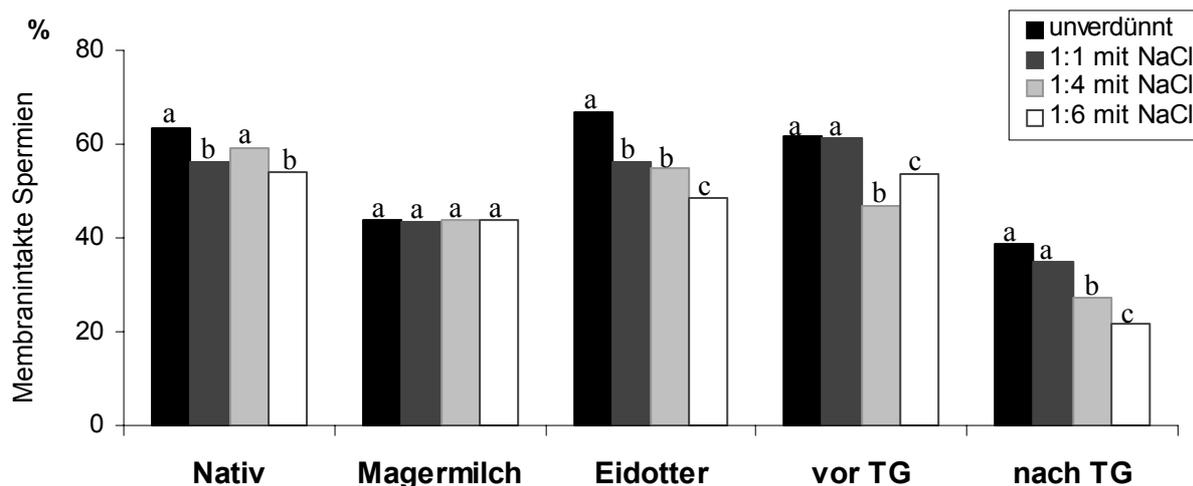


Abb. 9: Anzahl der membranintakten Spermien von allen 3 Hengsten bei 5 verschiedenen Samenaufbereitungsarten und mit je 4 Verdünnungsstufen mit physiologischer NaCl-Lösung (Nativsamen, mit Magermilchverdünner, mit Eidotterverdünner, vor dem Tiefgefrierprozess, nach dem Tiefgefrierprozess). Jede Säule zeigt den durch 2700 ausgezählten Spermien ermittelten Wert (bei unterschiedlichen Buchstaben innerhalb der Aufbereitungsartgruppen Differenz $p < 0,05$).

Die höchste Anzahl von membranintakten Spermien in den Untergruppen ohne NaCl-Verdünnung hatten die Proben mit Eidotterverdünner (66,8%), gefolgt von denen als Nativsamen (63,4%), mit Tiefgefrierverdünner vor dem Einfrieren (61,8%), mit Magermilchverdünner (44,0%) und mit Tiefgefrierverdünner nach dem Auftauen (35,5%). Bei den drei einzelnen Hengsten waren die Ergebnisse analog (nicht dargestellt).

Auch wenn man die Mittelwerte der komplett membranintakten Spermien der 4 NaCl-Verdünnungsgruppen betrachtet, zeigen sich Unterschiede in den verschiedenen Aufbereitungsarten (Abb. 10). Bei dem Nativsamen, den Proben mit Eidotterverdünner und denen vor dem Tiefgefrieren ist die Anzahl der intakten Spermien am höchsten. Die Auswertung der

gleichen Proben mit der Bromphenolblau-Nigrosin Färbung zeigt eine ähnliche Tendenz hinsichtlich der Häufigkeit an membranintakten Spermien, die Bromphenolblau-Nigrosin ergab jedoch höhere Werte als die Kovács-Foote Färbung. Diese Differenz war mit Ausnahme der Nativsamensproben signifikant ($p < 0,05$; Abb. 10).

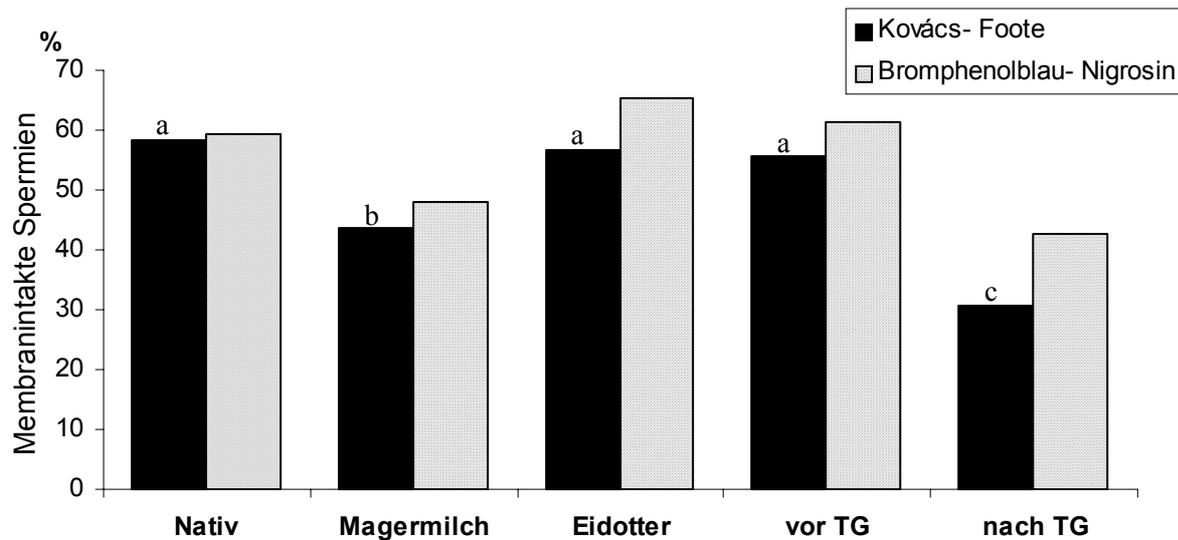


Abb. 10: Mittelwerte der membranintakten Spermien nach der Kovács-Foote und Bromphenolblau-Nigrosin Färbung bei unterschiedlichen Samenaufbereitungsarten (Nativsamen, mit Magermilchverdünner, mit Eidotterverdünner, vor dem Tiefgefrierprozess, nach dem Tiefgefrierprozess, bei unterschiedlichen Buchstaben Differenz $p < 0,001$).

Betrachtet man die Unterschiede zwischen den verschiedenen NaCl-Verdünnungsgraden für alle Aufbereitungsarten zusammen, so sieht man eine Verminderung der membranintakten Spermien bei ansteigendem Verdünnungsgrad (Abb. 11).

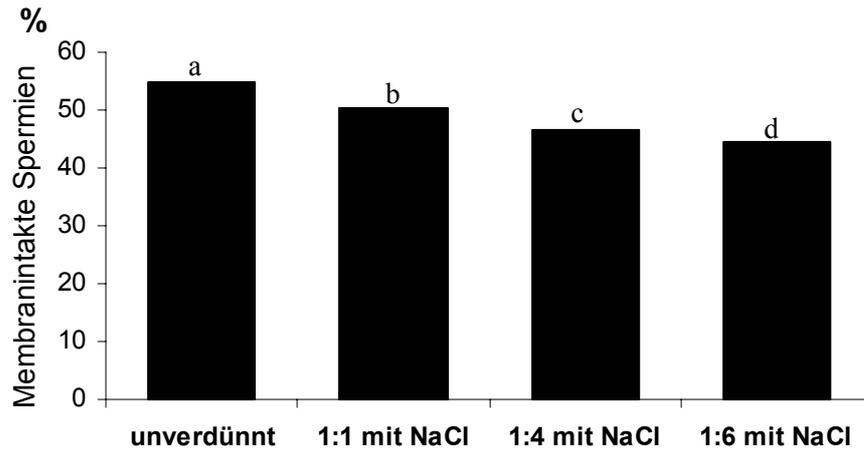


Abb. 11: Mittelwerte der membranintakten Spermien nach Kovács-Foote Färbung, alle Aufbereitungsarten zusammen, nach dem Verdünnungsgrad mit physiologischer NaCl-Lösung sortiert (bei unterschiedlichen Buchstaben Differenz $p < 0,05$).

Die Mittelstückschädigungen steigen dagegen bei höheren NaCl-Verdünnungsgraden an, mit Ausnahme bei den Proben nach dem Tiefgefrieren (Abb. 12). Die Mittelwerte der Mittelstückschädigungen der Proben ohne Tiefgefriervorgang sind relativ niedrig: 2,8% bei Nativsamen, 5,3% bei Magermilch-, 2,2% bei Eidotter- und 4,9% beim Tiefgefrierer verdünner. Nach dem Auftauen werden dagegen durchschnittlich 16,1% mittelstückgeschädigte Spermien gezählt. Dieser Anstieg ist in jeder NaCl-Untergruppe deutlich zu sehen ($p < 0,01$).

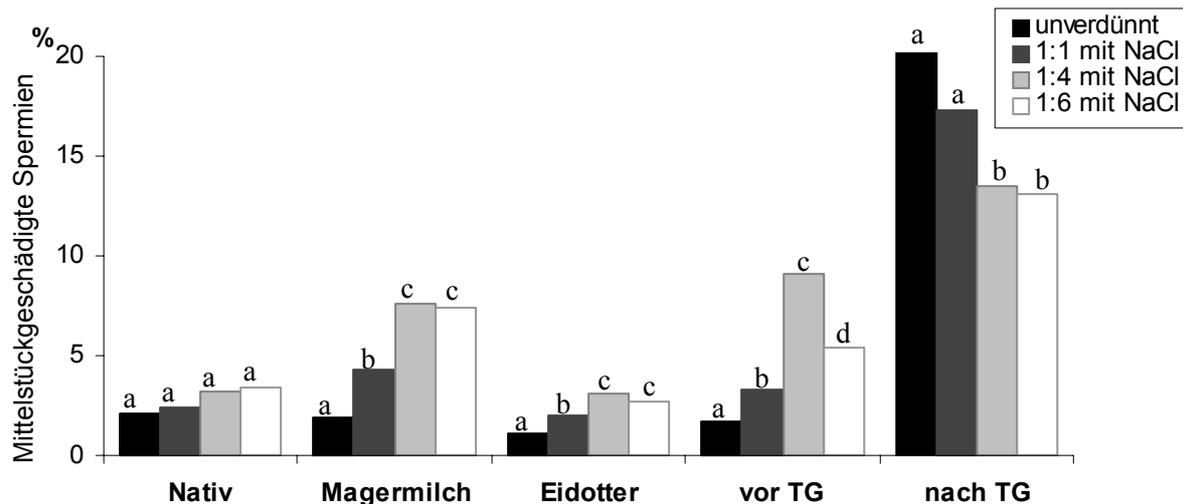


Abb. 12: Anzahl der mittelstückgeschädigten Spermien von allen 3 Hengsten bei 5 verschiedenen Samenaufbereitungsarten und mit je 4 Verdünnungsstufen mit physiologischer NaCl-Lösung (Nativsamen, mit Magermilchverdünner, mit Eidotterverdünner, vor dem Tiefgefrierprozess, nach dem Tiefgefrierprozess). Jede Säule zeigt den durch 2700 ausgezählten Spermien ermittelten Wert (bei unterschiedlichen Buchstaben innerhalb der Aufbereitungsart Differenz $p < 0,05$).

Der Anteil der geschädigten und abgelösten Akrosomen der „toten“ Spermien ändert sich bei unterschiedlichen Aufbereitungsarten und Verdünnungsstufen mit NaCl-Lösung praktisch nicht. Durch den Tiefgefrierprozess steigt bei einem Hengst der Anteil von geschädigten Akrosomen (um 4,6%) und bei beiden anderen der Prozentsatz von abgelösten Akrosomen um 0,2% und 11,6%.

Da die Auswertbarkeit der Kovács-Foote Ausstriche sehr variiert, wurde getestet, welche Verdünnungsstufe mit NaCl-Lösung sich bei den unterschiedlichen Aufbereitungsarten für diesen Aspekt am besten eignet. In der Note wurden hauptsächlich die Differenzierbarkeit der Spermienklassen, aber auch die Konzentration und die Sauberkeit des Hintergrundes mit eingeschlossen. Die Proben des Nativsamens, mit Magermilch- und Eidotterverdünner lassen sich generell besser auswerten als die mit Tiefgefrierverdünner (Abb. 13). Bei den ersten beiden Aufbereitungsarten ergaben die Ausstriche mit einer NaCl-Verdünnung von 1:1 und 1:4 die besten Benotungen. Die Verdünnung von 1:1 mit NaCl-Lösung erzielte bei den

Proben mit Eidotterverdünner die durchschnittlich beste Benotung. Bei den Tiefgefrierverdünnern ergaben die höheren Verdünnungsstufen mit NaCl bessere Ergebnisse (Abb. 13). Es gab jedoch auch Unterschiede zwischen den Hengsten. Die Spermien des Warmbluthengstes ließen sich besser auswerten, als die der beiden Araberhengste. Der Einfluß der Aufbereitung war bei den einzelnen Hengsten aber vergleichbar mit dem Ergebnis der Gesamtauswertung. Wenn man für alle Aufbereitungsarten eine einheitliche Verdünnung benützen möchte, ist somit die von 1:1 oder 1:4 Teilen zu empfehlen.

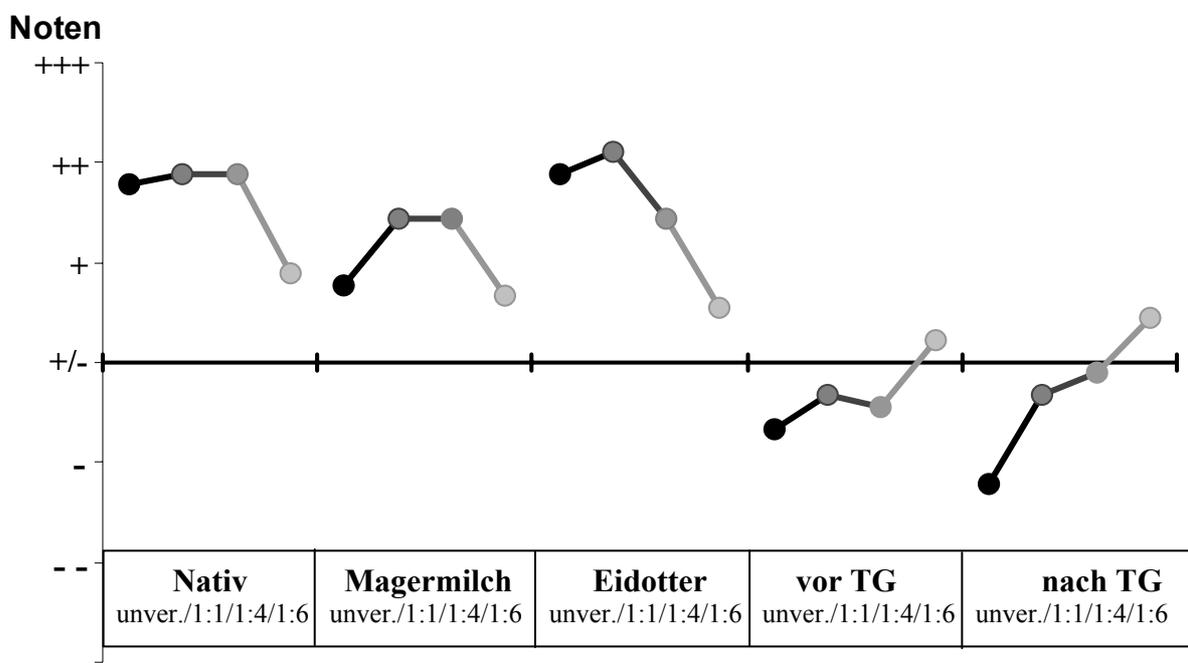


Abb. 13: Benotung der Auswertbarkeit des Ausstriches (Differenzierbarkeit der Spermienklassen, Dichte, Sauberkeit) bei 5 verschiedenen Samenaufbereitungsarten (Nativsamen, mit Magermilchverdünner, mit Eidotterverdünner, vor dem Tiefgefrierprozess, nach dem Tiefgefrierprozess), mit je 4 Verdünnungsstufen mit physiologischer NaCl-Lösung (unverdünnt, 1:1 mit NaCl, 1:4 mit NaCl, 1:6 mit NaCl). Jeder Punkt ist die ermittelte Benotung von 2700 ausgezählten Spermien.

4.1.6 Veränderung der Mittelstückmembran nach dem Einfrieren/Auftauen

Es wurde überprüft, ob der drastische Anstieg von Mittelstückschädigungen nach dem Einfrieren regelmäßig bei jedem Ejakulat eines Hengstes vorkommt. Bei den je 10

untersuchten Ejakulaten von drei Hengsten (X, Y, Z) fand sich jedes Mal ein Anstieg von Mittelstückschädigungen nach dem Einfrieren (Abb. 14, 15, 16). Die Anzahl dieser Schädigungen und der prozentuale Anstieg ist unterschiedlich hoch. Die Steigerung variiert von 3,2% (Ejakulat 7, Hengst Z) bis 2125% (Ejakulat 2, Hengst Y), ausgedrückt als Verhältnis zu den Zellen vor dem Einfrieren.

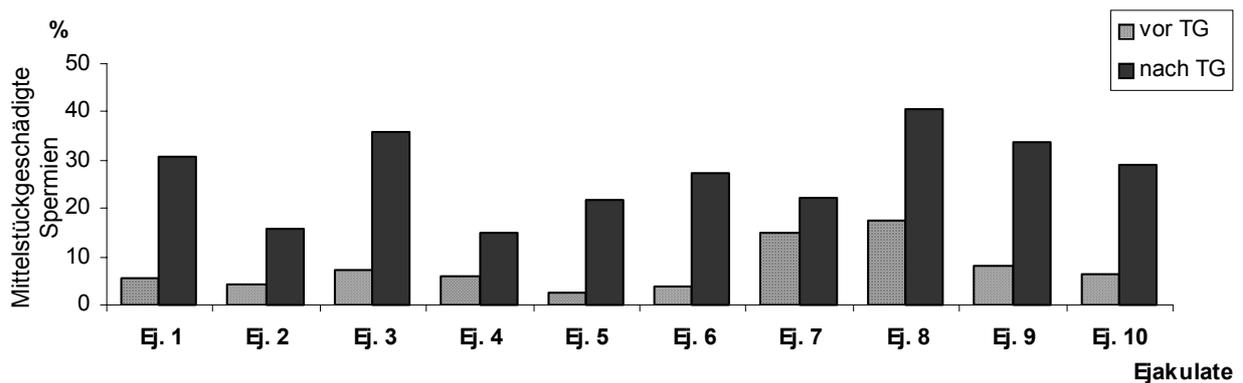


Abb. 14: Anzahl der Mittelstückschädigungen bei Hengst X vor und nach dem Tiefgefrieren (vor, nach TG) bei 10 Ejakulaten.

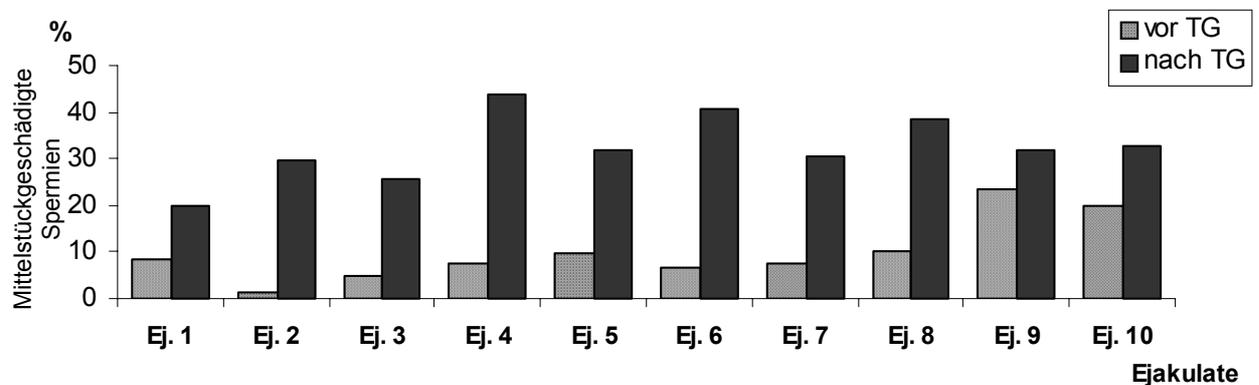


Abb. 15: Anzahl der Mittelstückschädigungen bei Hengst Y vor und nach dem Tiefgefrieren (vor, nach TG) bei 10 Ejakulaten.

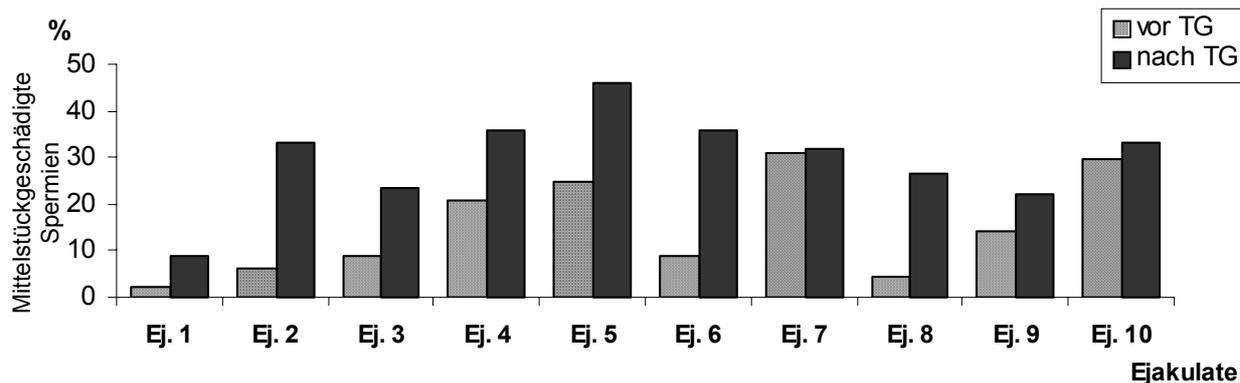


Abb. 16: Anzahl der Mittelstückschädigungen bei Hengst Z vor und nach dem Tiefgefrieren (vor, nach TG) bei 10 Ejakulaten.

Bei weiteren 21 Hengsten (A- U) wurde je ein Ejakulat vor und nach dem Einfrieren untersucht. Auch hier zeigte sich bei allen ein Anstieg von Mittelstückschädigungen nach dem Einfrierprozess (Abb. 17). Diese Zunahme variiert von 33,8% (Hengst I) bis 4300% (Hengst U), ausgedrückt als Verhältnis zu den jeweiligen Schädigungen vor dem Einfrieren.

4.2 Vergleich der Ergebnisse der computerassistierten Motilitätsanalyse mit denen der Schätzung

Um die mit verschiedenen Voreinstellungen des Computeranalysesystems (siehe 3.3.1) erzielten Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurden diese als Abweichung von den Schätzwerten der Autorin dargestellt. Letztere wurden mit 0% gleichgesetzt und die Differenz zu den Ergebnissen der Computerauswertung als positive oder negative Werte ausgedrückt .

Die Prozentsätze der vorwärtsbeweglichen Spermien glichen sich bei beiden Computermethoden. Ihre Werte wichen allerdings nach oben und unten von den Schätzwerten ab. Das Dummerstorf-Verfahren zeigte maximal bis zu 32,1% weniger bzw. bis 29,8% mehr Vorwärtsbeweglichkeit an als die Schätzung. Die eigene Methode ergab als Maximalwert eine Differenz von bis zu 34,2 % unterhalb und 35,7% oberhalb der persönlichen Schätzung.

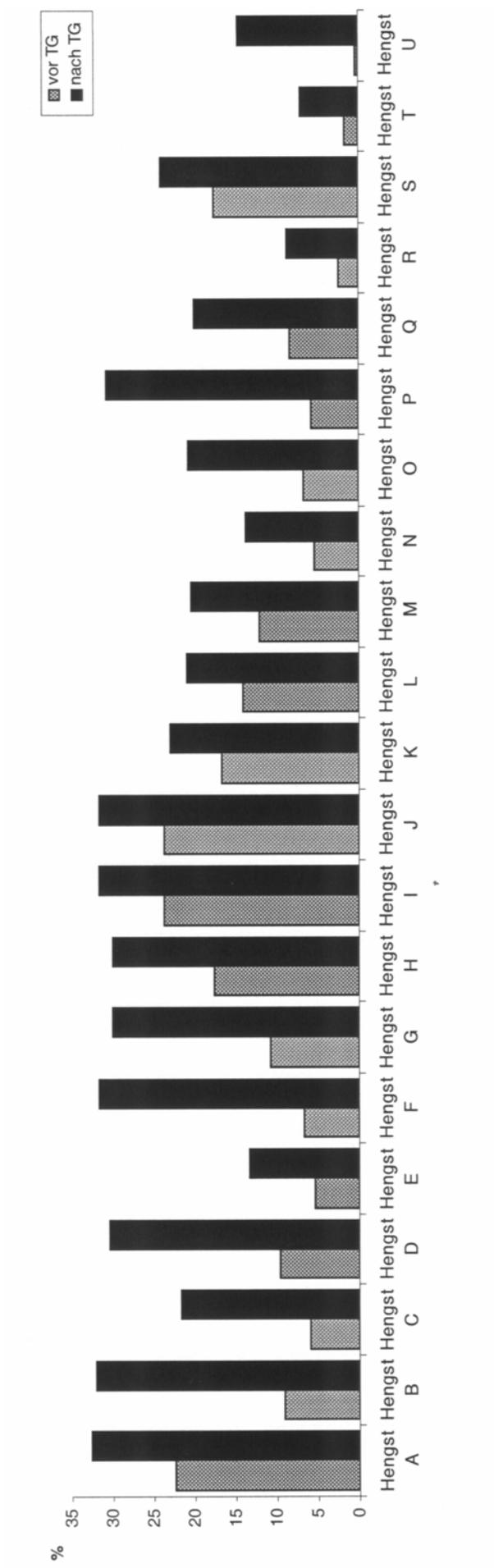


Abb. 17: Anzahl der Mittelstückschädigungen bei 21 Hengsten (A-U) vor und nach dem Tiefgefrieren (vor, nach TG) in je einem Ejakulat.

Wenn man die Abweichung als solche, unabhängig von ihrer Richtung betrachtet, so liegt ihr Durchschnitt bei der Dummerstorf-Methode bei 9,8% vorwärtsbeweglichen Spermien. Die eigene Einstellung wies durchschnittlich eine Differenz von 10,9% Vorwärtsbeweglichkeit zur Schätzung auf.

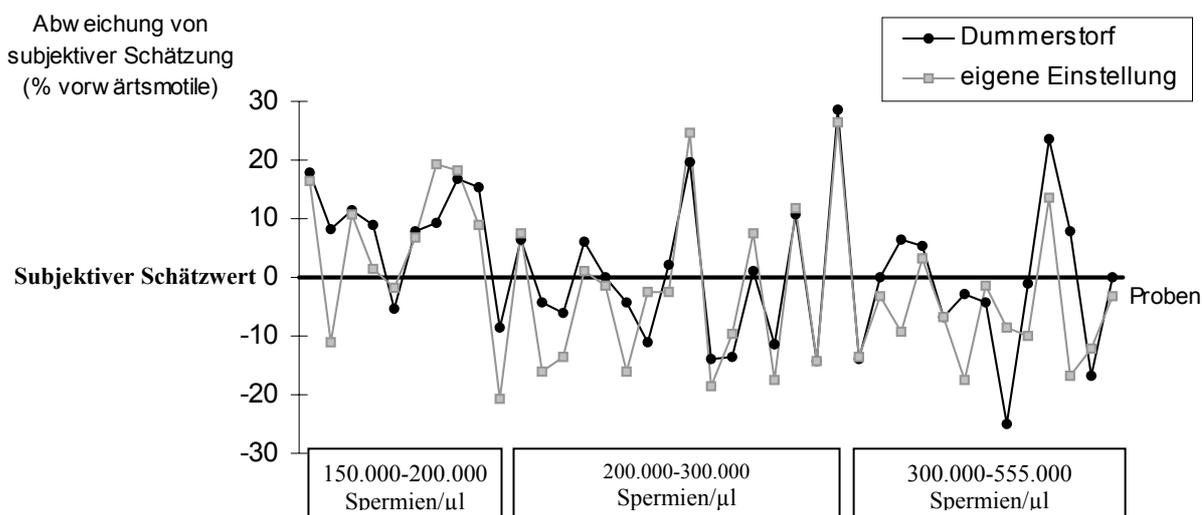


Abb. 18: Abweichungen der Vorwärtsmotilitätswerte der Dummerstorf- und eigener Methode vom Schätzwert (= 0%) bei hoher Spermiedichte (über 150.000 Spermien/ μ l).

Beide Computereinstellungen sind als gleichwertig einzustufen. Sie korrelierten gut miteinander ($r=0,923$) und mit der Schätzung ($r=0,812$ für Dummerstorf und $r=0,779$ zur eigenen Einstellung, alle Werte mit $p<0,001$).

Es wurde zusätzlich überprüft, ob die Ergebnisse der Computermethoden durch bestimmte Faktoren beeinflusst werden. So wurden die Samenproben jeweils nach Verdünnungsart, Spermienmotilität und Hengsten gruppiert. Beide Methoden wurden innerhalb jeder Gruppe miteinander verglichen. Zusätzlich wurde jede Methode einzeln geprüft, ob sie bei bestimmten Faktoren divergierende Ergebnisse aufwies. Bei der Gruppierung nach Verdünnungsart (Nativ, Eidotterverdünner, Magermilchverdünner, tiefgefrorener Samen) zeigten sich keine Differenzen ($p>0,05$).

Um den möglichen Einfluß der Spermiedichte abzuklären, wurden 3 Gruppen mit unterschiedlichen Konzentrationen untersucht (bis 75.000, 75.000-150.000, über 150.000 Spermien/ μ l). Hier zeigten sich nur in der Gruppe von über 150.000 Spermien/ μ l Unterschiede zwischen beiden Computereinstellungen ($p < 0,05$, Abb. 18).

Weiterhin wurde eine Untergruppierung anhand der geschätzten Vorwärtsmotilität (unter 30%, 30-55%, über 55%) vorgenommen. Beim Vergleich der Schätzwerte mit denen, die per Computer ermittelt wurden, zeigten sich im Bereich der Vorwärtsmotilität von 30-55% geringe Abweichungen der Mittelwerte. In den niedrigeren Motilitätsbereichen (<30% geschätzte Vorwärtsmotilität) errechneten die Computermethoden im Durchschnitt höhere Werte als die Schätzung. Dagegen lagen ihre Mittelwerte in der höheren Motilitätsgruppe (>55%) unter dem subjektiven Wert (Abb. 19). Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen beider Computereinstellungen waren nicht signifikant.

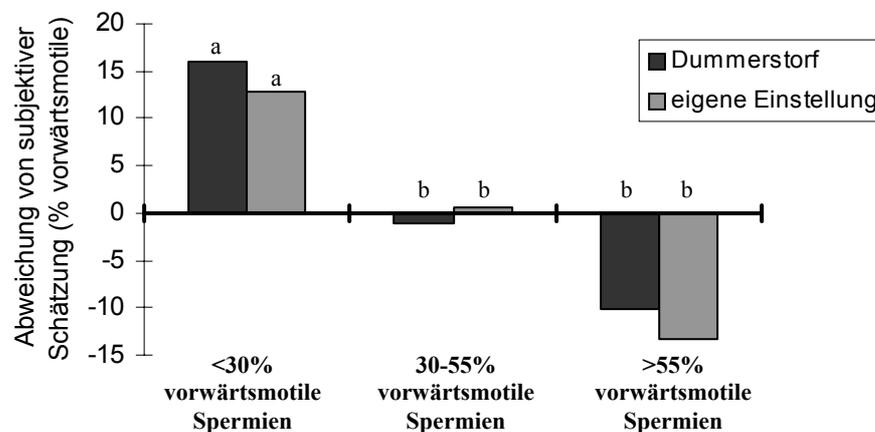


Abb. 19: Abweichung der Mittelwerte der Dummerstorf- und der eigenen Computermethode vom Mittelwert der Schätzung; Aufgeteilt in drei Vorwärtsbeweglichkeits-Gruppen (bei unterschiedlichen Buchstaben Differenz $p < 0,05$).

Bei der Gruppierung nach Hengsten, von denen je mindestens 5 Proben untersucht wurden, ergaben die Dummerstorf- und die eigene Methode bei 2 Hengsten (Hengst 7 und 10) deutlich

unterschiedliche Werte ($p < 0,05$). Die Werte der eigenen Einstellung lagen meistens oberhalb der Ergebnisse der Dummerstorf-Methode und der Schätzung.

Mit beiden Computereinstellungen wurde auch die Geschwindigkeit der motilen Spermien gemessen: Velocity straight line (VSL), velocity averaged path (VAP) und velocity curvilinear line (VCL). Bei allen Geschwindigkeitsparametern korrelierten die Messungen der Dummerstorf-Methode und der eigenen Einstellung gut (VSL: $r=0,91$; VAP: $r=0,88$; VCL: $r=0,81$; alle mit $p < 0,001$). Die eigene Methode ergab jedoch meist niedrigere Werte als die Dummerstorf-Einstellung (bei VSL und VAP $p < 0,05$; bei VCL $p < 0,001$).

Bei der computerassistierten Motilitätsanalyse und bei der Schätzung wurden zusätzlich zur Vorwärtsmotilität auch der Prozentsatz der Kreisläufer und der lokal motilen Spermien ermittelt, zusammengerechnet also die Summe der motilen Spermien. Bei dieser Summe korrelierten die Werte der beiden Computermethoden gut miteinander ($r=0,96$) und zur Schätzung ($r=0,83$ für Dummerstorf und $r=0,82$ für eigene Einstellung, alle mit $p < 0,001$). Die eigene Methode ermittelte meist niedrigere Werte als das Dummerstorf-Verfahren ($p < 0,001$).

Für die folgenden Berechnungen wurden die mit der Dummerstorf-Einstellung gewonnenen Ergebnisse verwendet, da sie im Durchschnitt weniger von den Schätzwerten abwichen (9,8% zu 10,9%), seltener stark divergierende Werte zeigte und die Methode seit längerem etabliert ist.

4.3 Subjektive Beurteilung der Spermienmotilität durch mehrere Personen im Vergleich zur computerassistierten Motilitätsanalyse

Jede Samenprobe wurde subjektiv von ein bis sieben Untersuchern auf ihre Motilität beurteilt, durchschnittlich von $2,9 \pm 1,5$ Personen pro Portion. Es handelte sich um Tierärzte, die häufi-

ger Hengstsperma beurteilten (Autorin: A und zwei Tierärzte der Pferdeabteilung der Klinik: B, C), sechs Tierärzte anderer Abteilungen, die selten oder nie Hengstsperma beurteilt haben (D-I) und 3 technische Assistentinnen, die routinemäßig (J) bzw. selten (K, L) Hengstsperma untersuchten. Es wurde nicht jede Samenprobe von allen Personen untersucht. Einige Untersucher schätzten fast alle 181, andere nur 6 Proben (Abb. 20). Die Schätzwerte wurden als Abweichung von dem jeweiligen Ergebnis der Dummerstorf Methode dargestellt, um sie vergleichen zu können. Zu diesem Zweck wurde, ähnlich wie bereits unter 4.2 beschrieben, das Resultat der Computermethode als 0% dargestellt und die Differenz der Schätzwerte zu diesem „Richtwert“ als positive oder negative Werte ausgewiesen.

Die Schätzungen der Untersucher lagen teils unter-, teils oberhalb der Computerwerte und wichen unterschiedlich stark ab (Abb. 20). Bei einigen Untersuchern lagen die Ergebnisse hauptsächlich in der Nähe des Computerwertes (Tierärzte der Pferdeabteilung: A, B, C; ein Tierarzt anderer Abteilung: F und routinierte technische Assistentin: J). Die Schätzwerte anderer, weniger routinierten Untersucher waren sehr weit entfernt und lagen hauptsächlich oberhalb (technische Assistentinnen: K, L) bzw. unterhalb (Tierärzte G, E) des Computerwertes.

Die maximalen Einzelabweichungen zum Computerwert waren 54,9% nach unten (Untersucher E) und 45,3% nach oben (Untersucher L). Die Mittelwerte der Abweichungen der einzelnen Untersucher bewegten sich zwischen 10 und 15% (Tabelle 4).

Die Untersucher wurden aufgrund ihres Erfahrungs- bzw. Ausbildungsstands in drei Gruppen gruppiert: Tierärzte der Pferdeabteilung (A, B, C), Tierärzte aus anderen Abteilungen (D-I) und technische Assistentinnen (J-L).

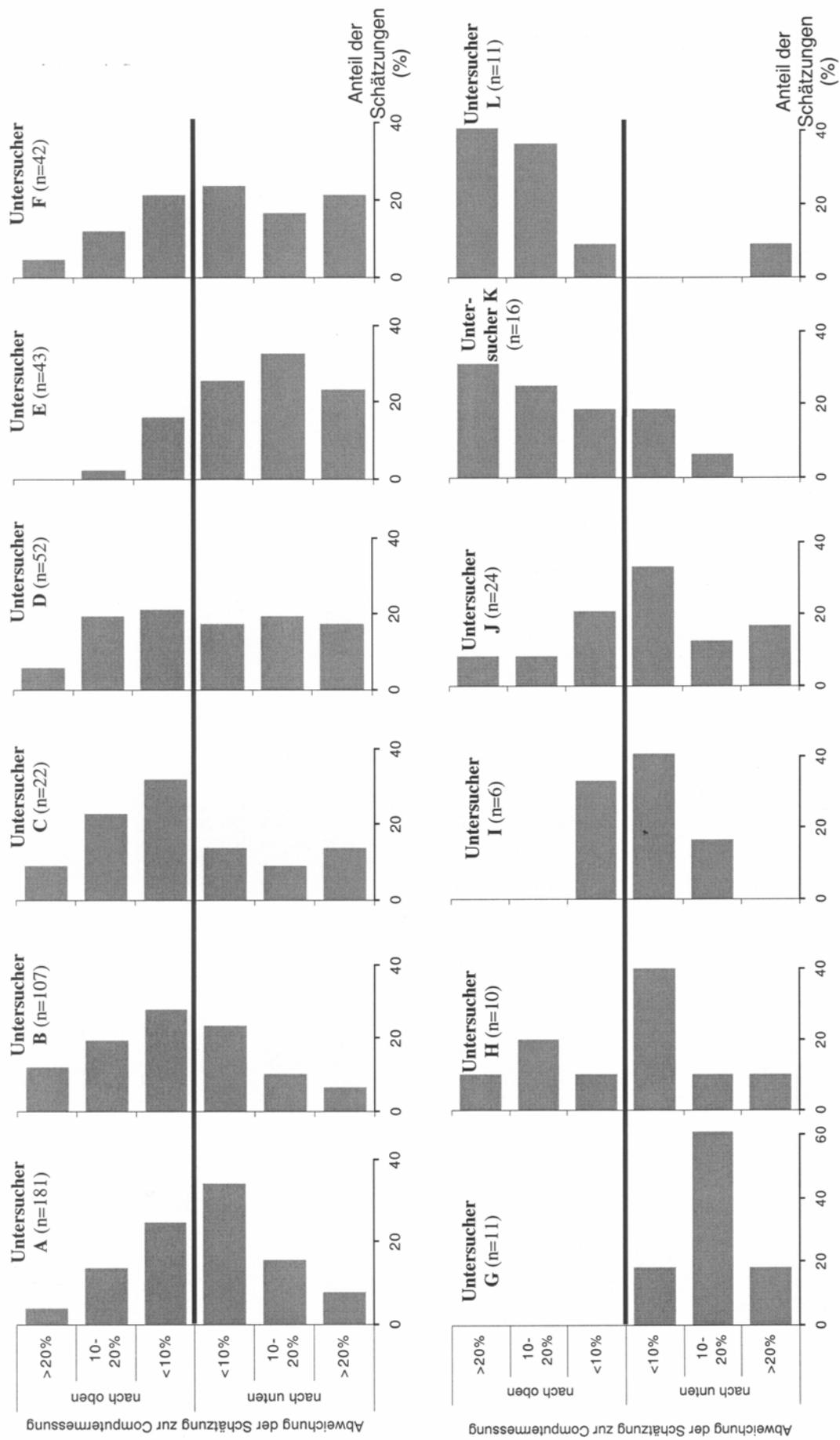


Abb. 20: Individuelle Abweichungen der durch verschiedene Untersucher geschätzten Vorwärtsmotilität im Vergleich zu den Ergebnissen der Computerauswertung (= 0%).

Tabelle 4: Mittelwerte der Abweichungen der Schätzwerte zur Computerauswertung und deren Standardabweichungen für jeden Untersucher.

Untersucher		Anzahl der Schätzungen (n=)	Durchschnittliche Abweichung zur Computerauswertung (% vorwärtsmotile Spermien)
Tierärzte der Pferdeabteilung	A	181	9,8 ± 7,4
	B	107	12,1 ± 9,5
	C	22	12,3 ± 8,4
Tierärzte aus anderen Abteilungen	D	52	13,5 ± 9,6
	E	43	14,8 ± 12,8
	F	42	14,0 ± 10,8
	G	11	15,4 ± 5,9
	H	10	11,7 ± 9,0
	I	6	6,1 ± 7,3
technische Assistentinnen	J	24	12,7 ± 10,5
	K	16	14,5 ± 12,4
	L	11	22,4 ± 12,4

Die Mittelwerte der Schätzungen wurden anhand des Wertes der Dummerstorf-Methode in Gruppen von unter 30%, 30-55% und über 55% vorwärtsmotile Spermien eingeteilt (Abb. 21). Die Untersucher der Pferdeabteilung befanden sich mit ihren Schätzungen im niedrigen Motilitätsbereich im Durchschnitt oberhalb des Computerwertes, bei mittleren Motilitäten in der Nähe und bei hoher Motilität unterhalb des Computerwertes. Die Mittelwerte der Schätzungen der Tierärzte anderer Abteilungen lagen in allen drei Motilitätsgruppen unterhalb des Computerwertes, dies umso ausgeprägter, je motiler die Samenprobe war. Die technischen Assistentinnen schätzten im Durchschnitt bei niedrigen und hohen Motilitäten einen höheren Prozentsatz an vorwärtsmotilen Spermien als die Computeranalyse, besonders deutlich zu sehen im Bereich von weniger als 30% motilen Spermien.

Zwischen allen Gruppen, sowohl innerhalb der Motilitätsgruppen als auch zwischen den Untersuchergruppen, gab es statistische Unterschiede ($p < 0,05$). Ausnahmen sind die mittlere und höchste Motilitätsgruppe der Tierärzte anderer Abteilungen zwischen denen keine signi-

fikanten Unterschiede vorhanden waren. Andere Ausnahmen sind die Werte der Tierärzte der Pferdeabteilung zu denen anderer Abteilungen, die in der niedrigsten und in der höchsten Motilitätsgruppe keine statistische Differenzen aufwiesen ($p > 0,05$, Abb. 21).

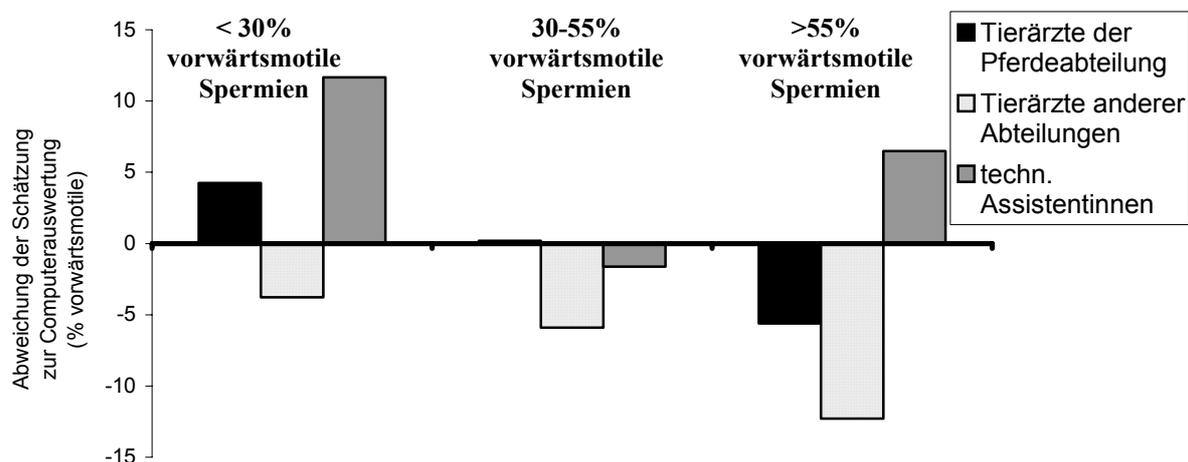


Abb. 21: Abweichung der Mittelwerte der Schätzungen der Untersucherguppen zur Computerauswertung sortiert nach verschiedenen Vorwärtsmotilitätsbereichen (Computerwerte).

Es wurde weiterhin geprüft, ob die Abweichung der Schätzung zur Computerauswertung von der Spermienkonzentration der Probe abhängig ist. Dazu wurden die Proben in drei Gruppen eingeteilt: unter 75.000, 75.000- 150.000 und über 150.000 Spermien/ μ l und die Mittelwerte der Schätzungen dargestellt (Abb. 22). Die durchschnittlichen Schätzungen der Untersucher der Pferdeabteilung wichen wenig vom Computerwert ab. Bei niedriger Konzentration wurde eine höhere Motilität geschätzt als mit der Computermethode und bei mittlerer und höherer Konzentration eine eher geringere Vorwärtsmotilität. Die Mittelwerte der Schätzungen der Tierärzte aus anderen Abteilungen lagen in allen drei Dichtegruppen unterhalb des Computerwertes, besonders deutlich in den Gruppen der niedrigsten und höchsten Spermienkonzentration. Die technischen Assistentinnen schätzten bei Samenproben mit einer Konzentration unter 75.000 Spermien/ μ l einen Durchschnittswert der deutlich über dem der Computermethode lag. Bei mittlerer Spermiedichte lag ihr durchschnittlicher Schätzwert in der Nähe und

bei hoher Konzentration wieder oberhalb der Computeranalyse. Zwischen allen einzelnen Gruppen gab es Unterschiede ($p < 0,05$).

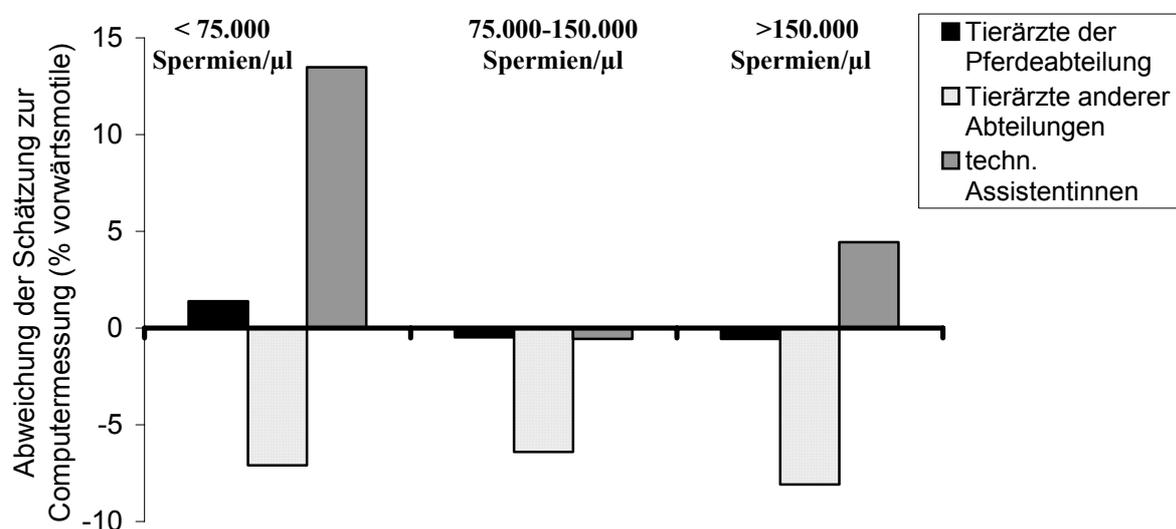


Abb. 22 : Abweichung der Mittelwerte der Schätzung der verschiedenen Untersucherguppen zur Computerauswertung sortiert nach Spermiedichte.

In einer weiteren Analyse wurden je 5 Samenproben ausgewählt, die 2 extreme Faktoren kombinierten: Niedrige Spermienkonzentration/niedrige Motilität; Niedrige Konzentration/hohe Motilität; Hohe Spermienkonzentration/niedrige Motilität und hohe Spermienkonzentration/hohe Motilität (niedrige bzw. hohe Motilität: $< 20\%$ bzw. $> 55\%$ vorwärtsmotile Spermien; niedrige bzw. hohe Konzentration: < 60.000 bzw. ca. 200.000 Spermien/µl). Im Folgenden werden diese Gruppen 1, 2, 3 und 4 genannt. In der Abb. 23 sieht man in der Gruppe 1 (geringe Motilität und Konzentration), daß die Schätzungen der Untersucher der Pferdeabteilung ober- und unterhalb, die der Tierärzte aus anderen Abteilungen nur unterhalb und die der technischen Assistentinnen nur oberhalb des Computerwertes liegen. Ein ähnliches Verteilungsmuster ist auch bei geringer Konzentration und hoher Motilität (Gruppe 2) zu sehen, nur lagen die Werte eher tiefer. Bei hoher Konzentration und niedriger Motilität (Gruppe 3) näherten sich die Schätzungen aller drei Untersucherguppen stark dem Computerwert. Bei hoher Spermienkonzentration und hoher Motilität (Gruppe 4) lagen praktisch alle Schätz-

werte der Untersucher unterhalb der Computeranalyse. Bei den beiden letzten Gruppen (3 und 4) gab es keine Unterschiede zwischen den einzelnen Untersuchergruppen ($p > 0,05$). In den beiden ersten Gruppen - mit geringer Konzentration - gab es teilweise Unterschiede zwischen den Untersuchergruppen ($p < 0,05$). Die Werte der Tierärzte der Pferdeabteilung zeigten keine Unterschiede unter den verschiedenen Konditionen. Nur die Werte der Gruppe 2 (geringe Konzentration/hoher Motilität) wichen von denen der Gruppe 3 (hohe Konzentration/geringe Motilität) ab ($p < 0,05$). Die Schätzungen der Tierärzte anderer Abteilungen führten zu abweichenden Werten zwischen den Gruppen 3 und 4. Die technischen Assistentinnen kamen jeweils zwischen den Gruppen 1/4, 2/3 und 2/4 zu abweichenden Ergebnissen ($p < 0,05$, Abb. 23).

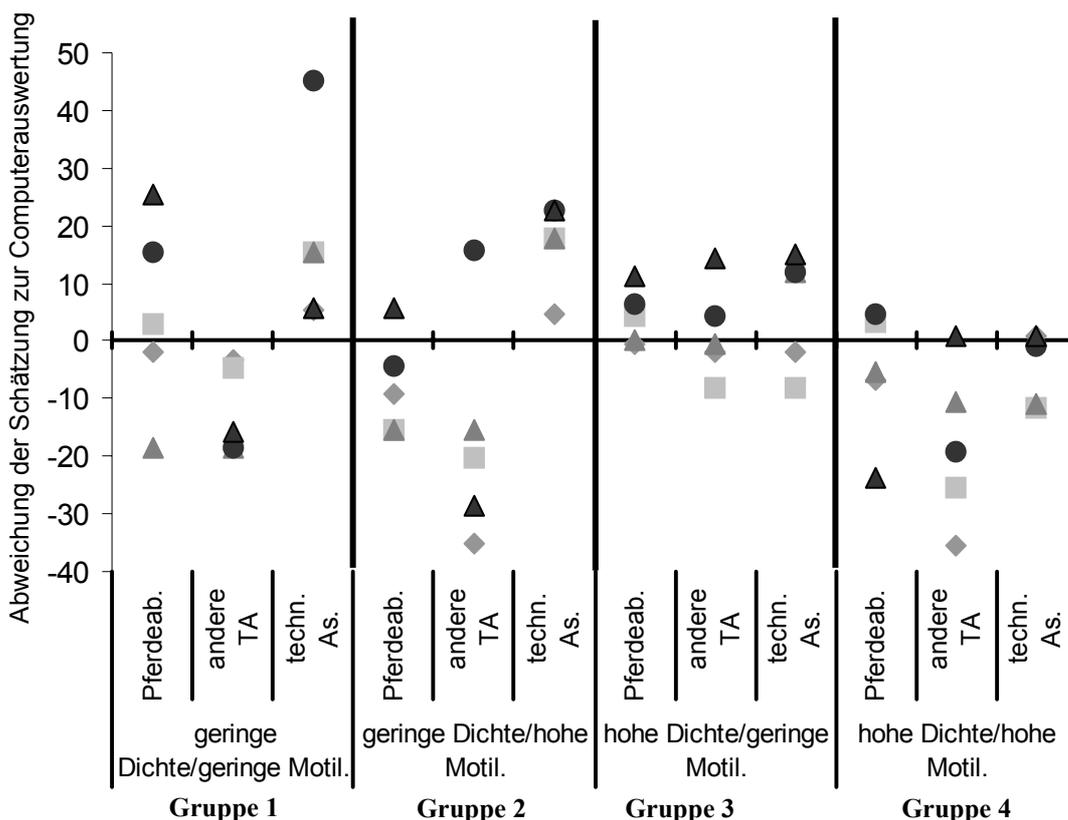


Abb. 23 : fünf einzelne Schätzwerte der Untersuchergruppen bei Samenproben, die Extremwerte bei Dichte und Motilität aufwiesen.

Da anzunehmen ist, daß die Motilitätsschätzungen auch von der Geschwindigkeit der Spermien beeinflusst wird, wurde die velocity curvilinear line (VCL) der Computerauswertung für die Untersuchung dieser Zusammenhänge benützt. Die VCL beschreibt die tatsächliche Bewegung der Spermien und wird als sichtbare Aktivität vom Untersucher erkannt. Es wurden Proben, die laut Computerauswertung eine identische Vorwärtsmotilität (<30% bzw. 30-55%), aber unterschiedliche Spermengeschwindigkeit (extrem niedrige bzw. extrem hohe) aufwiesen, miteinander verglichen. Die Untersucher der Pferdeabteilung schätzten hierbei vergleichbare Werte in der langsamen wie schnellen Gruppe ($p>0,05$). Auch die Schätzungen der Tierärzte anderer Abteilungen wurden nicht durch die Spermengeschwindigkeit beeinflusst ($p>0,05$). Bei den technischen Assistentinnen führten die Schätzungen in der Gruppe unter 30% Vorwärtsmotilität unabhängig von der VCL zu ähnlichen Ergebnissen. Bei Vorwärtsmotilitäten von 30 bis 55% wurde bei langsameren Spermienpopulationen eine höhere Motilität geschätzt als von der Computermethode und bei schnelleren eine niedrigere Motilität ($p<0,05$).

Im Gesamtmaterial, das die Werte aller Untersucher umfaßt, korrelierte die geschätzte Vorwärtsmotilität mit allen drei vom Computer gemessenen Geschwindigkeitsarten. Die beste Korrelation ergab sich mit der VSL ($r=0,51$), gefolgt von der VAP ($r=0,41$) und der VCL ($r=0,26$; alle $p<0,001$).

Es wurde weiterhin überprüft, ob die Aufbereitungsart des Spermas (Eidotterverdünner, Magermilchverdünner, Nativ, tiefgefrorenes Sperma) einen Einfluß auf die Schätzergebnisse der beteiligten Untersucher hat. Die Untersucher der Pferdeabteilung schätzten bei den Proben mit Ei- und Magermilchverdünner durchschnittlich etwas unterhalb des Computerwertes und bei den nativen und tiefgefrorenem Sperma eher oberhalb (Abb. 24). Der Durchschnittswert der Schätzungen der Tierärzte anderer Abteilungen lag immer unterhalb des Computerwertes.

Die technischen Assistentinnen ordneten im Durchschnitt die Samenprobe einer höheren Vorwärtsmotilität zu als die Computermethode, mit Ausnahme der nativen Proben. Die Schätzwerte der verschiedenen Untersucher unterschieden sich bis auf drei Ausnahmen in allen Aufbereitungsgruppen ($p < 0,05$).

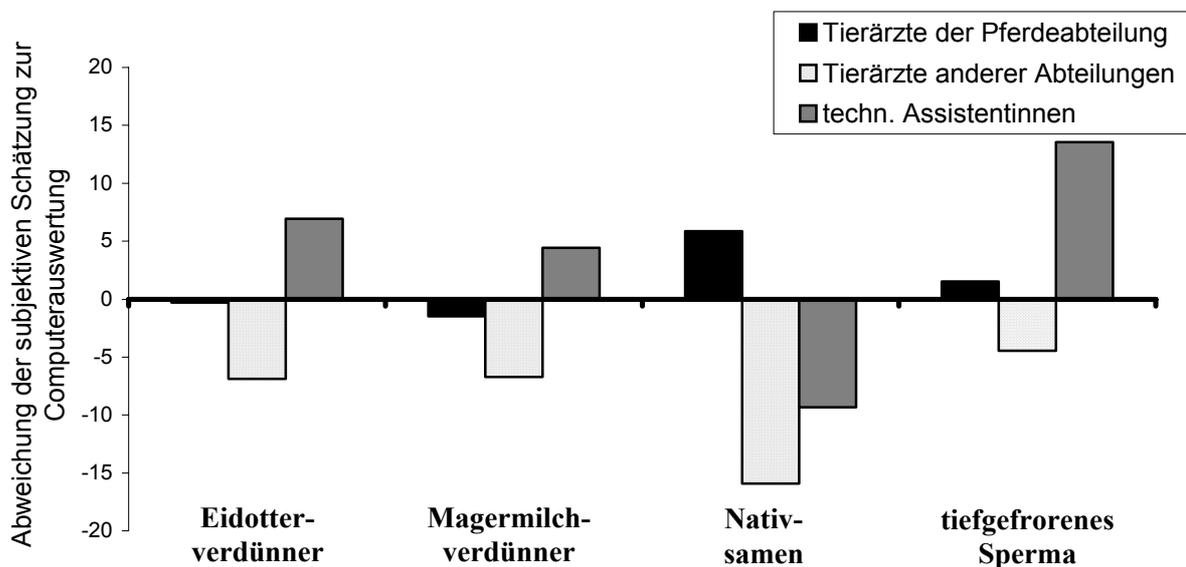


Abb. 24: Mittelwerte der Schätzungen der Untersuchergruppen bei Samenproben mit unterschiedlicher Aufbereitungsart.

Zusätzlich zu dem Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien wurde derjenige der ortsbeweglichen Spermien und der Kreisläufer bestimmt. Im Gesamtmaterial korrelierte der von den Untersuchern ermittelte Prozentsatz der ortsbeweglichen Spermien relativ schlecht mit dem der Computerauswertung ($r=0,23$; $p < 0,001$). Auch die Korrelation zwischen den Prozentsätzen der Kreisläufer war nicht gut ($r=0,36$; $p < 0,001$). Im Gegensatz dazu war die Korrelation zwischen beiden Vorwärtsmotilitäten besser ($r=0,71$; $p < 0,001$). Auch die Summe der drei Motilitätsarten korrelierte gut zwischen der Schätzung und der Computerauswertung ($r=0,75$; $p < 0,001$).

Bei getrennter Betrachtung der Resultate der Untersuchergruppen korrelierten die Schätzungen zwar auch signifikant ($p < 0,05$) mit den Ergebnissen der jeweiligen Computeraus-

wertung, doch in unterschiedlichem Ausmaß. Bei den Untersuchern der Pferdeabteilung waren die Korrelationen für vorwärtsbewegliche Spermien $r=0,76$, ortsbewegliche $r=0,22$, Kreisläufer $r=0,36$, Summe der Motilitäten $r=0,80$. Bei den Tierärzten anderer Abteilungen und bei den technischen Assistentinnen betragen die Korrelationen $r=0,71$; $0,30$; $0,36$; $0,73$ bzw. $r=0,62$; $0,28$; $0,58$; $0,73$.

4.4 Vergleich Schätzen- Auszählen der Spermienkonzentration

Die Konzentration der Spermien pro μl Samen wurde sowohl anhand des durchschnittlichen Abstandes der Spermien im mikroskopischen Präparat geschätzt als auch mit der Bürker-Türk-Kammer ausgezählt (Abb. 25). Beide Auswertungen korrelierten gut miteinander ($r=0,84$; $p<0,005$). Im Durchschnitt lag der geschätzte Wert 25.900 Spermien/ μl unterhalb von dem gezählten ($p<0,001$).

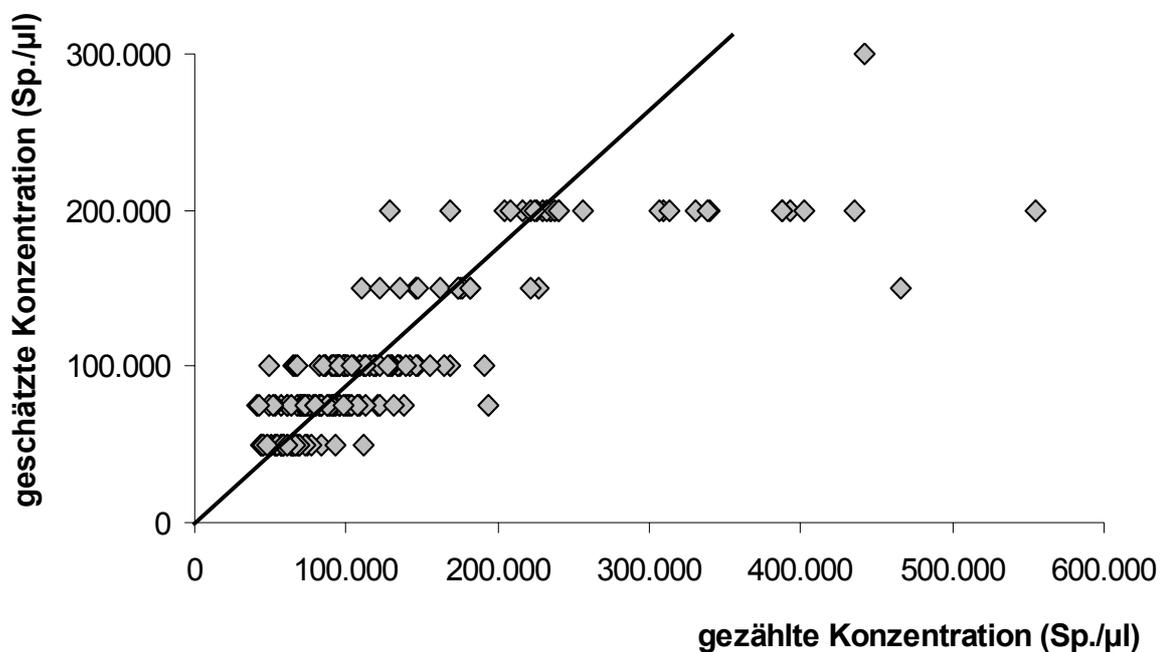


Abb. 25: geschätzte und gezählte Werte der Spermienkonzentration (Spermien/ μl).

4.5 Membranintegrität von Spermien aus Besamungsdosen

4.5.1 Spermienkopfmembranen

Als membranintakte Spermien in der Bromphenolblau-Nigrosin Färbung wurden vollkommen ungefärbte Spermien definiert. Bei der Kovács-Foote Färbung waren dies die Spermien der Klasse 1 (siehe 3.1), die intakte Kopf- und Mittelstückmembranen und intaktes Akrosom aufwiesen.

Der Anteil von intakten Spermien bei beiden Färbemethoden korrelierte gut miteinander ($r=0,84$; $p<0,001$). Jedoch ermittelte die Bromphenolblau-Nigrosin Färbung bei fast allen Proben (171 von 181) einen höheren Wert an membranintakten Spermien als die Kovács-Foote Färbung - durchschnittlich 12,5 Spermien mehr pro 100 ausgezählte Zellen ($p<0,001$). Die Werte der membranintakten Spermien in den Besamungsdosen variierten von 20 bis 96,3 je 100 Zellen, bestimmt mit der Bromphenolblau-Nigrosin Färbung bzw. von 8,3 bis 88 je 100 Zellen ermittelt anhand der Kovács-Foote Färbung.

Es wurde untersucht, ob diese Spermien in Bezug zu der Motilität der Samenprobe stehen (Tabelle 5). Der Anteil der membranintakten Spermien nach der Kovács-Foote Färbung korrelierte durchgehend besser mit den Motilitäten als der mit der Bromphenolblau-Nigrosin Färbung ermittelte Prozentsatz. Bei der Vorwärtsmotilität war die Korrelation zur computer- ausgewerteten Motilität besser als zu der eigenen Schätzung, bei der Summe der Motilitäten hingegen war das Verhältnis umgekehrt.

Tabelle 5: Korrelation (r) der membranintakten Spermien mit der Motilität in Abhängigkeit von der Färbung ($p < 0,001$).

Färbung	Vorwärtsmotilität		Summe der Motilitäten	
	subjektiv	Computerauswertung	subjektiv	Computerauswertung
Bromphenolblau-Nigrosin	0,50	0,58	0,67	0,62
Kovács-Foote	0,58	0,64	0,84	0,74

Die Korrelationen zwischen dem Anteil membranintakter Spermien und den Geschwindigkeitsparametern VCL, VAP und VSL war deutlich geringer (Bromphenolblau-Nigrosin: $r=0,20$; $0,18$ bzw. $0,21$ und Kovács-Foote: $r=0,22$; $0,24$ bzw. $0,22$; $p < 0,05$).

Es wurde überprüft, ob die beiden Färbemethoden bei verschiedenen Samenaufbereitungsarten vergleichbare Ergebnisse liefern. Bei flüssigkonservierten Samenproben mit Eidotter- und Magermilchverdünner und bei tiefgefrorenem Sperma korrelierten die Ergebnisse beider Färbemethoden gut miteinander ($p < 0,001$), bei nativem Sperma weniger gut ($p < 0,05$; Tabelle 6). Die Bromphenolblau-Nigrosin Färbung ergab einen höheren Prozentsatz an membranintakten Spermien als die Kovács-Foote Färbung. Diese Differenz betrug ca. 10- 20% ($p < 0,001$). Nur bei den nativen Proben ergaben beide Färbemethoden fast gleiche Ergebnisse ($p=0,11$; Tabelle 6).

Tabelle 6: Mittelwerte (%) der membranintakten Spermien ermittelt mit der Bromphenolblau-Nigrosin und Kovács-Foote Färbung und deren Korrelationen, bei verschiedenen Samenaufbereitungsarten.

		Nativ	Eidotter- verdünner	Magermilch- verdünner	Tiefgefrorenes Sperma
Mittelwerte membranintakter Spermien (%)	Bromphenolblau-Nigrosin	80,1	75,6	74,3	49,5
	Kovács-Foote	77,8	61,2	64,8	29,7
Korrelation Bromphenolblau-Nigrosin zu Kovács-Foote (r=)		0,64	0,82	0,84	0,93

Die Korrelation der membranintakten Spermien zu der computerermittelten Vorwärtsmotilität war bei nativem Sperma schlecht und statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$) und zwar sowohl bei der Bromphenolblau-Nigrosin als auch der Kovács-Foote Färbung. Bei aufbereitetem Samen war die Korrelation mittel bis gut (Tabelle 7). Meistens korrelierte der Anteil der membranintakten Spermien, der mit der Kovács-Foote Färbung ermittelt wurde, besser mit der Motilität als die entsprechenden Werte nach Auswertung der Bromphenolblau-Nigrosin Färbung.

Tabelle 7: Korrelationen zwischen dem Anteil der membranintakten Spermien und der computerausgewerteten Vorwärtsmotilität in Abhängigkeit von der Färbemethode und der Aufbereitungsart (alle $p < 0,05$, außer bei * $p > 0,05$).

Korrelationen (r=)	Nativ	Eidotter- verdünner	Magermilch- verdünner	Tiefgefrorenes Sperma
Bromphenolblau-Nigrosin zu Vorwärtsmotilität	-0,18*	0,61	0,44	0,82
Kovács-Foote zu Vorwärtsmotilität	-0,06*	0,67	0,64	0,77

Ausgehend von der Annahme, daß alle motile Spermien intakte Membranen haben, müßte der Prozentsatz aller motilen Spermien annähernd mit dem der membranintakten Spermien

identisch sein. Die entsprechende Auswertung zeigte, daß dieser Zusammenhang bei der Kovács-Foote Färbung besser gegeben ist als bei der Bromphenolblau-Nigrosin Färbung (Abb. 26). Das gilt unabhängig von der Aufbereitungsart.

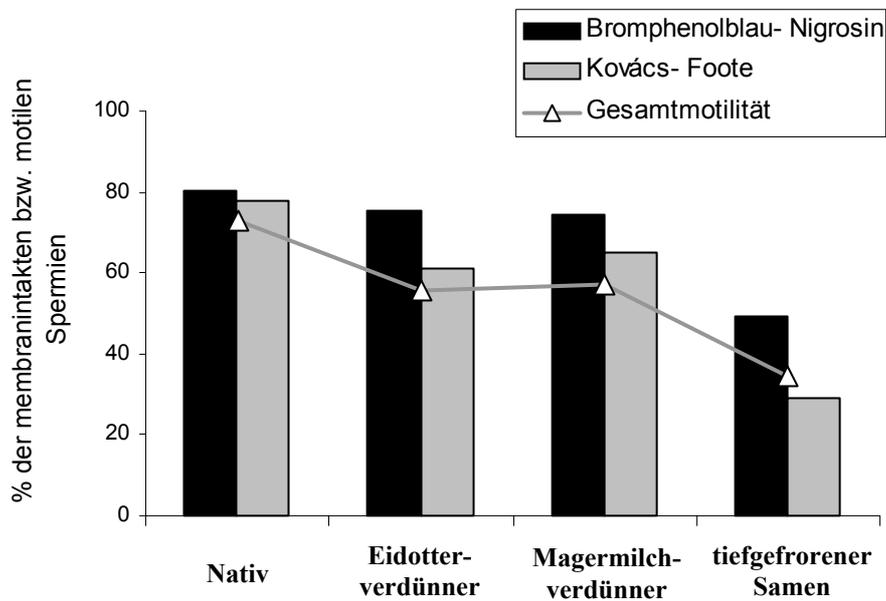


Abb. 26: Mittelwerte der membranintakten Spermien und der Gesamtmotilität bei unterschiedlichen Samenaufbereitungsarten.

4.5.2 Mittelstückmembran

Im Gegensatz zu herkömmlichen Supravitalfärbungen wie Bromphenolblau-Nigrosin, die nur die Integrität der Kopfmembranen bestimmen, kann die Kovács-Foote Färbung zusätzlich auch Spermien mit unbeschädigter oder beschädigter Mittelstückmembran unterscheiden. Im vorhergehenden Kapitel wurde das Vorkommen der komplett intakten Spermien untersucht, in diesem Kapitel das der Spermien mit intakter Kopf-, aber geschädigter Mittelstückmembran (Spermienklasse 2 nach Kovács-Foote). Je nach Probe kamen diese zuletzt genannten Spermien unterschiedlich häufig vor, von 0 bis 49% der ausgezählten Spermien, durchschnittlich $7,9 \pm 6,9\%$.

Das Vorkommen der mittelstückgeschädigten Spermien variierte je nach Aufbereitungsart des Samens (Tabelle 8). Der Anteil solcher Spermien war in aufbereiteten Samen signifikant ($p < 0,05$) höher als im Nativsperma, wobei das Ausmaß der Schädigungen nach dem Tiefgefrierprozeß besonders hoch war.

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichungen der Anteile der kopfmembranintakten, aber mittelstückgeschädigten Spermien (Spermienklasse 2 nach Kovács-Foote) bei unterschiedlichen Aufbereitungsarten.

	Nativ	Eidotter- verdünner	Magermilch- verdünner	Tiefgefrorenes Sperma
Anteil der Spermien Klasse 2 (%)	1,8 ± 0,8 ^a	8,6 ± 7,1 ^b	6,6 ± 6,4 ^b	14,4 ± 4,9 ^c

Werte mit unterschiedlichen Buchstaben unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$).

Es wird angenommen, daß Spermien mit geschädigter Mittelstückmembran unbeweglich sind. In dieser Untersuchung war ihr Anteil sowohl mit der Vorwärtsmotilität ($r = -0,37$ zur eigenen Schätzung, $r = -0,41$ zur Computerauswertung) als auch mit der Gesamtmotilität negativ korreliert ($r = -0,58$ bzw. $r = -0,54$; alle $p < 0,001$).

Bei den in der Klinik gewonnenen Proben wurde untersucht, ob, unabhängig von der Art der Verarbeitung, die Aufbewahrungszeit des Samens, d.h. die Zeitspanne zwischen Samengewinnung und Untersuchung, einen Einfluss auf die Membranschädigung hatte. Der Prozentsatz der Spermien mit geschädigter Mittelstückmembran betrug bei Proben mit einer Aufbewahrungszeit unter 12 Stunden 2,8%, bei 12-36 Stunden alten Proben 5,3% und bei einer Zeitspanne über 36 Stunden 10,9% (Abb. 27). Der Anteil geschädigter Spermien war nach 36 stündiger Aufbewahrungszeit signifikant höher ($p < 0,05$) als nach 12 stündiger Aufbewahrung.

Gleichzeitig sank mit längerer Aufbewahrungszeit der Anteil der komplett membranintakten Spermien ab (Abb. 27). Dabei zeigte die Kovács-Foote Färbung niedrigere Werte von intakten Spermien als die Bromphenolblau-Nigrosin Färbung. Sie hatte meistens eine bessere Korrelation zur Vorwärts- und Gesamtmotilität als die Bromphenolblau-Nigrosin Färbung (Tabelle 9).

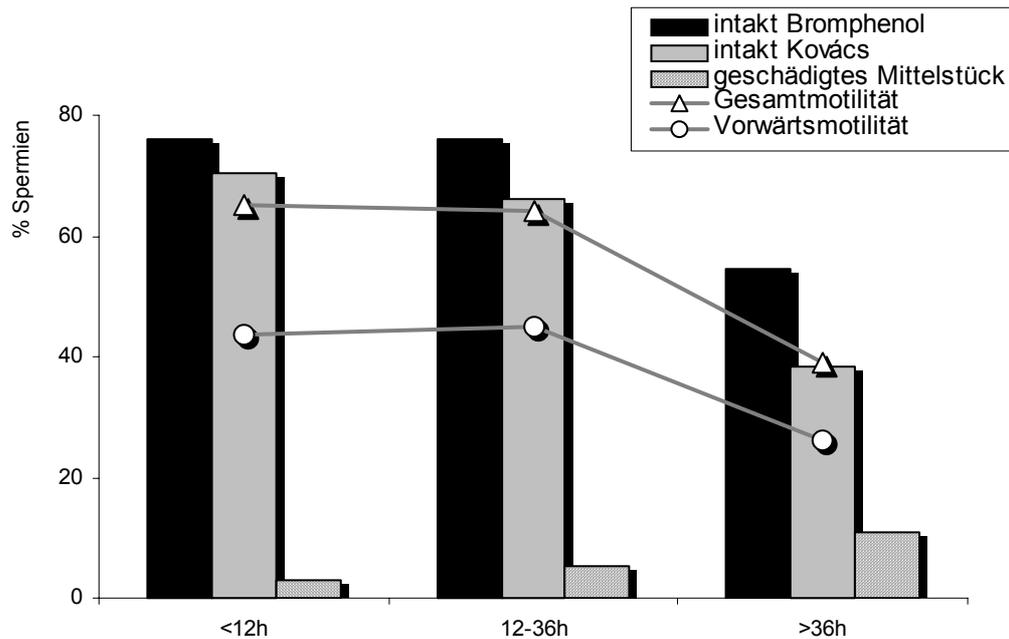


Abb. 27: Membranintakte Spermien nach Bromphenolblau-Nigrosin (intakt Bromphenol) und Kovács-Foote Färbung (intakt Kovács), Spermien mit geschädigter Mittelstückmembran und geschätzter Vorwärts- und Gesamtmotilität bei verschiedenen Aufbewahrungszeiten der Samenproben der Klinik.

Tabelle 9: Korrelationen (r) zwischen membranintakten Spermien nach der Bromphenolblau-Nigrosin und Kovács-Foote Färbung zu den geschätzten Motilitäten bei verschiedenen Aufbewahrungszeiten der Proben ($p < 0,05$, außer bei * $p > 0,05$).

Lagerungszeit (Stunden)	Membranintakte Spermien nach Färbung	Vorwärtsmotilität	Gesamtmotilität
<12 Stunden (n= 22)	Bromphenolblau-Nigrosin	0,33*	0,75
	Kovács-Foote	0,29*	0,88
12-36 Stunden (n= 30)	Bromphenolblau-Nigrosin	0,46	0,82
	Kovács-Foote	0,54	0,92
>36 Stunden (n= 18)	Bromphenolblau-Nigrosin	0,56	0,81
	Kovács-Foote	0,44	0,86

Zur Untersuchung, ob es rassespezifische Unterschiede beim Vorkommen der Mittelstückschädigungen gibt, wurden die Hengste nach Rassen bzw. Typ, in Araber, Warmblut und Kaltblut gruppiert. Die Proben der Traber-, Vollblut- und Quarter Horse Hengste wurden nicht mit einbezogen, da ihre Anzahl jeweils unter 4 lag. Der durchschnittliche Anteil der mittelstückgeschädigten Spermien war bei allen drei Rassen nahezu gleich, nämlich $7,9 \pm 7,2\%$ bei den Araberhengsten, $8,1 \pm 7,2\%$ bei den Warmblütern und $7,9 \pm 6,1\%$ bei den Kaltblütern.

4.5.3 Kopfkappenmembran

Mit der Kovács-Foote Färbung kann auch die Beschaffenheit der Kopfkappe bestimmt werden, d.h. ob das Akrosom intakt, geschädigt (bzw. in Ablösung begriffen) oder abgelöst ist. Spermien mit intaktem postakrosomalen Bereich, die als „lebende“ Spermien eingeteilt

werden (siehe 3.1), hatten meistens auch eine intakte Kopfkappe. Nur 0,1% hatten eine geschädigte Kopfkappe und bei 0,05% hatte sich das Akrosom abgelöst. Dagegen waren bei den Spermien mit durchlässigem postakrosomalen Bereich („tote“ Spermien) die Akrosome meistens geschädigt (bei 73,7%) oder abgelöst (25,3%).

Die Proportion der Akrosombeschaffenheiten von den „toten“ Spermien änderte sich je nach Aufbereitungsart des Samens (Tabelle 10). Die Anzahl der Spermien mit intaktem Akrosom war in allen vier Aufbereitungsarten gleich niedrig. Der Anteil der Zellen mit geschädigter Kopfkappe war in nativem und mit Magermilchverdünner versetzten Sperma signifikant niedriger als bei Samen mit Eidotterverdünner und nach dem Tiefgefriervorgang. Spermien mit abgelöstem Akrosom traten am wenigsten bei eidotterversetzten Samen, signifikant häufiger dagegen in tiefgefrorenen Samen und am häufigsten bei magermilchverdünnten und nativen Samen.

Tabelle 10: Anteile der Spermien (in %) mit intaktem, geschädigtem oder abgelöstem Akrosom von allen „toten“ Spermien bei unterschiedlichen Aufbereitungsarten ($p < 0,05$ bei unterschiedlichen Buchstaben in gleicher Zeile).

Aufbereitungsart/ Akrosombeschaffenheit	Nativ	Eidotter- verdünner	Magermilch- verdünner	Tiefgefrorener Samen
Intaktes Akrosom	1,4 ^a	1,1 ^a	0,8 ^a	0,9 ^a
Geschädigtes Akrosom	60,6 ^a	79,3 ^b	63,3 ^a	70,2 ^b
Abgelöstes Akrosom	38,0 ^a	19,6 ^b	35,9 ^a	28,9 ^c

4.6 Spermienmorphologie

Die Samenproben wiesen durchschnittlich $9,7 \pm 5,0$ % primäre und $6,5 \pm 4,5$ % sekundäre Spermienanomalien auf (Tabelle 11).

Tabelle 11: Prozentuales Vorkommen der Spermienanomalien in den Besamungsdosen.

Primäre Anomalien (%)	Kopfanomalien	$6,2 \pm 3,3$
	Schwanzanomalien	$2,4 \pm 3,3$
	Mittelstückanomalien	$0,6 \pm 0,7$
	Doppelmissbildungen	$0,4 \pm 0,7$
	andere	$0,1 \pm 0,5$
Sekundäre Anomalien (%)	Krümmlinge	$4,5 \pm 3,8$
	andere	$2,0 \pm 2,7$
Zytoplasmatröpfchen (%)	proximale	$6,1 \pm 7,2$
	distale	$2,1 \pm 3,5$

Der Anteil von primären Schwanzanomalien korrelierte negativ mit dem der „lebenden“ Spermien nach der Kovács-Foote Färbung ($r = -0,26$) und hatte einen negativen Einfluss auf die VCL ($r = -0,16$). Auch der Anteil der Krümmlinge verhielt sich entgegengesetzt zu den mit dem Computer ausgewerteten Motilitätsparametern (VCL: $r = -0,14$; Vorwärtsmotilität: $r = -0,24$; $p < 0,05$). Ein Zusammenhang mit dem Vorkommen „lebender“ Spermien war dagegen nicht festzustellen.

Der Anteil der Mittelstückanomalien korrelierte nicht mit dem Prozentsatz geschädigter Mittelstückmembranen nach der Kovács-Foote Färbung ($p > 0,05$). Zwischen den restlichen Samenparametern und dem Anteil von morphologischen Anomalien konnten keine nennenswerte Korrelationen gefunden werden ($p > 0,05$).

4.7 Beziehungen zur Fertilität

Bei der Analyse der Befruchtungsergebnisse wurden die Stuten zunächst getrennt betrachtet, da bei denen, die in der Klinik besamt wurden, verlässlichere und genauere Daten über Besamungszeitpunkt und Ovulation bekannt waren, als bei denen, die mit Proben der Besamungsstation Schwaiganger besamt wurden.

4.7.1 Spermaproben von den Besamungen in der Klinik

4.7.1.1 Trächtigkeitsergebnisse der Stuten

In der Gynäkologischen Tierklinik wurden 35 Stuten in insgesamt 51 Rossezyklen einfach oder mehrfach besamt (Tabelle 12). Die Samenproben der 3 anovulatorischen Zyklen wurden von den folgenden Auswertungen (4.7.1.2) ausgeschlossen.

Tabelle 12: Anzahl der Rossezyklen mit Einfach- bzw. Mehrfachbesamungen und der erzielten Trächtigkeiten.

	Rossezyklen	Summe der Samenproben	Anzahl der Zyklen mit		
			Trächtigkeit	keiner Trächtigkeit	anovulatorischen Follikel
Einfachbesamungen	35	35	12	21	2
Doppelbesamungen	14	28	6	8	-
Dreifachbesamung	1	3	1	-	-
Vierfachbesamung	1	4	-	-	1
Summe	51	70	19	29	3

Die Stuten ovulierten in den Zyklen, bei denen hCG verabreicht wurde, durchschnittlich 38,9 ± 12,8 Stunden nach der hCG Injektion.

4.7.1.2 Einfluß der Samenqualität auf die Fruchtbarkeit

Da die Fruchtbarkeit, gemessen an den Trächtigkeitsergebnissen der Stuten, neben der Samenqualität von einer Reihe anderer Faktoren abhängig ist (Fruchtbarkeit der Stute, Besamungszeitpunkt, Anzahl der Besamungen, etc.), wurden die Beziehungen zwischen Samenqualität und Fruchtbarkeit unter möglichst standardisierten Bedingungen überprüft. Für die Analyse wurden nur die Fälle herangezogen, in denen es nach einmaliger Besamung in einem Rosseyklus zu einer Trächtigkeit kam bzw. nicht kam. Darüber hinaus wurden in einem zweiten Schritt die Konzeptionsraten, die mit „sehr guten“ und „sehr schlechtem“ Spermaparametern erzielt wurden, verglichen.

Von den 12 Samenproben, mit denen bei einmaliger Besamung eine Trächtigkeit erzielt wurde (Gruppe A), waren 5 native, 4 flüssigkonservierte und 3 tiefgefrorene Proben. Sie hatten durchschnittlich bessere Samenwerte als die restlichen 21 Proben, die bei einmaliger Besamung zu keiner Trächtigkeit führten (Gruppe B, Tabelle 13). Die größten Unterschiede waren bei den Vorwärtmotilitäten zu sehen. Bei den membranintakten Spermien, besonders deutlich bei der Kovács-Foote Färbung, wies die erste Gruppe eine höhere Anzahl auf. Bei den Spermengeschwindigkeiten war der größte Unterschied bei der VCL zu sehen (Tabelle 13). Diese tendenziellen Unterschiede in der Samenqualität waren allerdings in keinem Fall signifikant.

Anormale Spermien, mit Mittelstückmembranschädigungen, Kopfanomalien, proximalen Zytoplasmatröpfchen oder Krümmlinge, waren in den Proben der Gruppe der trächtigen Stuten (A) in geringerem Anteil vorhanden als in der Gruppe der nicht trächtigen Stuten (B, Tabelle 14). Dagegen waren mehr vorwärtsbewegliche Spermien pro Besamungsdose (bestimmt per Computeranalyse) bei den Proben der ersten als bei der zweiten Gruppe. Alle Differenzen waren nicht signifikant ($p > 0,05$).

Tabelle 13: Qualität der Samenproben ($\xi \pm s$), mit denen nach einmaliger Besamung eine Trächtigkeit erzielt (Gruppe A) bzw. nicht erzielt wurde (Gruppe B).

Gruppe	Vorwärtsmotilität (%)		„lebende“ Spermien (%)		Spermien- geschwindigkeiten ($\mu\text{m}/\text{sec}$)		
	subjektiv	Computer- auswertung	Bromphenol- blau- Nigrosin Färbung	Kovács- Foote Färbung	VCL	VAP	VSL
A (n=12)	46,7 $\pm 22,0$	46,9 $\pm 17,5$	71,2 $\pm 18,1$	61,5 $\pm 23,2$	190,7 $\pm 57,0$	110,3 $\pm 34,7$	86,8 $\pm 28,2$
B (n= 21)	35,9 $\pm 20,2$	36,7 $\pm 17,6$	66,0 $\pm 20,3$	53,9 $\pm 25,1$	176,4 $\pm 73,5$	98,4 $\pm 44,6$	73,0 $\pm 28,4$
Differenz der Mittelwerte	10,8	10,2	5,2	7,6	14,3	11,9	13,8

Tabelle 14: Qualität der Samenproben ($\xi \pm s$), mit denen nach einmaliger Besamung eine Trächtigkeit erzielt (Gruppe A) bzw. nicht erzielt wurde (Gruppe B).

Gruppe	Mittelstück- membran- Schädigungen (%)	Morphologische Anomalien (%)			Vorwärtsbew- egliche Spermien/ Dose ($\times 10^9$)
		Kopf- anomalien	Krümmlinge	Proximale Zytoplasma- tröpfchen	
A (n=12)	6,6 $\pm 6,4$	7,2 $\pm 3,2$	3,9 $\pm 2,1$	6,5 $\pm 5,8$	1,7 $\pm 1,7$
B (n=21)	7,9 $\pm 7,0$	7,6 $\pm 3,2$	6,6 $\pm 5,5$	6,7 $\pm 5,4$	0,6 $\pm 0,5$
Differenz der Mittelwerte	-1,3	- 0,4	- 2,7	- 0,2	1,1

Auf eine Darstellung der individuellen Befruchtungsergebnisse der Hengste wurde wegen der geringen Zahl an Besamungsdosen pro Hengst verzichtet.

4.7.2 Spermaproben von der Besamungsstation Schwaiganger

4.7.2.1 Trächtigkeitsergebnisse der Stuten

Bei den 108 Stuten, die Samen von der Besamungsstation zugeschickt bekamen, konnte aus organisatorischen Gründen nicht ermittelt werden, wann die Stuten in Bezug zum Ovulationszeitpunkt besamt wurden. Die Station Schwaiganger verschickte 500 Samenproben für die Verwendung bei diesen 108 Stuten, die in insgesamt 227 Rossezyklen besamt wurden (Tabelle 15).

Tabelle 15: Anzahl der Rossezyklen mit Einfach- bzw. Mehrfachbesamungen und der erzielten Trächtigkeiten.

	Rossezyklen	Summe der Samenproben	Anzahl der Zyklen	
			mit Trächtigkeit	ohne Trächtigkeit
Einfachbesamungen	79	79	25	54
Doppelbesamungen	81	162	18	63
Dreifachbesamungen	26	78	12	14
Vierfachbesamungen	29	116	15	14
Fünffachbesamungen	7	35	6	1
Sechsfachbesamungen	5	30	1	4
Summe	227	500	77	150

Aus organisatorischen Gründen konnten jedoch nur 111 Samenproben untersucht werden.

Von diesen wurden 47 für eine einmalige Besamung in einer Rosse verwendet. Dabei wurden 17 Trächtigkeiten erzielt, in 30 Zyklen kam es zu keiner Befruchtung.

4.7.2.2 Einfluß der Samenqualität auf die Fruchtbarkeit

Ebenso wie bei den Besamungen in der Klinik wurden für diese Auswertung nur Samenproben verwendet, bei denen es bei einmaliger Besamung in einem Rossezyklus zu einer

Trächtigkeit kam bzw. nicht kam. Bei den 47 einmaligen Besamungen in einer Rosse wurden die Samenparameter der 17 Proben, die zu einer Trächtigkeit führten, mit den 30 anderen Proben, die keine Trächtigkeit erreichten, verglichen (Tabelle 16, 17). Die erste Gruppe hatte durchschnittlich höhere, jedoch statistisch nicht signifikante Werte bei der Vorwärtsmotilität und den „lebenden“ Spermien. Bei den Spermigeschwindigkeiten hatte nur die VCL höhere Werte in der Gruppe, mit deren Samenproben eine Konzeption erreicht wurde. Bei den Motilitätsparametern VAP und VSL waren die Werte der Gruppe A dagegen geringgradig niedriger als die der Gruppe B (Tabelle 16). Statistisch konnte diese Tendenz zu einer besseren Spermaqualität in der Gruppe mit erfolgreicher Besamung jedoch in keinem Fall abgesichert werden.

Tabelle 16: Qualität der Samenproben ($\bar{x} \pm s$), mit denen nach einmaliger Besamung eine Trächtigkeit erzielt (Gruppe A) bzw. nicht erzielt wurde (Gruppe B).

Mittelwerte	Vorwärtsmotilität (%)		„lebende“ Spermien (%)		Spermigeschwindigkeiten ($\mu\text{m}/\text{sec}$)		
	subjektiv	Computerauswertung	Bromphenolblau-Nigrosin Färbung	Kovács-Foote Färbung	VCL	VAP	VSL
A (n=17)	38,2 $\pm 18,5$	44,7 $\pm 17,9$	76,5 $\pm 12,1$	64,4 $\pm 13,2$	212,4 $\pm 53,9$	110,3 $\pm 25,2$	85,2 $\pm 20,2$
B (n=30)	36,5 $\pm 21,8$	40,9 $\pm 21,9$	74,5 $\pm 15,2$	60,1 $\pm 17,0$	206,6 $\pm 50,4$	110,9 $\pm 32,2$	86,7 $\pm 27,7$
Differenz der Mittelwerte	1,7	3,8	2,0	4,3	5,8	-0,6	-1,5

Die Anzahl der Spermien mit geschädigtem Mittelstück war bei den Samenproben der Gruppe A geringgradig niedriger ($p > 0,05$) als in der Gruppe B (Tabelle 17). Die übrigen Anomalien wichen ebenfalls nur unwesentlich ($p > 0,05$) in den beiden Gruppen voneinander ab.

Tabelle 17: Qualität der Samenproben ($\bar{x} \pm s$), mit denen nach einmaliger Besamung eine Trächtigkeit erzielt (Gruppe A) bzw. nicht erzielt wurde (Gruppe B).

Gruppe	Mittelstück- membran- Schädigungen (%)	Morphologische Anomalien (%)			Vorwärtsbewegliche Spermien/ Dose ($\times 10^8$)
		Kopf- anomalien	Krümmlinge	Proximale Zytoplasma- tröpfchen	
A (n=17)	6,3 \pm 3,9	6,2 \pm 3,8	3,5 \pm 2,6	5,2 \pm 8,2	4,9 \pm 3,2
B (n=30)	8,9 \pm 5,6	4,9 \pm 2,0	4,1 \pm 2,9	4,6 \pm 7,4	5,2 \pm 4,1
Differenz der Mittelwerte	- 2,6	1,3	- 0,6	0,6	- 0,3

Da auf Grund der kleinen Fallzahlen statistisch abgesicherte Zusammenhänge zwischen Samenqualität und erzielter Trächtigkeit nicht herstellbar waren, wurden die oben genannten Tendenzen mit Hilfe einer weiteren Analyse auf ihre Aussagefähigkeit überprüft. Um eine größere Fallzahl für die Auswertung zur Verfügung zu haben, wurden die 47 Proben von einmaligen Besamungen der Station Schwaiganger mit den 33 Proben der Einfachbesamungen der Klinik, insgesamt 80 Proben, in einer Gruppe zusammengefaßt. Zum Überprüfen eines möglichen Einflusses der einzelnen Samenparameter auf die Fruchtbarkeit wurden diese Proben nach den einzelnen Qualitätsmerkmalen sortiert. So wurden bei jedem Parameter die 10% besten Proben mit den 10% schlechtesten Proben (jeweils 8 Proben) auf ihre Trächtigkeitsergebnisse hin verglichen (Tabelle 18).

Beim Vergleich der Trächtigkeitsergebnisse, die mit den 8 besten bzw. den 8 schlechtesten Spermaproben erzielt wurden, ist bei der Mehrzahl der für die Auswertung benützten Sperma-
parameter ein leichter Trend zugunsten der besseren Spermaqualität zu sehen (Tabelle 18).
Auf Grund der geringen Fallzahlen sind konkretere, statistisch abgesicherte Aussagen jedoch nicht möglich.

Tabelle 18: Hierarchisierung nach einzelnen Samenparametern der 80 Samenproben, die bei einmaliger Besamung pro Rosse in der Klinik und Station Schwaiganger verwendet wurden. Anzahl der Stuten, die von den jeweils 10% besten und 10% schlechtesten Proben (jeweils n=8) trächtig wurden.

Samenparameter		8 besten Proben		8 schlechtesten Proben	
		Spermawerte von: bis:	Trächtige Stuten (von 8)	Spermawerte von: bis:	Trächtige Stuten (von 8)
Vorwärtsmotilität (%)	Schätzung	70	4	0- 10	2
	Computer- auswertung	65,3- 74,7	4	1,9- 13,8	0
Spermien- geschwindig- keiten (µm/sec)	VCL	268,4- 367,7	3	49- 118,7	1
	VAP	151,3- 202,7	2	32,9- 58,8	1
	VSL	116,3- 140,4	2	23,2- 42,4	1
„Lebende“ Spermien (%)	Bromphenolblau- Nigrosin	88- 94,7	2	20- 45,3	1
	Kovács-Foote	80,3- 86,3	4	8,3- 26	2
Mittelstückschädigungen (%)		0,3- 1,7	3	17,3- 21,3	1
Kopfanomalien (%)		2- 2,7	5	11,3- 15	4
Krümmlinge (%)		0- 0,7	2	8,7- 21	1
Proximale Zytoplasmatröpfchen (%)		0- 0,7	2	14,3- 33,3	4
Anteile der abgelösten Akrosome bei den „toten“ Spermien (%)		0- 8,1	2	44,0- 59,2	3
Vorwärtsbewegliche Spermien/Dose (x 10⁹)		1,5- 4,9	5	0,02- 0,1	0

Deswegen wurde eine weitere Auswertung vorgenommen, bei der die Trächtigkeitsergebnisse der Spermaproben, die hinsichtlich der 3 Qualitätsmerkmale Vorwärtsmotilität, „lebende“ Spermien (ermittelt durch Kovács-Foote Färbung) und Anzahl vorwärtsmotiler Spermien/Dose am besten waren, mit den Proben, die bei der Kombination dieser drei Kriterien am schlechtesten abschnitten, verglichen wurden.

Die 8 besten Proben hatten eine Vorwärtsmotilität (geschätzt und per Computeranalyse ermittelt) von über 50%, einen Anteil von „lebenden“ Spermien von über 64% in der Kovács-

Foote Färbung und über $6,3 \times 10^8$ vorwärtsmotile Spermien pro Besamungsdose. Von diesen 8 auf diese Weise definierten besten Proben wurden 7 Stuten trächtig.

Die 8 schlechtesten Proben wiesen eine Vorwärtsmotilität von unter 20%, einen Anteil von „lebenden“ Spermien von weniger als 22% und weniger als $1,3 \times 10^8$ vorwärtsmotile Spermien pro Besamungsdose auf. Mit diesen schlechtesten Proben wurden nur 2 der 8 Stuten trächtig.

5 Diskussion

Die möglichen Zusammenhänge zwischen Samenqualität und Fruchtbarkeit sind nach wie vor ungeklärt, aber wegen ihrer praktischen Bedeutung Gegenstand vieler Untersuchungen. Man ist sich darüber einig, daß es keinen einzelnen Samenparameter gibt, der die Fertilitätsrate vorhersagen kann. Allerdings geht man davon aus, daß durch die Kombination mehrerer Spermaparameter, vor allem der Motilität und Membranintegrität, bessere Korrelationen zur Fruchtbarkeit herstellbar sind (DÍAZ und DÍAZ, 1989; MAGISTRINI et al., 2001; WABERSKI et al., 1999). Da in der Literatur die Kovács-Foote Färbung als eine besonders gut geeignete Methode zur Überprüfung der Membranintegrität der Spermien bei Bulle und Eber beschrieben worden ist, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst untersucht, ob diese Färbemethode auch für Hengstsamen anwendbar ist. Neben diesen methodischen Untersuchungen wurde im zweiten Abschnitt überprüft, ob und welche Beziehungen zwischen den so ermittelten Spermaparametern und der Fruchtbarkeit von Hengsten bestehen.

Die Kovács-Foote Färbung kann im Gegensatz zu herkömmlichen Vitalfärbungen wie beispielsweise die Bromphenolblau-Nigrosin Färbung nicht nur den „Lebend/Tot“- Status der Spermien anzeigen, sondern auch Information über den Akrosomzustand und die Schädigung der Mittelstückmembran liefern. Auf Grund der unterschiedlichen Anfärbung der einzelnen Spermienstrukturen haben KOVÁCS und FOOTE (1992) bei Bulle und Eber eine Eingruppierung der Spermien in sieben Klassen (siehe 3.1) vorgenommen. Dies ist, wie die eigenen Untersuchungen zeigten, auch für Hengstspermien in reproduzierbarer Form möglich.

Anhand der Percoll-Separation konnte belegt werden, daß Spermien mit geschädigter Mittelstückmembran immotil sind, wie schon von NAGY et al. (1999) für Bullenspermien vermutet wurde. Der Anteil der Spermien, die eine intakte Beschaffenheit des Akrosoms und gleichzeitig des postakrosomalen Bereichs und der Mittelstückmembran aufweisen, war geringer,

als derjenige der membranintakten Spermien, der durch die Bromphenolblau-Nigrosin Färbung ermittelt wurde. Auch war die Korrelation zwischen dem mit der Kovács-Foote Färbung ermittelten Anteil membranintakter Spermien und der Motilität der Spermien besser als bei der Bromphenolblau-Nigrosin Färbung (siehe Abb. 27).

Weiterhin zeigte sich, daß die Kovács-Foote Färbung auch für die Untersuchung von konservierten Samenproben geeignet ist, und zwar sowohl für flüssigverdünnte als auch tiefgefrorene Proben. Bei längerer Aufbewahrungszeit des Samens nehmen Schädigungen der Mittelstückmembran deutlicher zu als die der Kopfmembran. Auch nach dem Einfrierprozess wurden ein deutlich höherer Anteil der Mittelstückschädigungen bei noch intakten Kopfmembranen beobachtet. Dies deutet darauf hin, daß die Mittelstückmembran sensibler und als erstes auf äußere Reize wie Kälteeinwirkung reagiert. Die unterschiedliche Sensibilität und Farbstoffdurchlässigkeit der Membranen ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß die Plasmamembran des Spermiums verschiedene Baumuster im Kopf- und Mittelstückbereich hat (SINOWATZ, 2001). So entsteht laut ROVAN (2001) der Eindruck, „als ob von einer Zelle in den unterschiedlichen Regionen unterschiedliche Funktionen unabhängig voneinander ausgeübt werden können“.

Eine weitere methodische Frage, die in der vorliegenden Arbeit bearbeitet wurde, betrifft die Ermittlung des geeignetsten Verdünnungsgrades mit NaCl-Lösung für die Kovács-Foote Färbung. Bei steigender Verdünnungsreihe nahm der Anteil der kopfmembranintakten Spermien deutlich ab. Insbesondere war dies bei den Proben mit eidotterhaltigem Verdüner zu beobachten. Bei der Suche nach einer Erklärung stellt sich die Frage, ob die Eidotterpartikel den Farbstoff absorbiert haben (pers. Mitteilung, NAGY, 2000) und so bei unverdünnten Proben fälschlich eine erhöhte Anzahl von membranintakten Spermien lieferten, oder ob die NaCl-Lösung die Spermien geschädigt hatte und so bei stärkeren Verdünnungen mehr

geschädigte Spermien gezählt wurden. Vermutlich handelt es sich um das Zusammenwirken beider Mechanismen, da einerseits auch im Nativsamen bei höherem Verdünnungsgrad weniger intakte Spermien auftraten, was nur durch Schädigung durch die NaCl-Lösung und nicht durch Farbstoffabsorption erklärbar ist. Andererseits wurden in der unverdünnten Gruppe der Proben mit Eidotterpartikeln mehr kopfmembranintakte Spermien gezählt, als bei der unverdünnten der Nativsamenproben vom gleichen Ejakulat, was mit der Farbstoffabsorption erklärbar wäre. Deswegen und aufgrund der subjektiv besseren Auswertbarkeit, erscheinen die NaCl-Verdünnungsstufen 1:1 und 1:4 für die Untersuchung von Hengst-spermien empfehlenswert.

Insgesamt gesehen hat sich gezeigt, daß die Kovács-Foote Färbung leicht erlernbar ist und weiterhin den Vorteil hat, daß sie preisgünstige Färbemittel verwendet und nur ein Lichtmikroskop benötigt. Darüber hinaus ist sie die einzige lichtmikroskopische Methode, die das Mittelstück färbt. Bei Bullenspermien liefert die Kovács-Foote Färbung vergleichbare Ergebnisse wie die mit Flowzytometrie ausgewerteten Fluoreszenzfärbungen (pers. Mitteilung, NAGY, 2001), gleichzeitig ist sie weniger aufwendig. Allerdings ist die Durchführung Kovács-Foote Färbung komplizierter und langwieriger als die Bromphenolblau-Nigrosin Färbung. Die Verwendbarkeit der Kovács-Foote Färbung in der Praxis der künstlichen Besamung beim Pferd wurde anhand von 181 Samenproben überprüft. Sie erbrachte selbst bei unterschiedlich konservierten Proben zuverlässige Ergebnisse.

Wie schon vielfach durch andere Untersuchungen belegt wurde, gibt es große individuelle Schwankungen bei der Bestimmung einzelner Parameter der Spermaqualität. Dies gilt insbesondere für die Motilität, die geschätzt oder per Computeranalyse bestimmt werden kann. In der vorliegenden Studie wurden je nach Erfahrung des Untersuchers in der Beurteilung von Hengstsperma unterschiedlich gute Korrelationen zwischen den Schätzwerten und

der Computerauswertung ermittelt. Bei erfahreneren Tierärzten ergab sich eine durchschnittliche Korrelation von $r=0,76$, bei Tierärzten, die seltener Hengstsamen untersuchten, lag diese bei $r=0,71$ und bei den technischen Assistentinnen betrug sie $r=0,62$. Diese Korrelationen waren geringer als die von LEIDL et al. (1987) bei Bullensperma ermittelten ($r=0,81$).

Diese individuell bedingten Schwankungen haben neben anderen Ursachen zu Folge, daß Schätzwerte verschiedener Labors nur bedingt vergleichbar sind. Auch die Ergebnisse der computergestützten Motilitätsbestimmung unterliegen verschiedenen methodisch bedingten Einwirkungen. Hengstpermien werden aufgrund ihrer geringen Größe leicht mit Eidotterpartikeln verwechselt (ZIEGLER, 1991). Darüber hinaus beeinflussen auch unterschiedliche Einstellungen des Computeranalyseprogramms die Ergebnisse. Diese Einstellungen werden bei den veröffentlichten Artikeln in der Regel jedoch nicht angegeben. Hinzu kommt, daß alle Methoden nur einen kleinen Ausschnitt der Gesamtmenge der Spermien auswerten. Diese und andere methodische Variationen sind der Grund dafür, daß die Ergebnisse verschiedener Laboratorien nur bedingt vergleichbar sind.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Überprüfung möglicher Zusammenhänge zwischen den ermittelten Qualitätsdaten einer Samenprobe und dem Ergebnis der Besamung. Da die Konzeptionsergebnisse nicht nur von der Qualität der Samenportion, sondern auch von der Fruchtbarkeit der Stute und schließlich ganz erheblich vom sogenannten Besamungsmanagement (wie Anzahl und Zeitpunkt der Inseminationen) abhängig sind, ist es schwierig, die Zusammenhänge von Spermaqualität und Fruchtbarkeit zu ermitteln. Dies gilt für die Verhältnisse beim Pferd um so mehr, weil die Fallzahlen im Vergleich zur Rinderbesamung äußerst gering sind. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß Besamungshengste schon aufgrund ihrer Samenqualität vorselektiert sind, also nicht die gesamte biologische Bandbreite der Spermaparameter vorhanden ist (McDONALD und PINEDA, 1989).

Um die genannten Variationsursachen soweit als möglich auszuschalten, wurden in dieser Arbeit nur die Fälle für die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Samenqualität und Befruchtungsergebnis herangezogen, in denen Stuten nur einmal pro Rosse besamt wurden. Trotz dieser Selektion und Standardisierung der Fälle konnte in der Gruppe der Stuten, die konzipierten, keine eindeutig bessere Spermaqualität als in den Fällen, in denen es nicht zur Konzeption kam, gefunden werden (Tabelle 13, 14, 16, 17). Es waren lediglich Tendenzen für bessere Werte, insbesondere bei der Vorwärtsmotilität und dem Anteil membranintakter Spermien nach der Kovács-Foote Färbung zu beobachten (Tabelle 13, 16). Bei der Mehrzahl der überprüften Qualitätsmerkmalen konnte zwar wieder ein Trend zu besseren Werten in der Gruppe der erfolgreichen Besamung festgestellt werden, allerdings waren diese Unterschiede auch bei dieser Form der Auswertung nicht signifikant.

Um diese Tendenzen auf ihre Aussagekraft hin zu überprüfen, wurden in einem weiteren Schritt die besten und schlechtesten 10% der Proben, aufgeschlüsselt nach einzelnen Qualitätskriterien wie Vorwärtsmotilität, etc. auf ihre Zusammenhänge mit den Trächtigkeitsergebnissen hin verglichen (Tabelle 18). Auch hier ergaben sich für die Mehrzahl der ausgesuchten Spermaparameter geringgradig bessere Werte bei erfolgreicher Besamung, die Unterschiede konnten aber ebensowenig statistisch belegt werden.

Schließlich bestätigte sich, daß durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer Qualitätskriterien eine deutlichere Korrelation zu den erwarteten Besamungsergebnissen herstellbar ist (HAFEZ, 1989; WABERSKI et al., 1999). Die entsprechende Auswertung unter Einbezug der biologisch als besonders relevant angesehenen Qualitätsmerkmale Vorwärtsmotilität, Membranintegrität (ermittelt durch Kovács-Foote Färbung) und Anzahl vorwärtsmotiler Spermien pro Besamungsdose ergab, daß 7 von 8 Stuten, die mit den so definierten besten Samenpor-

tionen inseminiert worden waren, trächtig wurden, wohingegen mit den 8 schlechtesten Proben nur 2 von 8 Stuten konzipierten.

Schlussfolgerungen:

Die Kovács-Foote Färbung ist eine praktikable Methode zur Beurteilung der Membranintegrität von Hengstsperma, die mehr und zuverlässigere Informationen als herkömmliche Vitalfärbungen wie die Bromphenolblau-Nigrosin Färbung liefert. Insbesondere durch die Färbung des geschädigten Mittelstück zeigt sie frühzeitiger und sensibler einen Qualitätsverlust des Samens an.

Es bestätigte sich, daß auf Grund eines einzigen Merkmals der Spermaqualität eine Vorhersage der Fertilität von Hengtsamen nicht möglich ist. Dies gilt auch für die hier überprüfte Kovács-Foote Färbung. Die Kombination der Qualitätsmerkmale Prozentsatz vorwärtsmotiler Spermien, Anteil membranintakter Spermien ermittelt mit der der Kovács-Foote Färbung und Anzahl vorwärtsmotiler Spermien pro Besamungsdose läßt im Vergleich dazu eine zuverlässigere Aussage über die voraussichtlichen Konzeptionsergebnisse erwarten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die gebräuchlichsten Methoden zur Qualitätsbestimmung von Hengstsamen zu vergleichen und zu überprüfen, ob durch den Einsatz der Kovács-Foote-Färbung die Vorhersage der Befruchtungsfähigkeit verbessert werden kann.

Um die neuartige Kovács-Foote-Färbung auf ihre Verwendbarkeit bei Pferdesamen hin zu testen, wurden zunächst methodische Voruntersuchungen durchgeführt. Dazu wurde das Färbeverhalten der Spermien nach Schockgefrieren, provozierter Akrosomenreaktion und Verdünnung mit NaCl getestet, sowie die Immotilität mittelstückgeschädigter Spermien mittels des Percollverfahrens nachgewiesen. Zur Reproduzierbarkeit der Färbemethode wurden Wiederholungszählungen durchgeführt.

Zum Vergleich der üblichen Methoden zur Motilitätsbestimmung von Samenproben wurden die Schätzwerte von sieben Personen den Werten, die mit Hilfe zweier spezieller Computerprogramme ermittelt wurden, gegenübergestellt.

Zur Überprüfung der möglichen Zusammenhänge zwischen Samenqualität und Fruchtbarkeit wurden insgesamt 80 Besamungsdosen, die bei 80 Einfachbesamungen pro Rosse zum Einsatz kamen, untersucht. Die Qualität der Samenportionen wurde anhand der üblichen Parameter und der oben erwähnten Methoden beurteilt. Die so erhobenen Werte wurden mit den aus diesen Belegungen erzielten Trächtigkeiten in Bezug gesetzt.

Es zeigte sich, daß die Kovács-Foote Färbung auch bei Hengstsamen reproduzierbare Ergebnisse liefert und daß diese Färbemethode die Unversehrtheit der Spermienmembran differenzierter darstellt, als die bereits etablierte Bromphenolblau-Nigrosin Färbung, da sie

auch Aussagen über die Integrität der Kopfkappe und der Membran des Mittelstücks zuläßt. Sie erwies sich auch für die Untersuchung von flüssigkonservierten und tiefgefrorenen Samenproben des Hengstes als geeignet.

Beim Vergleich der Samenportionen, die eine Trächtigkeit erreichten, mit denjenigen, die keine Konzeption erzielten, ergaben sich für die einzelnen Qualitätsmerkmale bei erfolgreicher Insemination tendenziell bessere Werte ($p > 0,05$). Die Parameter mit der relativ besten Aussagekraft hinsichtlich der Fertilität waren die Vorwärtsbeweglichkeit und der Anteil der membranintakten Spermien nach der Kovács-Foote Färbung. Bei der Gegenüberstellung der Befruchtungserfolge der 10% (8) besten und der 10% (8) schlechtesten Spermproben, jeweils gemessen an den einzelnen Parametern, ergaben sich wiederum für die beiden Qualitätsmerkmale Vorwärtsmotilität und Membranintegrität die relativ besten Zusammenhänge mit der Fertilität. Die Unterschiede in den erzielten Trächtigkeiten waren allerdings nicht signifikant (jeweils 4 Trächtigkeiten bei Inseminationen mit den 8 besten Proben und jeweils 2 Trächtigkeiten mit den 8 schlechtesten Proben). Ein deutlich besserer Zusammenhang zwischen Samenqualität und Konzeptionsergebnissen wurde bei der gleichzeitigen Verwendung der drei Merkmale Vorwärtsbeweglichkeit, Membranintegrität und vorwärtsbewegliche Spermien/Besamungsdosis erkennbar. Die Insemination mit den so definierten acht besten Portionen führte in 7 von 8 Fällen zum Erfolg, während mit den acht schlechtesten Dosen nur in 2 von 8 Fällen eine Trächtigkeit erzielt wurde.

Insgesamt zeigte sich, daß die hier überprüfte Kovács-Foote Färbung für die Beurteilung der Membranintegrität von Hengstspermien besser geeignet ist als die herkömmlichen Supravitalfärbungen. Bei gleichzeitiger Verwendung mit den Qualitätskriterien Spermienmotilität und Anzahl motiler Spermien in der Besamungsdosis läßt sie relativ zuverlässige Aussagen über die Befruchtungsfähigkeit einer Besamungportion zu.

7 SUMMARY

„Evaluation of stallion semen –particularly motility and membrane integrity- and relationship to fertility“

The aim of the present study was to compare the common evaluation methods of stallion semen. The new Kovács-Foote stain was tested upon its capability to improve the prediction of fertility.

Methodical tests were carried out to ascertain the validity of the Kovács-Foote stain for stallion semen. The reaction of the sperm to shockfreezing, artificially induced acrosome reaction and dilutions with NaCl-solution were investigated. The Percoll separation method proved that sperm with damaged midpiece are immobile. Repeated counts of stained smears were performed to test the repeatability.

For the evaluation of sperm motility the subjective results of seven persons were compared with two computerassisted methods.

The relationship between sperm quality and fertility was examined in 80 semen samples that were used for single insemination in mares. The common parameters were evaluated with the methods described and compared with the fertility achieved.

It could be demonstrated that the Kovács-Foote stain provides repeatable results with native, fresh diluted and deep- frozen stallion semen samples. This method offers more detailed information than the Bromphenolblue- Nigrosin stain, such as acrosome status and membrane integrity of head and midpiece.

Semen samples, which resulted in a pregnancy after a single insemination, had a slightly better quality than the other semen samples ($p>0.05$). The most useful parameters were: progressive motility and the percentage of spermatozoa with an intact plasma membrane (Kovács-Foote stain). After ranking the 80 semen samples according to single parameter, inseminations performed with the 10% (8) highest and 10 % (8) lowest ranked semen samples only resulted in slightly different pregnancy rates. Again the parameter progressive motility and percentage of intact plasma membrane showed the relatively best correlations (4 pregnancies were obtained with the 8 best samples and 2 with the 8 worst samples for each parameter). A combination of three parameters (progressive motility, total number of spermatozoa with progressive motility and percentage of spermatozoa with intact plasma membrane) provided a more reliable prognosis of the single cycle pregnancy rate. When all semen samples were ranked on the combination of these 3 parameters, 7 out of 8 mares inseminated became pregnant by the top 8 semen samples, whereas using the 8 lowest ranked samples, only in 2 out of 8 inseminations gained a pregnancy.

In conclusion, the Kovács-Foote staining method provides more reliable information than common vital stains, regarding the quality of semen samples of stallions. With the combination of the quality parameters motility and number of motile sperm per dosis, this staining method allows a relatively reliable statement about the fertility of a insemination sample.

8 LITERATURVERZEICHNIS

AUGER, J.; RONOT, X.; DADOUNE, J.P. (1989):

Human sperm mitochondrial function related to motility: A flow and image cytometric assessment.

J. Androl., 10: 439- 448.

BAUMGARTL, C. (1980):

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über Veränderungen der Plasmamembran und Akrosomstruktur von Pferdespermien.

Vet. Med. Diss., Hannover.

BOSTOFE, E.; SERUP, J.; REBBE, H. (1984):

Relation between number of immobile spermatozoa and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period immobile spermatozoa and fertility.

Andrologia, 16:136.

BRAUN, J.; HIRSCH, T.; KRAUSE, W.; ZIEGLER, A. (1991):

Evaluation of the acrosome reaction using monoclonal antibodies against different acrosomal antigens – comparison with the triple stain technique.

Int. J. Androl., 14: 431- 436.

CASEY, P.J.; GRAVANCE, C.G.; DAVIS, R.O.; CHABOT, D.D.; LIU, I.K.M. (1997):

Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions.

Theriogenology, 47: 575-582.

CLÉMENT, F.; LADONNET, Y.; MAGISTRINI, M. (2001):

Sperm Morphology and Fertility.

3rd International Symposium on Stallion Reproduction, January 10-12, 2001, Colorado State University, Fort Collins, CO, p. 78.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. (1997):

Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, 48: 721- 731.

DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. (1993):

Operational standards for CASA instruments.
J. Androl. 14: 385- 394.

DAVIS, R.O.; SIEMERS, R.J. (1995):

Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion.
In: Seventh International Symposium on Spermatology: Plenary Papers. *Reproduction, Fertility and Development*. 7: 857- 869

DÍAZ, O.H.; DÍAZ, A. (1989):

Sexualidad y control reproductivo en equinos.
Ograma S.A., Santiago/Chile.

DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. (1989):

Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species.
Gamete Res., 22: 51- 57.

DIDION, B.A.; GRAVES, C.N. (1986):

In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows.
J. Anim. Sci., 62: 1029- 1033.

DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.; WOELDERS, H. (1991):

The fix vital stain method. Simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa.
J. Androl., 12: 112- 118.

DOTT, H.M. (1975):

Morphology of stallion spermatozoa.

J. Reprod. Fert., Suppl. 23: 41-46.

ECOT, P.; ARNAUD, G.; MOY, A.; DAELS, P.; MAGISTRINI, M.; VIDAMENT, M. (2001):

Comparison of fertility and post-thaw semen criteria of stallion semen frozen in two different extenders.

3rd International Symposium on Stallion Reproduction, January 10-12, 2001, Colorado State University, Fort Collins, CO, p. 74

ENGLAND, G. (1996):

Allen's Fertility and Obstetrics in the Horse.

Blackwell Science Ltd., Oxford, London, Edinburgh, Cambridge, Massachusetts.

ERICSSON, S.A.; GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; DOWNING, T.W.; MARSHALL, C.E. (1993):

Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa.

Theriogenology, 39: 1009- 1024.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. (1982):

Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility.

J. Histochemistry and Cytochemistry, 30: 279- 280.

FERNANDES, C.A.; PIMENTEL, C.A.; ALVES-PIMENTEL, C. (1997):

Acrosome abnormalities and fertility in a stallion. A case study. Anormalidades de accrossomo e fertilidade em um garanhao. Relato de um caso.

Ciencia-Rural. 27(2): 345-349.

**GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; DE JARNETTE, J.M. ;
MARSHALL, C.E. (1997):**

Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.

Biol. reprod., 57: 1401- 1406.

GEISLER, A. (1990):

Prüfung von Vitalfärbungen für Spermien von Haussäugetieren.

Vet. Med. Diss., München.

GODEAUX, S.D.; KREIDER, J.L. (1978):

Motility and fertility of stallion spermatozoa isolated in bovine serum albumin.

Theriogenology, 10: 405-414.

GSCHWEND, H.J. (1986):

Untersuchungen über die Motilität von Bullenspermien, insbesondere über den Einfluss ihrer Geschwindigkeit auf das Befruchtungsvermögen.

Vet. Med. Diss., München.

HAFEZ, E.S.E. (1989):

Reproducción e inseminación artificial en animales.

Interamericana- McGraw-Hill. Mexiko, New York.

HELLANDER, J.C.; SAMPER, J.C.; CRABO, B.G. (1991):

Fertility of a stallion with low sperm motility and a high incidence of an unusual sperm tail defect.

Veterinary Record. 128(19): 449-451.

HIRAI, M. (2000):

Computergestützte Untersuchung der Spermienmorphologie und –motilität bei Bulle und Eber: Beziehungen zur Fertilität.

Vet. Med. Diss., München.

HOFMANN, N.; FREUNDL, G. (1986):

Die mikroskopische Spermaanlyse.

Fertilität 2: 135.

JANUSKAUSKAS, A. (1999):

Assessment of viability and function of post-thaw spermatozoa from swedish dairy AI bulls.

Doctoral thesis. Uppsala.

JANUSKAUSKAS, A.; SÖDERQUIST, L.; HÅÅRD, M.G.; HÅÅRD, M.C.; LUNDEHEIM, N., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1996):

Influence of sperm number per straw on the post-thaw sperm viability and fertility of swedish red and white A.I. bulls.

Acta vet. scand., 37: 461- 469.

JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. (1991):

The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion.

Theriogenology, 35: 317-327.

JASKO, D.J.; LITTLE, T.V.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. (1992):

Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988).

J. Am. Vet. Med. A., 200: 979- 985.

JASKO, D.J.; LITTLE, T.V.; SMITH, K.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. (1988):

Objective analysis of stallion sperm motility.

Theriogenology, 30: 1159- 1167.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. (1984):

Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.

J. Reprod. Fert., 70: 219- 228.

KATILA, T. (2001):

In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review.

Acta veterinaria scandinavica, 42: 199- 217.

KENNEY, R.M.; BERGMANN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. (1975):

Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings.

Proc. of the Ann. Conf. Am. Assoc. Equine Pract. 21: 327- 336.

KJÆSTAD, H.; ROPSTAD, E.; ANDERSEN BERG, K. (1993):

Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen.

Acta vet. Scand., 34: 299-303.

KLUG, E. (1993):

Frischsamenübertragung beim Pferd.

4. Auflage, Verlag M.&H. Schaper Alfeld- Hannover.

KOVÁCS, A.; FOOTE, R.H. (1992):

Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa.

Biotechnic & Histochemistry. 67: 119-124.

KOVÁCS, A.; FOOTE, R.H.; NAGY, SZ.; BOERSMA, A.; LEIDL, W.; STOLLA, R.; DOMES, U. (2000):

Live/dead and acrosome staining of stallion spermatozoa.

14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, 2-6 July 2000, Vol. 1: 82.

KRAUSE, W. (1991):

Untersuchung des Ejakulates.

In: Krause, W.; Rothauge, C.F. (Hrsg.): Andrologie, Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Seite 52- 66.

LAGARES, M.A.; PETZHOLT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. (2000):

Application of hypo-osmotic swelling test for prediction of equine semen fertilizing capacity.

14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, 2-6 July 2000, Vol. 1: 95.

LANDIM, E.; ALVARENGA F. da C.; ALVARENGA, M.A. (1997):

Microtubular defect in equine spermatozoa associated with infertility.

Equine Veterinary Journal. 29(6): 487-489.

LARSSON, K.; BANE, A. (1987):

Semen characters and fertility in Swedish Warmblood trotters.

Svensk veterinartidning, 39: 251- 253.

LEIDL, W.; SCHEFELS, W.; STOLLA, R.; METZGER, E. (1971):

Differenzierung und Befruchtungsvermögen pathologischer Spermien.

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 78: 129- 134.

LEIDL, W.; RIEMKE, P.; SCHRÖPPEL, I. (1987):

Computergesteuerte Videomikrographie- Auswertung zur Bestimmung der Spermienmotilität am Modell des Bullen.

Dtsch. Tierärztl. Wschr., 94: 461- 464.

LEIDL, W.; RIEMKE, P.; BRAUN, J.; LOTZE, A.; SCHRÖPPEL, I.; SCHUH, H.; STUMPE, G. (1989):

Untersuchung der Spermienmotilität mit einem Computer- Videomikrographie- Verfahren.

Tierärztl. Umschau, 44: 250- 254.

LICHTENSTERN, A. (1995):

Färbeverhalten von Bullen-, Schafbock- und Eber- Spermien vor und nach in vitro-

Kapazitation in verschiedenen Medien.

Vet. Med. Diss., München.

LINFORD, E.; GLOVER, F.A.; BISHOP, C.; STEWART, D.L. (1976):

The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull.

J. Reprod. Fert. 47: 283- 291.

LONERGAN, P. (1994):

The application of in vitro fertilization techniques to the prediction of bull fertility.

Reprod. Dom. Anim. 29: 12-21.

LUDWIG, G.; FRICK, J. (1987):

Praxis der Spermatologie, Atlas und Anleitung.

Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.

MAGISTRINI, M.; VIDAMENT, M.; LABBÉ, C.; GENNEVIEVE, A.; STRADAIOLI, G. (2001):

Assessment of sperm quality.

3rd International Symposium on Stallion Reproduction, January 10-12, 2001, Colorado State University, Fort Collins, CO, p. 24.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A.R. (1979):

Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws.

J. Reprod. Fert. Suppl. 27: 47- 51.

McDONALD, L. E.; PINEDA, M. H. (1989):

Veterinary Endocrinology and Reproduction.

4th edition, Lea & Febiger, Philadelphia, London.

MEYERS, S.A.; OVERSTREET, J.W.; LIU, I.K.M.; DROBNIS, E.J. (1995):

Capacitation in vitro of stallion spermatozoa: comparison of progesterone-induced acrosome reactions in fertile and subfertile males.

J. Androl. 16: 47- 54.

MERKIES, K.; CHENIER, T.; PLANTE, C.; BUHR, M.M. (2000):

Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis.

Theriogenology, 54: 1215-1224.

MORROW, D.A. (1986):

Current therapy in theriogenology

W.B. Saunders Company, Philadelphia, London. p.: 646.

MÜLLER, K.; BERG, C.; VITT, U. (2000):

The acrosome reaction as in-vitro challenge to estimate the fertilizing potential of stallion and bull sperm populations.

14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, 2-6 July 2000, Vol. 1: 94.

NAGY, S.; HÁZAS, G.; BALI PAPP, Á.; IVÁNCSEK, J.; SZÁSZ, F.; SZÁSZ, F. Jr.; KOVÁCS, A.; FOOTE, R.H. (1999):

Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy.

Theriogenology 52: 1153- 1159.

O'CONNOR, M.T.; AMANN, R.P.; SAACKE, R.G. (1981):

Comparisons of computer evaluations of spermatozoa motility with standard laboratory tests and their use for predicting fertility.

J. Anim. Sci., 53: 1368- 1376.

POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L. (1991):

A simple staining method for quantifying the acrosomal status of cat spermatozoa.

Theriogenology, 35: 257.

RABHOFER, R.M. (1999):

Entwicklung von Methoden für die computergestützte morphologische Untersuchung von Bullenspermien mit dem System HTM IVOS.

Vet. Med. Diss., München.

RAUHAUS, H. (1990):

Untersuchungen zur Morphologie und Lebend-Tot-Färbung von Spermien einiger Haustierarten.

Vet. Med. Diss., München.

REERS, M.; SMITH, T.; CHEN, L.B. (1991):

J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential.

Biochemistry, 30: 4480- 4486.

REHAN, N.E.; SOBRERO, A.J.; FERTIG, J.W. (1975):

The semen of fertile men; statistical analysis of 1300 men.

Fertil Steril, 26: 492.

RIEMKE, P. (1983):

Untersuchungen zur Motilitäts- und Geschwindigkeitsmessung von Bullenspermien mit Hilfe der Videomikrographie.

Vet. Med. Diss., München.

RIEMKE, P; LEIDL, W. (1985):

Motilitätsbeurteilung der Spermien mit Videomikrographie und Computerauswertung.

Vortragsveranstaltung Physiologie u. Pathologie d. Fortpflanzung 14.- 15.2.1985, Berlin.

Zuchthygiene, 20: 106-107.

ROVAN, E. (2001):

Biochemie der Spermatozoa: Die Biochemie der Plasmamembran.

In: Veterinärmedizinische Andrologie. Hrsg. Busch, W.; Holzmann, A.

Schattauer, Stuttgart, New York. p:33- 44.

SALISBURY, G. W.; VanDENMARK, N. L. (1961):

Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle.

W.H. Freeman & Co., San Francisco.

SCHERK, F. (1963):

Über die Eignung des Farbstoffes Bromphenolblau zur Supravitalfärbung von Eberspermien.

Vet. Med. Diss., München.

SIDHU, K.S.; DHINDSA, J.S.; GURAYA, S.S. (1992):

A simple staining procedure for detecting the true acrosome reaction in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa.

Biotech. Histochem., 67: 35- 39.

SIEME, H.; CORDES, T.; KLUG, E.; HOPPEN, H.O. (2001):

Relationship between sexual hormones, seminal characteristics and fertility in stallions.

3rd International Symposium on Stallion Reproduction, January 10-12, 2001, Colorado State University, Fort Collins, CO, p. 70.

SIEMERS, R.A. (1994):

Analysis of CASA performance using synthetic images of swimming spermatozoa.

Ph.D. Dissertation. University of California, Davis.

SINOWATZ, F. (2001): Morphologie und Histologie der männlichen Genitalorgane:

Spermatogenese, Aufbau der Spermien.

In: Veterinärmedizinische Andrologie. Hrsg. Busch, W.; Holzmann, A.

Schattauer, Stuttgart, New York. p:8-11.

SLOTTE, H.; ÅKERLÖF, E.; POUSETTE, Å. (1993):

Separation of human spermatozoa with hyaluronic acid induces, and Percoll® inhibits, the acrosome reaction.

Int. J. Androl., 16: 349- 354.

STOLLA, R. (1984):

Ursachen und Bedeutung der Teratozoospermie.

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.

STUMPE, G. (1989):

Bestimmung der Motilität von Bullenspermien mit Hilfe der Computer- Videomikrographie im Vergleich zur subjektiven Schätzung.

Vet. Med. Diss., München.

SUKARDI, S.; CURRY, M.R.; WATSON, P.F. (1997):

Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers.

Anim. Reprod. Sci., 46: 89- 96.

TALBOT, P.; CHACON, R.S. (1981):

A triple-stain for evaluating normal acrosome reactions of human sperm.

J. Exp. Zool., 215: 201-208.

TISCHNER, M. (1979):

Evaluation of deep-frozen semen in stallions.

J. Reprod. Fert. Suppl. 27: 53-59.

TROIANO; L.; GRANATA, A.R.M.; COSSARIZZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. (1998):

Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: A Flow cytometry analysis with implications for male infertility.

Exp. Cell Res., 241: 384- 393.

UHLENBROCK, S. (1999):

Computergestützte Spermienkopfmorphometrie beim Hengst mit dem Hamilton Thorne Morphology Analyzer IVOS.

Vet. Med. Diss., München.

VAN DER HOLST, W. (1984):

Stallion semen production in A.I. programs in the Netherland.

In: Courot, M. (Ed.): The male in farm animal reproduction, 195- 201.

Martinus Nijhoff Publishers, Boston, Dordrecht, Lancaster.

VANTMAN, D.; ZINAMAN, M.; KOUKOULIS, G.; SHERINS, R.J.; DENNISON, L. (1988):

Computer-assisted semen analysis: evaluation of method and assessment of the influence of sperm concentration on linear velocity determination.

Fertil. Steril., 49: 510-515.

VARNER, D.D.; VAUGHAN, S.D.; JOHNSON, L. (1991):

Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility.

Am. J. Vet. Res., 52: 224- 230.

VARNER, D.D.; WARD, C.R.; STOREY, B.T.; KENNEY, R.M. (1987):

Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa.

Am. J. Vet. Res., 48: 1383- 1389.

VÁSQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, E.; ROCA, J.; COY, P.; RUIZ, S. (1992):

Use of triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa.

Theriogenology, 38:843-852.

VETTER, C.M.; MILLER, J.E.; CRAWFORD, L.M.; ARMSTRONG, M.J.; CLAIR, J.H.; CONNER, M.W.; WISE, L.D.; SKOPEK, T.R. (1998):

Comparison of motility and membrane integrity to assess rat sperm viability.

Reproductive Toxicology, 12: 105- 114.

WABERSKI, D.; PETROUNKINA, A.; WEITZE, K.F.; TÖPFER-PETERSEN, E. (1999):

In-vitro-Beurteilung von Sperma zur Vorhersage der Fertilität.

Tierärztl. Praxis, 27:1-7.

WEITZE, K.F. (2001a):

Spermatologische Untersuchung.

In: Veterinärmedizinische Andrologie. Hrsg. Busch, W.; Holzmann, A.

Schattauer, Stuttgart, New York. p: 87- 118.

WEITZE, K.F. (2001b):

Andrologie beim Hengst.

In: Veterinärmedizinische Andrologie. Hrsg. Busch, W.; Holzmann, A.

Schattauer, Stuttgart, New York. p: 337- 402.

WIEDERMANN, J. (1992):

Erfahrungen mit einem computergestützten Bildanalysestystem zur Beurteilung von aufgetautem Rindersperma.

Vet. Med. Diss., Bern.

WHO (World Health Organization) (1992):

WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction.

Third edition, Cambridge University Press, Cambridge- New York.

ZIEGLER, R. (1991):

Computervideomikrographische Beurteilung von Hengstsperma vor und nach der Tiefgefrierkonservierung mit eidotterhaltigem Verdünner.

Vet. Med. Diss., München.

ANHANG

Verwendete Samenverdünner

Frischsamenkonservierung

Kenney- Magermilchverdünner (nach KENNEY et al., 1975):

- Magermilchpulver 2,4 g
- Glucose 4,9 g
- Natriumbikarbonat (8,4%) 2,0 ml
- Gentamicinsulfat (50mg/ml) 2,0 ml
- Aqua bidest. 92,0 ml

Frischsamenkonservierung

Dimitropoulos- Eidotterverdünner (nach VAN DER HOLST, 1984):

Lösung I:

- Glucose 12 g
- Fruktose 12 g
- Aqua bidest. 600 ml

Lösung II:

- Natriumcitrat 20 g
- Glycin 9,4 g
- Sulfanilamid 3,5 g
- Aqua bidest. 1000 ml

300 ml Lösung I + 500 ml Lösung II + 200 ml Eidotter vermischen und 20 min bei 600 g zentrifugieren. Der Überstand ist der gebrauchsfertige Verdünner.

Tiefgefrierverdünner nach TISCHNER (1979):

- Aqua dest. 100 ml
- Lactose 11 g
- EDTA 0,1 g
- Natriumcitrat 89 mg
- Natriumbicarbonat 8 mg
- Eidotter 1,6 g
- Glycerol 3,5 ml
- Penicillin 50 i.u.
- Streptomycin 50 mg

Tiefgefrierverdünner nach MARTIN et al. (1979):

Verdünner I (Zentrifugationsverdünner):

- Glucose 6 g
- Dinatrium- EDTA 0,37 g
- Natriumzitat x 2 H₂O 0,375 g
- Natriumbikarbonat 0,12 g
- Streptomycin 0,05 g
- Penicillin 50 I. E.
- Aqua dest. 100 ml

Verdünner II:

- Laktose (11%) 50 ml
- Verdünner I 25 ml
- Eidotter 20 ml
- Orvus-Es-Paste (Equex STM, Nova Chemical Sales) 0,8 ml
- Glyzerin 5 ml

Tiefgefrierverdünner nach KENNEY et al. (1975):

Verdünner I (Zentrifugationsverdünner):

- Glukose 4,9 g
- Magermilchpulver 2,4 g
- Penicillin G 0,06 g
- Streptomycin 0,075 g
- Aqua dest. ad 100 ml

Verdünner II:

- Verdünner I 75 ml
- Glyzerin 5 ml
- Orvus-Es-Paste 0,8 ml
- Eidotter 20 ml

Verwendete Einstellungen für das computergestützte Motilitätsanalyzesystem (CMA Motion Analyser, Strömberg-Mika):

Parameter	Einstellung „Dummerstorf“	Eigene Einstellung
Anzahl Bilder	32	32
Mindestbildzahl	14	15
Vielfache Bildgrundfrequenz	1	1
Min. Fläche (pix)	25	40
Max. Fläche (pix)	400	299
Schwellwert Objektsuche (pix)	5	5
Objekte	hell	hell
Geschwind.-Klassenbreite ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	5	2
Geschwind.-grenze immotil ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	10	12
Geschwind.-grenze lokal motil ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	25	25
Verdünnung	1	1
Eichungsfaktor	322	712,663
Korrektur	ja	ja
Richtung	ja	ja
Zeilensprung	2	2
Distanz (pix)	31	31
Anzahl Relaxationen	7	7
Pause	2	2
Tukeyfenster	4	4
Max. Radius (μm)	10	30
Min. Fläche unbewegliche (pix)	25	10
Max. Fläche unbewegliche (pix)	150	160
Schwanzdetektion	ja	ja
Empfindlichkeit	1,1	1,1
XA, YA, XE, YE	30, 30, 576, 545	30, 30, 737, 545
Schwanzsuche anwenden auf	immotile Objekte	immotile Objekte
Größe Fenster	15	15
Anzahl Dilatationen/Erosion	4	3
Suchschwelle Schwanz	6	10
Minimale Schwanzgröße	5	10
Doppelter Schwellwert	ja	ja
Benutzerklassifikator ausführen	ja	ja

Danksagung

Herrn Professor Dr. R. Stolla möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, die Ermöglichung der Durchführung und Korrektur dieser Arbeit danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. h.c. W. Leidl, der durch seine Unterstützung, Beratung und Betreuung eine große Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit war.

Ich bedanke mich ebenfalls von Herzen bei allen Mitarbeitern der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik für ihre freundliche Unterstützung, insbesondere bei Frau Dr. B. Kolberg, Herrn Dr. R. Mayer, Herrn Dr. J. Ehlers und auch bei Frau Dr. J. Friker aus der Tieranatomie.

Des weiteren gilt mein Dank Herrn J. Gumpesberger von der Besamungsstation Schwaiganger für das Verschicken der Samenproben und Herrn Prof. Dr. K. Osterkorn und Herrn H. Stanglmeier für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ein besonders herzlicher Dank auch an Freunde und Familie, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Ein ganz besonders großes Dankeschön dem Pot-Team, das immer für mich da war, ohne dessen Beistand die Realisierung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Name: Ursula Domes
 Geburtsdatum: 31.01.1973
 Geburtsort: Immenstadt/Allgäu
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Eltern: Waltraud und Helmar Domes, Lehrer

Schulischer und beruflicher Werdegang:

1979- 1980 Deutsche Schule Osorno/ Chile
 1981- 1982 Volksschule Stein/ Allgäu
 1983- 1986 Gymnasium Immenstadt/ Allgäu
 1987- 1991 Deutsche Schule La Paz/ Bolivien
 1991 Abitur Deutsche Schule La Paz/ Bolivien
 1992- 1996 Studium der Tiermedizin an der Universidad Austral de Chile in Valdivia/ Chile
 1997- Mai 1999 Tierärztliche Diplomarbeit „Projekt eines Privatzoos in Südchile“
 Juni 1999 Tierärztliches Abschlussexamen
 August 1999 Beginn der Doktorarbeit an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der LMU München und teilzeitige Beschäftigung als wissenschaftliche Hilfskraft.