

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Abteilung Fortpflanzungsphysiologie, Besamung und Zytogenetik des Tierärztlichen Institutes der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Dr. Wilhelm Wemheuer und am Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Prof. Edgar Schallenberg durchgeföhrt.

Die Untersuchungen zur Kryokonservierung von Ebersamenzellen fanden im Rahmen der Anlage einer Tiefgefrierspermareserve zur Erhaltung von bedrohten Schweinerassen im Auftrag der Europäischen Union statt.

I. Die Verabreichung des GnRH-Analogons Buserelin an Eber (zweimal wöchentlich; 4,2 µg Buserelinacetat/100 kg KGW i.m.; über min. 4 Monate, max. 9 Monate) wurde im Hinblick auf allgemeine quantitative und qualitative Ejakulatparameter und speziell mit Blick auf die Beeinflußbarkeit der Tiefgefriertauglichkeit von Ebersamenzellen untersucht.

II. Der Einfluß der GnRH-Behandlung auf die Ausschüttung des Luteinisierungshormones, des Testosteron und des Estradiol-17β wurde durch regelmäßige Blutprobennahmen und ihre Untersuchung mit Hilfe des Enzymimmuntestes analysiert.

III. Der individuelle Einfluß von Seminalplasma auf die Tiefgefriertauglichkeit von Ebersamenzellen wurde durch Tausch von Seminalplasma und die Inkubation von Ebersamenzellen in heterologem Seminalplasma, im Vergleich zur Inkubation in homologem Seminalplasma untersucht.

IV. Die Bedeutung des Seminalplasma im Rahmen der Kryokonservierung von Ebersamenzellen und der Wert epidymaler Spermien für die Tiefgefrierung wurde durch die Tiefgefrierung von Nebenhodenschwanzsperma aus Kastrationsorganen einzelner Eber untersucht.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

I. In der Behandlungsphase mit dem GnRH-Analogon Buserelin sank das mittlere Ejakulatvolumen (221,8 ml vs. 194,7 ml; $p < 0,01$) bei unveränderter Spermiengesamtzahl pro Ejakulat und dementsprechend steigender Dichte (0,326 Mio/µl vs. 0,366 Mio/µl; $p < 0,05$).

Die mittlere Spermienmotilität nach dem Auftauen tiefgefrorener Ebersamenzellen (direkt und nach dreistündiger Inkubation bei 32°C) stieg unter der Behandlung an (direkt nach dem Auftauen: 24,0% vs. 21,4%, $p < 0,05$; nach 3-stündiger Inkubation: 19,4% vs. 16,8%, $p < 0,05$).

Weitere Untersuchungen müssen klären, welche Faktoren auf GnRH-Behandlung hin höhere Auftaumotilität erzeugen und ob die Reduzierung des Ejakulatvolumens, die Reduzierung der Sekretion der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, im Zusammenhang damit geschehen werden kann.

Die Ergebnisse einer GnRH-Verabreichung nach dargestelltem Schema rechtfertigen keine generelle Behandlung von Ebern, deren Ejakulate der Tiefgefrierung zugeführt werden sollen.

II. Die Verabreichung des GnRH-Analogons Buserelin nach dem vorgestellten Behandlungsschema hatte nach jeder Injektion (gemessen 2,5 bis 4 h post injectionem) den Anstieg der Blutplasmakonzentration des LH (2,15 ng/ml vs. 1,01 ng/ml, $p = 0,0001$) des Testosteron (10,51 ng/ml vs. 3,55 ng/ml, $p < 0,01$) und des Estradiol-17 β (108,64 pg/ml vs. 76,28 pg/ml, $p < 0,01$) zur Folge. Spätestens 28 Stunden nach der letzten Injektion war bei allen Hormonen die Konzentration vor Behandlung/der Kontrolle erreicht.

III. Die Langzeitanpassung von Ebersamenzellen in heterologem Seminalplasma unterschied sich in bezug auf die Motilität aufgetauter Spermien und ihre Morphologie nicht von der Anpassung in homologem Seminalplasma.

Die Methode des Seminalplasmatausches mit einer zusätzlichen Zentrifugation direkt nach Gewinnung des Ejakulates führt generell zu erniedrigter Motilität und vermehrt morphologischen Mängeln nach dem Auftauen.

Forschungsbedarf bleibt in der Frage, inwiefern spermieaschonendere Verfahren andere Ergebnisse erbringen können.

IV. Die Auftaumotilitäten von Nebenhodenschwanzsperma sind mit denen der GnRH-behandelten Versuchsgruppe vergleichbar.

In Einzelfällen sichert Nebenhodenschwanzsperma ein taugliches Tiefgefrierspermadepot.

Frisch gewonnenes und tiefgefrorenes Nebenhodenschwanzsperma weist im Vergleich zu ejakulierten Samenzellen (frisch und nach Tiefgefrierung) größere morphologische Mängel auf.

Weiterer Forschungsbedarf besteht noch bei der Suche nach den Faktoren, die die Tiefgefrierfähigkeit von Ebersamenzellen individuell beeinflussen. Der Einfluß von Seminalplasma oder einzelner Komponenten des Seminalplasmas konnte in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Fest steht, daß die Tiefgefrierfähigkeit von Ebersamenzellen durch parenterale Gaben des GnRH-Analogons Buserelin manipulierbar ist.

6 SUMMARY

Semen collection and preservation of this dissertation were carried out in the department of physiology, pathology and biotechnology of reproduction and AI of the Institute of Veterinary Medicine of the University of Göttingen. The hormone analyses were performed at the Institute of Animal Breeding and Husbandry of the University of Kiel. Cryoconservation of the boar semen was supported by an EC fund which included the installation of a cryopreserved reserve for boar semen of endangered pig breeds.

- I. The administration of the GnRH-Analagon Buserelin in boars (two times a week; 4,2 µg; for at least 4 months, max. 9 months) was investigated regarding quantitative and qualitative ejaculateparameters and with a special regard to the freezability of the spermatozoa.
- II. Blood samples were taken on a regular basis in monthly intervals and enzyme-immunoassays (EIA) were employed to study the effect of the GnRH-administration on the release of LH, Testosterone and Estradiol-17β.
- III. The individual influence of seminal plasma on the deepfreezing quality of boar semen was studied including the effect of incubation in seminal plasma of heterologous or homologous origin.
- IV. The significance of a seminal plasma effect on freezability of the semen was investigated using epididymal sperm from castrated organs.

Results:

- I. Within the administration time of the GnRH-analagon Buserelin the volume of the ejaculates decreased significantly in comparison to the control group (221,8 ml vs. 194,7 ml; $p < 0,01$). The total sperm count per ejaculate remained unchanged and the density of the ejaculates was increased (0,326 Mio/µl vs. 0,366 Mio/µl; $p < 0,05$). The sperm motility after thawing of the cryopreserved sperm (immediately after thawing and after 3 hours of incubation at 32 °C) increased during the administration of Buserelin (immediately after

thawing 24,0 % vs. 21,4 %; $p < 0,05$; as also after 3 hours of incubation 19,4 % vs. 16,8 %; $p < 0,05$).

Further studies should be addressed to identify the factors responsible for the increase of the motility in thawed boar sperm during and after a GnRH-administration. More research is necessary to clarify, whether the reduced volume of the ejaculates in treated boars and also a reduced secretion of accessory glands is directly linked to the increased sperm motility after thawing. The results of this GnRH-administration do not justify a general treatment of boars, whose ejaculates are needed for cryopreservation.

II. During treatment with the GnRH-analogue Buserelin, every injection caused an increase of the following blood plasma concentrations, measured 2,5 to 4 hours after injection, of LH (2,15 ng/ml vs. 1,01 ng/ml; $p = 0,0001$), of Testosterone (10,51 ng/ml vs. 3,55 ng/ml; $p < 0,01$) and of Estradiol-17 β (108,64 pg/ml vs. 76,28 pg/ml; $p < 0,01$). At least after 28 hours of the latest injection each of the hormone levels decreased to the respective values found in the control group.

III. With regard to motility and morphology of the thawed cryopreserved sperm the long term adaption of the semen in heterologous seminal plasma exhibited no differences to an homologous seminal plasma incubation.

The method of a seminal plasma exchange with an additional centrifugation step immediately after ejaculate collecting leads generally to a reduced sperm motility and to an increase of morphological defects after thawing. More research is necessary to find out, whether milder procedures will provide other results.

IV. The motility of thawed cryopreserved boar semen of the *cauda epididymidis* was as high as the sperm motility after freezing-thawing of ejaculated sperms in the treated group.

In some cases the semen of the *cauda epididymidis* may serve as a suitable depot of cryopreserved sperm.

Fresh and thawed cryopreserved semen from the epididymis showed more morphological defects than ejaculated spermatozoa.

On the basis of this research, a final conclusion cannot be drawn referring to the factors that influence the individual sperm quality after cryopreservation. However, this work shows clearly a method how to control the deepfreezability of boar spermatozoa. This concerns particularly the motility after thawing, which can be manipulated by parenteral administration of the GnRH-analagon Buserelin.