Tierärztliche Hochschule Hannover

Untersuchungen zur Optimierung der Kryokonservierung von Hundesperma mittels Zentrifugation und Verwendung eines Eidotter- freien Verdünners

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Anke Baumeister

aus Castrop-Rauxel

Hannover 2018

Wissenschaftliche Betreuung:	1. Prof. Dr. A.- R. Günzel- Apel Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken; Abteilung Kleintiere
1. Gutachterin(nen)/Gutachter:	Prof. Dr. A.- R. Günzel- Apel
2. Gutachterin(nen)/Gutachter:	Prof. Dr. H. Sieme

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2018

Meiner wunderbaren Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 9
1 Einleitung 11
2 Literaturübersicht 12
2.1 Morphologie und Funktionen der Samenzelle 12
2.1.1 Aufbau und Funktionen der Plasmamembran 14
2.1.2 Aufbau und Funktionen der Mitochondrien 15
2.2 Spermatologische Untersuchungsverfahren 16
2.2.1 Basisspermatologie 16
2.2.1.1 Mikroskopische Motilitätsanalyse 17
2.2.2 Computergestützte Analyseverfahren 17
2.2.2.1 Computer assisted sperm analysis (CASA) 17
2.2.2.2 Durchflusszytometrie 18
2.3 Samentiefgefrierung 20
2.3.1 Verdünner zur Samentiefgefrierung 21
2.3.2 Zentrifugation 22
2.3.3 Tiefgefrier- und Auftauverfahren 23
3 Eigene Untersuchungen 26
3.1 Material und Methoden 26
3.1.1 Tiere 26
3.2 Untersuchungen der Tiere 27
3.2.1 Allgemeine Untersuchung 27
3.2.2 Spezielle andrologische Untersuchung 27
Morphologische Untersuchung der Hoden und Nebenhoden 27
Samengewinnung 28
3.3 Untersuchungen der Ejakulate (Basisspermiogramm) 28
3.4 Computergestützte Spermienanalysen 30
3.4.1 Motilitätsanalyse 30
3.4.2 Durchflusszytometrische Analysen 32

3.5 Ejakulataufbereitung zur Tiefgefrierung 34
3.5.1 Zentrifugation 34
3.5.2 Verdünnung 34
3.5.3 Einfrier- und Auftauprozesse 34
3.6 Studienabschnitt I 35
Vorversuch 1 35
Vorversuch 2 38
Vorversuch 3 40
3.7 Studienabschnitt II – Prüfung individueller Einflüsse der Samenspender auf die Qualität des aufgetauten Spermas 41
3.8 Statistische Auswertung 43
4 Ergebnisse 44
4.1 Studienabschnitt I 44
4.1.1 Vorversuch 1: Einfluss unterschiedlicher Zentrifugationsverfahren 44
4.1.1.1 Spermienmotilität 44
4.1.1.2 Spermienzahl im Überstand 46
4.1.1.3 Akrosomintegrität 47
4.1.1.4 Spermienmembranstatus 47
4.1.1.5 Mitochondrienmembranpotential 49
4.1.1.6 Einfluss des Verdünnermediums 50
Spermienmotilität 50
4.1.3 Vorversuch 2 – Einfluss der Zentrifugation (Vergleich zentrifugierter und nicht zentrifugierter Proben) 53
4.1.3.1 Spermienmotilität 53
4.1.3.2 Akrosomintegrität 54
4.1.3.3 Spermienmembranstatus und Mitochondrienmembranpotential 54
4.1.3.4 Einfluss des Verdünnermediums 55
4.1.4 Vorversuch 3 - Einfluss der Spermienzahl in der Paillette 56
4.1.4.1 Spermienmotilität 56
4.1.4.2 Akrosomintegrität 57
4.2 Studienabschnitt II 58
4.2.1 Ejakulatbeschaffenheit gemäß Basisspermiogramm 58

4.2.2 Ejakulatbeschaffenheit gemäß computergestützten Analysen 60
4.2.3 Beschaffenheit des aufgetauten Spermas 61
4.2.3.1 Einfluss des Verdünners 61
4.2.3.2 Einfluss des Alters 66
4.2.3.3 Einfluss der Ejakulatbeschaffenheit (Normospermie/Teratozoospermie) .. 69
4.3 Korrelationen 71
4.3.1 Ejakulatbeschaffenheit (Nativsperma) 71
4.3.2 Aufgetautes Sperma 71
4.3.2.1 Spermienmotilität 71
4.3.2.2 Akrosom- und Plasmamembran 72
4.3.2.2 Mitochondrienmembranpotential 72
5 Diskussion 73
5.2 Zentrifugation (Studienabschnitt I) 75
5.4 Spermienkonzentration/Anzahl Spermien pro Paillette 80
5.5 Studienabschnitt II 82
5.5.1. Verdünnervergleich 82
5.6 Messung mittels computergestützter Analyse Verfahren 87
6 Zusammenfassung 90
7 Summary 93
8 Literaturverzeichnis 95
9 Anhang 112
9.1 Verbrauchsmaterialien 112
9.2 Einstellungen CASA 112
9.3 Rezepte 114
9.4 Ergebnistabellen 115
9.4.1 Studienabschnitt I - Vorversuch 1 zur Zentrifugation 115
9.4.2. Studienabschnitt I - Vorversuch 2: Vergleich zentrifugiert - nicht zentrifugiert 121
9.4.3 Studienabschnitt I - Vorversuch 3: Vergleich der Spermienkonzentration nach Resuspension 123
9.4.4 Studienabschnitt II: Verdünnervergleich an 27 Rüdenejakulaten 125
Danksagung: 133

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
dest.	destillata
DNA	Desoxyribonucleinic acid
EOS	Eosin gefärbte Spermien
et al.	et alii
Fa.	Firma
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
HBS	HEPES- gepufferte Lösung
LDL	Low Density Lipoprotein
LIN	Linearität
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MAS	Morphologisch abweichende Spermien
max.	Maximum
min.	Minimum
Min.	Minute
mind.	mindestens
Mio.	Million
ml	Milliliter

MMP	Mitochondrienmembranpotential
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit für die Nullhypothese
pH	Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumjodid
PNA	Peanut Agglutinin
PSA	Pisum sativum agglutinin
®	eingetragenes Warenzeichen
s.	siehe
SD	Standardabweichung
Sek.	Sekunden
SGZ	Spermiengesamtzahl
Std.	Stunden
TG	Tiefgefrier-
VAP	Velocity average path
VCL	Velocity curve line
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die Kryokonservierung von Hundespermien ist heutzutage eine gängige Methode, um genetisches Material zu sichern und die Hundezucht zu internationalisieren. Ein erheblicher Nachteil sind die, im Vergleich zu Nativsamen oder gekühltem Sperma, geringen Konzeptionsraten (ENGLAND 1993, WATSON 2000). Durch Schäden an den Spermien, die durch den Tiefgefrier- und Auftauprozess entstehen, sind Kapazitation und Penetration der Zona Pellucida gestört (WATSON 1995, WEITZE 2001). Die Anwendung geeigneter Verdünnermedien und schonender Konservierungsvorgänge können Schädigungen an den Spermien verringern. Lange Zeit wurden mit eidotterhaltigen Verdünnern sehr gute Auftauergebnisse für Hundesamen erzielt. Mit der Extraktion von Low Density Lipoproteinen (LDL) aus dem Eidotter gelang es MOUSSA et al. (2002), einen partikelfreien Verdünnerzusatz zu konzipieren, der ebenfalls gute Auftauergebnisse erbrachte. Ziel der vorliegenden Studie war es, für die Tiefgefrierkonservierung von Hundesperma einen kommerziell erhältlichen LDL Verdünner zu nutzen und mit einem traditionell verwendeten, Eidotter enthaltenden Verdünner zu vergleichen. Zudem sollte der Einfluss der Zentrifugation des unverdünnten Hundespermas auf die Qualität des aufgetauten Spermas untersucht werden. Zur Beurteilung der Samenqualität standen neben den klassischen mikroskopischen Untersuchungen auch computergestützte Analyseverfahren wie CASA und Durchflusszytometrie zur Verfügung.

2 Literaturübersicht

2.1 Morphologie und Funktionen der Samenzelle

Das Säugetierspermium lässt sich in Kopf und Schwanz unterteilen, wobei der Spermienschwanz aus Hals, Mittel-, Haupt- und Endstück besteht (MONESI 1976). Hundespermien weisen eine Gesamtlänge von 55,3 -62,7 µm auf. Der Spermienkopf hat eine Länge von 5,6- 5,9 µm und eine Breite von ca. 3,9 µm und ist, wie bei anderen Spezies auch, in seiner Form abgeflacht (CUMMINS u. WOODALL 1985). Der morphologische Aufbau gleicht im Wesentlichen dem anderer Säugetierspermien (Abb. 1). Der Spermienkopf besteht aus dem haploiden Kern, der die DNA trägt, und ist bis zu etwa zwei Drittel von einer Kopfkappe (Akrosom) bedeckt. Das Akrosom hat eine äußere und eine innere, dem Kern unmittelbar anliegende, Membran und enthält Enzyme wie Akrosin und Hyaluronidase, welche bei Kontakt mit der Eizellenhülle aktiviert werden, um die Penetration der Zona radiata und der Zona Pellucida zu ermöglichen (MONESI 1976; YANAGIMACHI 1994, KARRE et al. 2012). Desweiteren werden diese akrosomalen Reaktionen und Penetrationsvorgänge durch Cholesterol, Calcium und Progesteron, welche auch als Zusatzstoffe zu Verdünnern diskutiert werden, beeinflusst (WITTE u. SCHÄFER-SOMI 2007). Geht durch den Tiefgefrierprozess die Proteinase Akrosin durch akrosomale Alterationen verloren, sind die Spermien nicht mehr zur Befruchtung fähig.

Der kurze Spermienhals verbindet den Spermienkopf mit dem Mittelstück, welches von einer Mitochondrienscheide umgeben ist (LIEBICH 1993). Als Energielieferanten stellen die Mitochondrien Adenosintriphosphat (ATP) aus der Atmungskette zur Verfügung, welches für die Bewegung des Spermiums unerlässlich ist. Durch Spaltung des ATP können die äußeren Mikrotubuli an den inneren Mikrotubuli entlang gleiten, wodurch der Geißelschlag für die Fortbewegung entsteht (LEHNINGER et al. 1994).

Der Spermienschwanz dient der Fortbewegung der Samenzelle. Das Mittelstück weist bei Hundespermien eine Länge von etwa 10,1 µm und das Haupt- und

Endstück eine Länge von etwa 45,2 µm auf (WOODALL u. JOHNSTONE 1988). Der Spermienschwanz besteht hauptsächlich aus dem zentral liegenden Achsenfaden, in dem neun periphere Doppelmikrotubuli um zwei zentrale Mikrotubuli angeordnet sind. Die peripheren Doppelmikrotubuli werden von Außenfibrillen umsäumt. Diese nehmen in ihrer Stärke zum Endstück hin ab. So liegt dem zentralen Achsenfaden im Bereich des Endstücks nur noch die Plasmamembran auf.

Durchschnittlich bewegen sich die Samenzellen von Säugetieren mit einer Geschwindigkeit von 4 bis 5 mm/Min. (≅67- 84 µm/Sek.). In ihrer physiologischen Umgebung bewegen sie in den Uteruskrypten auf dem Weg zum Eileiter gegen einen Flüssigkeitsstrom an (positive Rheotaxis) (SCHNORR 1989). Hyperaktivität ist ein Merkmal kapazitierter Spermien *in vitro* und *in vivo* (MAHI u. YANAGIMACHI 1976, BURKMANN 1991, SZÁSZ et al. 1997, KARRE et al. 2012). Sie ist gekennzeichnet durch eine Fortbewegung im geringen Radius und peitschenartigen Schlägen der Spermiengeißel (SUAREZ et al. 1991). Kapazitation und Hyperaktivität der Spermien sind essentielle Voraussetzungen für die Befruchtungsfähigkeit (BEDFORD 1983, ROTA et al. 1999). SUAREZ et al. (1991) konnten bei Hamsterspermien, die für 4 Stunden in einem Kapazitationsmedium inkubiert wurden, eine schnellere und gradlinigere Schwimmbewegung in viskösem Medium (30% Ficoll) nachweisen als für Spermien, die nicht (0 Std.) oder nur 3 Stunden inkubiert wurden. So konnte ein mechanischer Vorteil für hyperaktive Spermien bewiesen werden. Auch VERSTEGEN et al. (2002) postulierten für fertilen Samen von Hunden einen höheren Anteil an hyperaktivierten Spermien.

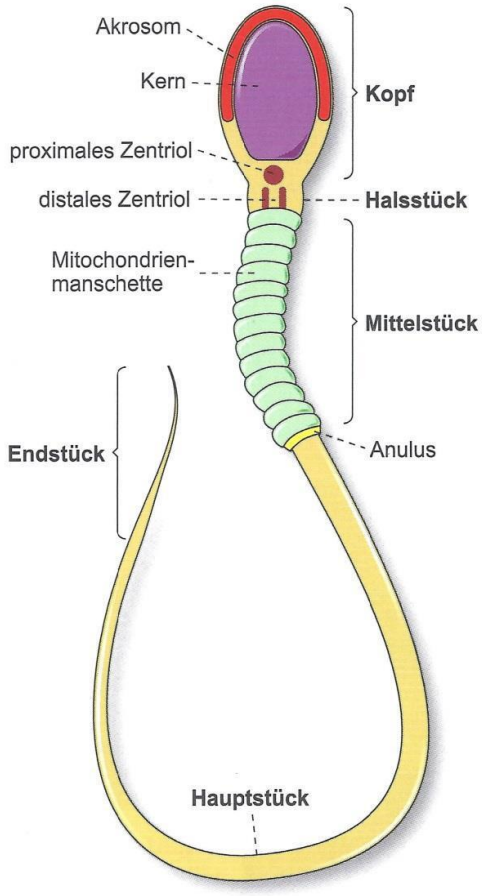


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Spermiums. Aus WELSCH (2010).

2.1.1 Aufbau und Funktionen der Plasmamembran

Die Plasmamembran besteht als typische Biomembran aus einer Lipiddoppelschicht mit eingelagerten Proteinen (SINGER u. NICHOLSON 1972) auch sogenannten SNARE Proteinen (GADELLA u. EVANS 2011). Es handelt sich bei den Lipiden im Wesentlichen um Phospholipide, Sphingolipide und Cholesterol (QUINN 1985). GADELLA et al. (1999) konnte die dynamische Struktur der Plasmamembran von Säugetierspermien anhand der besonderen Lipidzusammensetzung nachweisen.

Die Plasmamembran übernimmt nicht nur allgemeine protektive und versorgende Aufgaben, sondern auch eine Reihe spezifischer Funktionen, welche nach der Region am Spermium variieren. Am Spermienkopf werden die akrosomale Region

am vorderen Kopfbereich und die postakrosomale Region zwischen dem hinteren akrosomalen Rand und dem Spermienhals unterschieden. Die akrosomale Region kann in drei Abschnitte eingeteilt werden: Das Apikalsegment, das Hauptsegment und das Äquatorialsegment (BAUMGARTL 1980). Am Schwanz des Spermiums besteht die Plasmamembran entsprechend den einzelnen Abschnitten aus der Halsregion, dem der Mitochondrienscheide angelagerten Mittelstück, dem Hauptstück und dem Endstück (SCHÜLKE 1991). Je nach Lokalisation ist die Plasmamembran auch funktionell zu differenzieren. So sind zum Beispiel das Apikalsegment und das Hauptsegment der akrosomalen Region an der Akrosomreaktion beteiligt, während das Äquatorialsegment und die postakrosomale Region für die Fusion des Spermiums mit der Eizelle von Bedeutung sind (YANAGIMACHI 1994, GADELLA u. EVANS 2011).

Die verschiedenen Membranabschnitte sind von einer unterschiedlichen Sensibilität gegenüber äußeren Einflüssen gekennzeichnet. Äußere Faktoren können Eigenschaften wie Fluidität, Permeabilität, Adhäsivität oder Schmelzbarkeit der Membranen beeinflussen. Am Apikalsegment und Hauptsegment ist die Plasmamembran am empfindlichsten, am Äquatorialsegment dagegen am stabilsten. So nimmt zum Beispiel mit wachsendem Anteil an ungesättigten Fettsäuren und mit steigenden Temperaturen die Fluidität der Membran zu (KOOLMAN u. RÖHM 1994). Im Verlauf der Tiefgefrierung erfährt insbesondere der Flüssigkeitsgrad der Plasmamembran erhebliche Veränderungen (CANVIN u. BUHR 1989, BUHR u. PETTITT 1996). Im Bereich der Spermienkopfmembran kommt es zu Umbauprozessen und zu einer Neuverteilung der Proteine (DE LEEUW et al. 1990). Zerstörung von Phospholipiden und Fettsäuren und teilweise auch der Plasmamembranintegrität führt zu Einbußen der Fruchtbarkeit von Tiefgefriersperma (ALMLID u. JOHNSON 1988, PARKS u. GRAHAM 1992).

2.1.2 Aufbau und Funktionen der Mitochondrien

Die an dem Hauptstück des Spermienschwanzes angelagerte Mitochondrienscheide dient der Energiebereitstellung für die Fortbewegung des Spermiums (LEHNINGER

et al. 1994). Mit der Synthese von ATP aus der Atmungskette entsteht an der inneren Mitochondrienmembran ein Protonengradient (REID et al. 1966, CHEN 1998). Dieser Ladungsgradient ruft das sogenannte Mitochondrienmembranpotential (MMP) hervor. Eine Veränderung des MMP muss sich somit auf die Bewegungsaktivität der Spermien auswirken (EVENSON et al. 1982). Für kryokonserviertes Bullensperma wiesen ERICSSON et al. (1993) eine positive Korrelation zwischen mikroskopisch ermittelter Spermienmotilität und MMP nach. In Ejakulaten von Männern mit Asthenozoospermie wurde ein niedrigeres MMP festgestellt als bei Männern mit normaler Motilität (TROIANO et al. 1998). Bei frisch verdünntem Hengstsamen lag eine Korrelation zwischen Gesamtmotilität, Viabilität und Mitochondrienfärbung vor (GARNER et al. 1997, LOVE et al. 2003). VOLPE et al. (2009) untersuchten in nativem Hundesperma das MMP fluoreszenzmikroskopisch und fanden eine positive Korrelation mit der Plasmamembranintegrität und dem mikroskopisch geschätzten Prozentsatz progressiv motiler Spermien. Bei über mehrere Tage gekühlt gelagertem Hundesamen wurde eine signifikante Abnahme der Spermienmotilität und des MMP mit fortschreitender Lagerungsdauer beobachtet (KASIMANICKAM et al. 2012).

2.2 Spermatologische Untersuchungsverfahren

2.2.1 Basisspermatologie

Unmittelbar nach der Samengewinnung wird das Volumen, die Farbe und Konsistenz der einzelnen Ejakulatfraktionen zunächst makroskopisch beurteilt. In den spermienenthaltenden Ejakulatanteilen wird die Konzentration der Spermien ($x10^6$/ml) bestimmt und durch Mulitplikation mit dem Volumen die Spermiengesamtzahl (SGZ) errechnet. Der pH- Wert wird mittels Teststreifen bestimmt und die Motilität und Morphologie der Spermien beurteilt (GÜNZEL- APEL 2007)

2.2.1.1 Mikroskopische Motilitätsanalyse

In der Routine erfolgt die Beurteilung der Spermienmotilität, differenziert nach den Anteilen vorwärts-, orts- und unbeweglicher Spermien üblicherweise durch mikroskopische Schätzung. Die Ergebnisse sind folglich vom jeweiligen Labor und Personal abhängig (IGUER-OUADA u. VERSTEGEN 2001). JØRGENSEN et al. (1997) wiesen an 26 Ejakulaten von Männern nach, dass in vier verschiedenen Laboren uneinheitliche Werte für die Spermienmotilität und –morphologie ermittelt wurden, wohingegen für das Ejakulatvolumen und die Spermienkonzentration eine bessere Übereinstimmungvorlag.

Aus einer Studie an 243 Nativejakulaten vorberichtlich fertiler Rüden leiteten GÜNZEL-APEL et al. (1994) als Normrichtwert für den Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien mindestens 50% ab. Nach LARSEN (1980) sollte Rüdensperma mindestens 70% vorwärtsbewegliche Spermien aufweisen, während ROTA et al. (1998) für Frischsperma einen Normbereich von 60 bis 95 % ermittelten.

2.2.2 Computergestützte Analyseverfahren

2.2.2.1 Computer assisted sperm analysis (CASA)

Die Variabilität der durch subjektive, mikroskopische Motilitätsbewertung erzielten Ergebnisse impliziert die Notwendigkeit einer objektiven und standardisierten Methode zur Messung der Spermienmotilität (RIJSSELAERE et al. 2005). Bereits 1977 wurde das erste CASA (*C*omputer *a*ssisted *s*perm *a*nalysis) System vorgestellt, welches neben einem Mikroskop und einer Kamera auch über eine Software zur Berechnung der prozentualen Anteile an beweglichen Spermien verfügte (LIU u. WARME 1977). Die automatisierten Systeme digitalisieren und analysieren aufeinander folgende Bilder der sich bewegenden Samenzellen. Neben der Auswertung der gesamten Population wird auch die Kinetik der einzelnen Samenzellen erfasst (GÜNZEL-APEL et al. 1993, AMANN u. KATZ 2004). So können je nach System bis zu 20 verschiedene Parameter für eine Samenzelle bestimmt werden. Für die Fertilitätsprognose werden speziesübergreifend die

Geschwindigkeit, Linearität und seitliche Kopfauslenkung der Spermien am häufigsten zur Fertilitätsprognose herangezogen (LENZI 1997).

Routinemäßig kommen CASA Systeme insbesondere im Bereich der Nutztierspermatologie auf Besamungsstationen zum Einsatz. Für Bullen- und Hengstsperma konnten eine hohe Reproduzierbarkeit und Präzision der qualitativen und quantitativen Samenanalyse mit Hilfe von CASA Systemen nachgewiesen werden (GESCHWEND 1986, LEIDL et al. 1987, ZIEGLER 1991, LEIDL et al. 1993). HOLT et al. (1997) zeigten für Eberspermien eine positive Korrelation zwischen mittels CASA gemessenen Motilitätsparametern, insbesondere der Spermiengeschwindigkeit und Besamungsergebnissen.

Für frisches Hundesperma fanden SCHÄFER–SOMI und AURICH (2007) bei Anwendung des CASA SpermVision® (Fa. Minitüb, Tiefenbach) ebenfalls eine gute Reproduzierbarkeit der Motilitätsmessungen und eine Korrelation mit der mikroskopisch beurteilten Motilität. Letztere stellte bei Anwendung desselben CASA Systems MIß (2012) auch für aufgetautes TG-Sperma von Rüden fest. Dabei lagen die subjektiv geschätzten Anteile progressiv motiler Spermien im Durchschnitt fast 10 % über den mittels CASA gemessenen Werten.

Eine Schwierigkeit im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der publizierten Ergebnisse computergestützter Motilitätsanalysen ergibt sich aus der Vielzahl verfügbarer und verwendeter Geräte und den unterschiedlichen Messeinstellungen. So müssen Einstellungen und Handhabungen stets validiert und Personal in die Messtechnik eingewiesen werden, um die Fehlerquote möglichst gering zu halten (SMITH u. ENGLAND 2001, BEHR 2010).

2.2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse mehrerer tausend Zellen innerhalb kurzer Zeit (HARRISON u. VICKERS 1990, PEÑA et al. 1998). Die Möglichkeit

Spermienschädigungen mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen zu detektieren und in prozentualen Populationen darzustellen, wird bei anderen Tierarten, wie Schwein und Pferd, schon länger routinemäßig eingesetzt (WILHELM et al. 1996, MAXWELL u. JOHNSON 1997). Auch für Hundesperma wurde die Objektivität und Messgenauigkeit der Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Akrosom- und Plasmamembranintegrität bestätigt (PEÑA et al. 2001).

Das Lektinkonjugat Peanut Agglutinin (PNA) bindet, ebenso wie das Pisum sativum Agglutinin (PSA), an der Innenseite der äußeren akrosomalen Membran. Durch Kopplung an Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) entsteht bei Spermien mit geschädigtem Akrosom eine grüne Fluoreszenz (MORTIMER et al. 1987). Bei Spermien mit intakter Akrosommembran kann FITC-PNA nicht eindringen, so dass eine Anfärbung ausbleibt.

Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjiodid (PI) kann aufgrund seiner Molekülgröße eine intakte Plasmamembran nicht passieren. Erst wenn Schädigungen an der Membran auftreten, wird sie für das PI durchlässig, so dass es sich an die DNA der geschädigten Samenzelle anlagern kann (BERTHELSEN 1981, ORTMANN u. RODRIGUEZ-MARTINEZ 1994). Spermienköpfe mit angelagertem PI zeigen eine rote Fluoreszenz (ROTA et al. 1995).

So stellt die Durchflusszytometrie ein geeignetes, objektives Verfahren zur Evaluation des akrosomalen Status und der Plasmamembranintegrität von Hundespermien dar (PEÑA u. LINDE- FORSBERG 2000a, PEÑA et al. 2001).

Der Fluoreszenzfarbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolyl Carbocyanine Jodide (JC-1) ist mitochondriengängig und differenziert zwischen einem hohen und einem niedrigen Membranpotential (REERS et al. 1991). Bei hohem MMP formt der Farbstoff sich nach Akkumulation zu Multimeren in Form von J-Aggregaten um und emittiert einen Orangeton mit einer Wellenlänge von 590 nm. Bei niedrigem Potential bleibt die Monomer-Form erhalten, so dass eine grüne Fluoreszenz messbar wird (COSSARIZZA et al. 1993)

Zu Beginn einer Messung im Durchflusszytometer wird das Probenmaterial mit starker Beschleunigung angesogen, so dass sich Zellaggregate auflösen und jede Zelle einzeln den Laserstrahl passiert. Das vom Laser auf die Zelle treffende Streulicht wird vom Gerät als Ereignis gewertet und im Vorwärtsscatter (FSC) oder Seitwärtsscatter (SSC) angezeigt. Mittels Fluoreszenzfarbstoff gefärbte Zellen emittieren, je nach Farbstoff, zusätzlich Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich. Mithilfe von im Durchflusszytometer vorhandenen optischen Filtern wird das emittierte Licht dem jeweiligen Farbbereich zugeordnet. Für jede einzelne Zelle wird ein Ereignis im passenden Farbbereich registriert. Über eine Software werden die Daten in verschiedenen Diagrammformen präsentiert (MARTINEZ- PASTOR et al. 2010).

2.3 Samentiefgefrierung

Die Tiefgefrierung von Hundeejakulaten war im Vergleich zu anderen Tierarten über viele Jahre von nachgeordneter Bedeutung und entwickelte sich eher zögerlich (ENGLAND 1993, GÜNZEL-APEL 2007). Die ersten Welpen nach Besamung mit kryokonserviertem Sperma wurden 1969 in den USA geboren (SEAGER 1969). Aufgrund der immer internationaler werdenden Hundezucht nahm das Interesse an diesem biotechnischen Verfahren in den letzten 15 Jahren kontinuierlich zu. Das betrifft sowohl die Forschung als auch den praktischen Einsatz in der reproduktionsmedizinischen Praxis. Durch die Kryokonservierung von Sperma kann genetisches Material über unbegrenzte Zeit gesichert und ein breiter Genpool aufgebaut werden. Durch die Lagerung von Tiefgefriersamen (TG-Samen) bei -196 °C in flüssigem Stickstoff ist eine zeitlich und örtlich unabhängige und damit bedarfsgerechte Verwendung des Samens möglich (ENGLAND u. PONZIO 1996, GÜNZEL- APEL 2007). Dabei muss als eine Einschränkung die im Vergleich zu Frischsperma verringerte Befruchtungsfähigkeit von aufgetautem TG-Sperma beachtet werden (OETTLE 1986, OLAR et al. 1989, ENGLAND u. MILLAR 2008).

Die sinkende Umgebungstemperatur bewirkt in den Spermien eine Reduzierung der metabolischen Aktivität und damit einhergehend des ATP-Verbrauchs bis keinerlei

Stoffwechsel mehr stattfindet (HAMMERSTEDT et al. 1990, HOFFMANN 2003). Im Rahmen der Einfrier- und Auftauprozesse werden verschiedene anatomische Strukturen der Samenzelle umgebaut. Durch Umstrukturierung der Lipide in der Plasmamembran verliert diese an Fluidität bei gleichzeitiger Zunahme der Permeabilität (HAMMERSTEDT et al. 1990, WEITZE 2001, ALHAIDER u. WATSON 2006). An der Kopfkappe kommt es zu Bläschenbildung in der akrosomalen Membran und zum Verlust von akrosomaler Bestandteile (RODRIGUEZ- MARTINEZ et al. 1993). Die Lebensdauer eingefrorener und aufgetauter Spermien ist verkürzt, ihre Motilität verringert (ENGLAND 1993, ENGLAND u. PONZIO 1996, ROTA et al. 2007). Diese fruchtbarkeitsmindernden Effekte können durch Zusatz geeigneter Verdünner und Kryoprotektiva, geeignete Einfrier- und Auftauzeiten und –techniken zumindest teilweise reduziert werden.

2.3.1 Verdünner zur Samentiefgefrierung

Der Zusatz eines Verdünners zum Nativsperma dient primär der Stabilisierung der Plasmamembran und der Substitution von Nähr-, Schutz- und Puffersubstanzen für die Konservierung (WEITZE 2001, EILTS 2005). Für Hundesperma findet seit den 1970er Jahren ein TRIS-Citrat-Puffer in Verbindung mit filtriertem Eidotter, Fruktose und Glycerol Anwendung (ANDERSEN 1975, GÜNZEL 1986, FONTBONNE u. BADINAND 1993). Für die Kryokonservierung macht der Eidotteranteil im Verdünner 20 % aus (ANDERSEN 1972, FERGUSON et al. 1989, FARSTAD u. ANDERSEN BERG 1989). Eidotter ist ein vielfach verwendetes Kryoprotektivum und besitzt durch seine Lipidanteile eine membranstabilisierende Wirkung (KAMPSCHMIDT et al. 1953, GAMZU et al. 1994). Seine positive Wirkung konnte anhand einer erhöhten Motilität und einer verbesserten Kapazitationsfähigkeit der Spermien nach dem Auftauen gezeigt werden (GAMZU et al. 1994). Allerdings sind besonders auf die Motilität auch negative Effekte des Eidotters bekannt, welche auf verschiedenen Inhaltstoffen sowie granulösen Partikeln beruhen (PACE u. GRAHAM 1974). Als Produkt tierischer Herkunft hängt Eidotter in seiner Zusammensetzung von der Fütterung und Haltung der Legehennen sowie der Lagerung der Eier ab und ist damit

je nach Herkunftsbetrieb unterschiedlich. Durch die im Eidotter enthaltenen Partikel ist der Verdünner relativ inhomogen, so dass eine gleichmäßige Vermischung mit dem Sperma nicht sicher gewährleistet ist. MOUSSA et al. (2002) entwickelten eine Extraktionstechnik zur Bereitstellung von Lipoproteinen aus Eidotter. Diese sogenannten Low Density Lipoproteins (LDL) sind maßgeblich am kryoprotektiven Effekt des Eidotters beteiligt. Sie stabilisieren die Plasmamembran indem sie für den Einbau von Phospholipiden und Cholesterol sorgen (BERGERON et al. 2004). Bei der TG-Konservierung von Bullen- und Hengstsperma wurden mit LDL versetzte Verdünner bereits erfolgreich angewendet (AMIRAT et al. 2004, JIANG et al. 2007, MORENO et al. 2013). Für tiefgefrorenes und aufgetautes Hundesperma zeigten VARELA JUNIOR et al. (2009) eine signifikant höhere Motilitätsrate bei Zusatz von LDL zum Verdünner im Vergleich zu Eidotter. Dies galt für alle verwendeten LDL-Konzentrationen (6%,8%,10%), wobei ein Zusatz von 8 % LDL zu den besten Ergebnissen bezüglich Motilität und Plasmamembranintegrität führte. Ähnliche Beobachtungen machten BENCHARIF et al. (2010) beim Vergleich der Auftauergebnisse von caninem TG-Samen nach Verwendung eines Tris-Eidotter Verdünners und eines mit LDL (6%) versetzten Mediums. Hier zeigte sich in der Plasmamembranintegrität kein Unterschied, während die Motilität bei mit LDL verdünnten Proben signifikant höher lag. Außerdem kam es aufgrund einer geringeren Anzahl an Partikeln im LDL-Verdünner zu weniger Fehlmessungen bei der computergestützten Spermaanalyse.

2.3.2 Zentrifugation

Während im Rahmen der TG-Konservierung von Bullen- und Hengstsperma die Zentrifugation des Spermas vor der Tiefgefrierung schon lange etabliert ist, existieren für den Hund kaum einheitliche Protokolle (JASKO et al. 1991, MAXWELL et al. 1996, WEISS et al. 2004). Die Zentrifugation der spermienreichen Ejakulatfraktion dient der Eliminierung von Seminalplasma, das beim Hund primär aus Prostatasekret besteht. An aufgetautem Hengstsamen wiesen WEISS et al. (2004) geringere Spermienverluste und Plasmamembranschäden nach Zentrifugation des

Nativspermas für 10 Min. bei 600 x g im Vergleich zu Zentrifugationsformen mit höheren g-Zahlen nach. In einer anderen Studie wurde nach Dichte- Zentrifugation von equinem Nativsperma, das nach Resuspension und Verdünnung bis zum Einfrieren am Folgetag gelagert wurde eine bessere Plasmamembranintegrität erzielt, als Samen der erst gelagert wurde und direkt vor dem Einfrieren zentrifugiert wurde (HEUTELBECK et al. 2014). RIJSSELAERE et al. (2002) untersuchten den Einfluss verschiedener Zentrifugationsprotokolle auf frisch verdünnte Hundespermien (180, 720, 1620 und 2880 x g) für jeweils 5 Min. nach dreitägiger Lagerung war der geringste Anteil an Spermien mit geschädigtem Akrosom in den mit 720 x g zentrifugierten Proben zu finden, während die Bewegungsaktivität und die Spermienmorphologie keine Unterschiede aufwiesen. Nur die Plasmamembranen wiesen mit zunehmender Beschleunigungszahl vermehrte Schäden auf. Im Vergleich zu nicht zentrifugiertem Hundesperma zeigte die Zentrifugation von Nativsperma (720 x g für 5 Min.) vor der Verdünnung und Tiefgefrierung positive Effekte auf die Auftauergebnisse (SCHÄFER-SOMI et al. 2006). Sowohl der Anteil vorwärtsbeweglicher als auch der Anteil plasmamembranintakter Spermien wiesen signifikant höhere Werte auf. Allerdings messen die Autoren den angewendeten Verdünnern und Einfrierprotokollen den maßgeblichen Einfluss auf die Auftauqualität bei.

Dagegen beschrieben KODERLE et al. (2009) negative Effekte der Spermazentrifugation auf Motilität, Spermienmorphologie und -chromatinstruktur der aufgetauten Hundespermien in Form einer signifikant stärkeren Reduktion der insgesamt motilen und der vorwärtsmotilen Spermien.

2.3.3 Tiefgefrier- und Auftauverfahren

Zur Konfektionierung von Tiefgefriersamen haben sich Kunststoffpailletten mit einem Volumen von 0,5 ml für Hundesperma durchgesetzt (MORTON u. BRUCE 1989, FONTBONNE u. BADINAND 1993). Die Pailletten werden bei Raumtemperatur mit dem verdünnten Sperma befüllt und luftdicht verschlossen. Die Spermienzahl pro Paillette kann durch vorausgehende Dichtebestimmung berechnet werden, wonach

dann der Verdünner für gewünschte Endkonzentration in einer Paillette zugegeben wird. Im Rahmen eines anteiligen Verdünnerzusatzes werden 2 bis 4 Teile Verdünner zu einem Teil des Samen gegeben. Bei einer Spermienkonzentrationen von 100 Mio. /ml (THOMAS et al. 1993, STRÖM et al. 1997) und 200 Mio. /ml (PEÑA u. LINDE- FORSBERG 2000b) wurden bezüglich der Spermienmotilität vergleichbare Ergebnisse erzielt. Dabei wurden geringfügig unterschiedliche Zentrifugationsprotokolle verwendete (300 x g für 5 Min. - THOMAS et al. 1993, 700 x g für 5 Min. - PEÑA und LINDE-FORSBERG 2000b).

Die Äquilibrierung des in den Pailletten befindlichen Spermas bei +5 °C dient der langsamen Abkühlung und der Anpassung der Spermien an das Verdünnermedium. Als Zeitraum der Äquilibrierung werden mehrheitlich von 75 bis 180 Min. eingehalten (ANDERSEN 1975, FARSTAD u. ANDERSEN BERG 1989, ROTA et al. 1997). Die vergleichende Äquilibrierung für 90 und 180 Min. erbrachte für die Anteile vorwärtsbeweglicher und Anteil akrosomintakter Spermien nach dem Auftauen keinen Unterschied (GRÖPPER 2004). Dagegen wurde eine Äquilibrierungszeit von 6 Stunden als vorteilhafter gegenüber 30, 60 und 180 Min. befunden (BELALA et al. 2016).

Das Einfrieren des Spermas kann nach der Anpassung zunächst für 10 Min. in Stickstoffdampf etwa 4 cm über dem Spiegel des flüssigen Stickstoffs erfolgen (FONTBONNE u. BADINAND 1993) bevor die Pailletten schließlich in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt werden. Alternativ finden automatisierte Einfriertechniken Anwendung, bei denen die Pailletten nach einer vorab bestimmten Temperaturkurve kontinuierlich abgesenkt werden (STRÖM et al. 1997, SCHÄFER-SOMI et al. 2006). Diese Vorgehensweise führte unter Verwendung der Tiefgefriermaschine Sylab IceCube 1810 (Labexchange, Burladingen) zu einer verbesserten Erhaltung der Akrosom- und Plasmamembran (SCHÄFER-SOMI et al. 2006). Eine optimale Abkühlungsrate von Körper- über Raumtemperatur bis zum Einfrieren gewähreistet ausreichend Zeit für die Dehydratation der Spermien und die weitestgehende Verhinderung einer intrazellulären Eiskristallbildung. Ebenso birgt ein zu langsamer Auftauprozess das Risiko der Eiskristallbildung und mechanischer

Schäden (MAZUR 1984). Allerdings variieren auch die Auftauverfahren zwischen den durchgeführten Studien erheblich. So werden für das Auftauen im Wasserbad Temperaturen von 70 °C und eine Zeit von 8 Sekunden beschrieben (FARSTAD 1984, SCHÄFER- SOMI et al. 2006) im Vergleich zu 30 °C für 30 Sekunden (OETTLÉ 1982) oder 37°C für 30 Sekunden (BENCHARIF et al. 2010).

Aufgrund der extremen Variationen der Konservierungs- und Auftauverfahren ist eine Vergleichbarkeit der Auftauergebnisse nicht gegeben und eine Standardisierung der Tiefgefrierkonservierung von Hundesperma wenig aussichtsreich (EILTS 2005).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Tiere

Für den Studienabschnitt I standen 4 klinikeigene Beaglerüden im Alter von zwei bis sieben Jahren als Samenspender zur Verfügung. Die Ejakulatbeschaffenheit aller vier Rüden entsprach einer Normospermie.

Die Rüden wurden einzeln (n=2) oder in einer Dreiergruppe (n=2) in Zwingern mit gepflastertem Auslauf und mit Stroh ausgelegten Schutzhütten gehalten. Sie wurden zweimal täglich mit einem kommerziellen Trockenfutter gefüttert. Wasser stand ad libitum zur Verfügung.

Für den Studienabschnitt II wurden 27 Rüden unterschiedlicher Rassen im Alter von 1 1/4 bis 9 1/2 Jahren rekrutiert. Ein wesentliches Auswahlkriterium war eine dem Alter und der Körpergröße entsprechende Ausbildung von Hodensack, Hoden, Nebenhoden, Samensträngen, Präputium und Penis. Neben sieben klinikeigenen Beaglerüden handelte es sich um Liebhabertiere oder Zuchtrüden aus Privathaltung. Folgende Rassen waren vertreten: Beagle (n=7), English Setter (n=3), Berner Sennenhund (n=3), Irish Setter (n=2), Deutsch Langhaar (n=2) und jeweils einmal: Labrador Retriever, Kleiner Münsterländer, Irish Red and White Setter, Gordon Setter, Deutsch Drahthaar, Welsh Springer Spaniel, Briard, English Pointer, Petit Basset Griffon Vendeen und Border-Terrier-Mischling. Alle Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung klinisch allgemeingesund.

Tab. 1: Rasse, Alter und Gewicht der Rüden aus dem Studienabschnitt II

Rasse (n)	Alter (Monate)	Gewicht in kg (n)
Beagle (4), Border Terrier-Mix (1), Petit Basset Griffon Vendeen (1), Welsh Springer Spaniel (1)	**17- 57 Mon**	10- 20 (7)
Beagle (3), English Setter (2), Gordon Setter (1), English Pointer (1), Kleiner Münsterländer (1)	**26- 95 Mon**	21- 30 (8)
Irish Setter (2), Deutsch Langhaar (2), English Setter (1), Irish Red and White Setter (1), Deutsch Drahthaar (1), Briard (1)	**14- 114 Mon**	31- 40 (8)
Berner Sennenhund (3), Labrador Retriever (1)	**41- 73 Mon**	41- 55 (4)

3.2 Untersuchungen der Tiere

3.2.1 Allgemeine Untersuchung

Jedes Tier wurde einer kurzen allgemeinen Untersuchung unterzogen. Dabei wurden das Verhalten, der Pflege- und Ernährungszustand bestimmt und als klinische Parameter die Schleimhautfarbe, die kapilläre Rückfüllzeit sowie die Herz- und Atemfrequenz erfasst. Ferner wurden das Abdomen und die äußeren Lymphknoten palpiert.

3.2.2 Spezielle andrologische Untersuchung

Morphologische Untersuchung der Hoden und Nebenhoden

Die Hoden und Nebenhoden wurden nach sogenannten Normrichtwerten (GÜNZEL-APEL et al. 1994, KAYACELEBI 2014) in Relation zum Alter und Körpergewicht der Rüden beurteilt. Dazu wurde das Skrotum adspektorisch und palpatorisch auf seine Ausprägung, Symmetrie und die Verschieblichkeit der einzelnen Gewebeschichten untersucht. Die Hoden wurden hinsichtlich Symmetrie, Größe, Form, Lage und Konsistenz beurteilt. Länge und Breite wurden mittels Schieblehre gemessen. Die Nebenhoden wurden palpatorisch auf ihr vollständiges Vorhandensein überprüft,

wobei der Nebenhodenschwanz zusätzlich bezüglich seiner Größe, Form, Lage und Konsistenz untersucht wurde. Die Samenstränge wurden palpatorisch auf die Verschieblichkeit der Schichten beurteilt.

Samengewinnung

Die Samengewinnung wurde allen anderen Untersuchungen vorangestellt, um insbesondere bei weniger erfahrenen Rüden mögliche Irritationen und Verunsicherungen zu vermeiden. Die Samenentnahme erfolgte nach Kontaktaufnahme des Rüden mit einer läufigen Hündin durch manuelle Stimulation (KRAUSE 1965, GÜNZEL-APEL 2016). Dabei wurde das Ejakulat fraktioniert in Vorsekret, spermienreiche Phase und Nachsekret in sterilen, vorgewärmten, graduierten (8 ml) Tulpengläsern aufgefangen. Zur Sicherstellung von ausreichend Untersuchungsmaterial wurde das Volumen der spermienreichen Phase auf mindestens 2,0 ml eingestellt.

3.3 Untersuchungen der Ejakulate (Basisspermiogramm)

Für jedes Ejakulat wurde ein Spermiogramm unter Verwendung der klassischen, spermatologischen Untersuchungsmethoden erstellt (KRAUSE 1965, GÜNZEL-APEL 1994, WABERSKI et al. 1999). Im Einzelnen sind dies die makroskopische Beurteilung der einzelnen Ejakulatfraktionen bezüglich des Volumens (ml), sowie der Konsistenz und Farbe. Die normale Konsistenz der spermienreichen Phase ist molkig bis milchig, die Farbe grau-weiß bis weiß. Das physiologische Aussehen von Vor- und Nachsekret ist wässrig und klar.

Zur Berechnung der Spermiengesamtzahl im Ejakulat wurde zunächst von allen Ejakulatfraktionen, deren Aussehen das Vorhandensein von Spermien erwarten ließ, die Spermienkonzentration ($x10^6$/ml) mittels Zählkammer nach Thoma neu und Phasenkontrastmikroskop (Fa. Zeiss, Oberkochen, Okular 10x, Objektiv 40x, Phase 2) bestimmt. Dazu wurde aus der spermienreichen Phase ca. 50 µl entnommen und in 9,95 ml 10 %-iger NaCl-Lösung verdünnt. Je nach Konsistenz (milchig, molkig bis

wässrig) der spermienreichen Phase wurde die Menge des entnommenen Materials mit 20-100 µl angepasst. Durch Multiplikation der ausgezählten Spermienkonzentration mit dem Volumen der spermienreichen Fraktion wurde die Spermiengesamtzahl im Ejakulat in Millionen (10^6) berechnet.

Die Motilität der Spermien wurde in der unverdünnten spermienreichen Fraktion bestimmt. Dazu wurden drei ca. gleich große Tropfen von 3-5 µl auf einen auf 38 °C vorgewärmten Objektträger (Fa. IDL, Nidderau, 76x26 cm, geputzt) pipettiert und mit einem Deckglas (Fa. IDL, Nidderau, 18x18 cm) vorsichtig abgedeckt. Mittels Phasenkontrastmikroskop mit Heiztisch (38-40°C) wurden bei 160facher Vergrößerung die Prozentsätze vorwärts-, orts- und unbeweglicher Spermien geschätzt.

Die Bestimmung der plasmamembrangeschädigten Spermien erfolgte mit Hilfe der Eosin-Färbung. Ein Tropfen des Ejakulates aus der spermienreichen Phase wurde mit einem Tropfen 2%iger Eosinfarbstofflösung auf einem Objektträger vermischt und das Gemisch auf einem zweiten Objektträger ausgestrichen. Nach zügiger Trocknung wurden 200 Spermien bei 400facher Vergrößerung mikroskopisch ausgewertet. Spermien mit einer geschädigten Plasmamembran zeigen eine Rotfärbung im Bereich des Kopfes.

Zur Feststellung des Anteils formveränderter Spermien wurde ein Tropfen der spermienreichen Ejakulatfraktion in 300 µl Formolcitrat-Lösung pipettiert und die Spermien auf diese Weise immobilisiert. Von der Spermiensuspension wurden zwei 2 µl große Tropfen auf einen Objektträger verbracht und mittels Deckglas abgedeckt. Die mikroskopische Beurteilung der Spermienmorphologie erfolgte, sobald die Spermien plan auf dem Objektträger lagen. Mittels Phasenkontrastmikroskop wurden bei 1000facher Vergrößerung 200 Spermien auf Veränderungen im Bereich von Kopfkappe, Kopf, Hals, Verbindungsstück, Hauptstück und Endstück sowie auf Doppel- und Mehrfachmissbildungen untersucht und prozentual erfasst.

3.4 Computergestützte Spermienanalysen

3.4.1 Motilitätsanalyse

Als *C*omputer *A*ssisted *S*perm *A*nalyzer (CASA) stand das System SpermVision® (Fa. Minitüb, Tiefenbach) zur Verfügung. Es wurde für die Motilitätsmessungen im frisch verdünnten und aufgetauten Samen verwendet. Zum System gehören neben einem automatisierten beheizbaren Objektträgertisch (HT300, Fa. Minitüb, Tiefenbach) ein Mikroskop mit negativer Phasenkontrastoptik (Mikroskop SV, Olympus CX31, Fa. Olympus Deutschland GmbH, Hamburg), welches über eine digitale Kamera (TM 6760CL, Fa. Jai, Yokohama, Japan) mit TV-Adapter mit einem PC verbunden ist (Abb.2). Über eine im PC vorhandene Software (SpermVision™-Software) wird der automatisierte Kreuztisch gesteuert und die Daten der Messungen analysiert (Abb.2).

Für die Motilitätsanalyse wurden Leja-Kammern mit einer Tiefe von 12 µm verwendet (Fa. Leja, GN Nieuw-Vennep, Niederlande). Die Spermaproben wurden vor der Messung für 5 Minuten in einem auf 38 °C temperierten Wärmeblock inkubiert. Nach vorsichtigem Schwenken der Probe wurden mit einer angewärmten Pipettenspitze 3,5 µl in die Leja-Kammer pipettiert. Die Analyse erfolgte auf dem auf 38°C vorgewärmtem Mikroskopkreuztisch. Pro Messfeld wurde innerhalb von 0,5 Sekunden eine Serie von 30 Bildern aufgenommen. In jede Messung wurden 10 Felder einbezogen, um eine hohe Messgenauigkeit zu gewährleisten. Messfelder, in welchen Artefakte wie Agglutinationen oder Luftblasen zu erkennen waren, wurden von der Messung ausgenommen.

Die Software erkennt Spermien anhand der angegebenen Spermienkopffläche. Diese wurde in den Settings mit 20-100 µm² festgelegt. In den 30 Bildern pro Messfeld wurden die Bewegungen der als Spermien erkannten „Ereignisse“ verfolgt und anhand der Vorgaben des Settings als immotil, lokal- oder progressiv beweglich detektiert. Das Ergebnis einer kompletten Messung bildete der Prozentsatz der in allen Messfeldern erkannten Spermien. Auf diese Weise konnten sowohl die

Gesamtmessung als auch Parameter zu jedem einzelnen Ereignis nachvollzogen werden. Die Einteilung der Ereignisse erfolgte unter Berücksichtigung der von BOYERS et al. (1989) aufgeführten Parameter (s. Tab. 5 Anhang)

Die Festlegung der Messeinstellungen (Kapitel 9.2, Anhang) erfolgte vor Beginn der Studie. Dazu wurde je ein frisch gewonnenes Ejakulat von fünf Rüden mit einem Tris-Eidotter Verdünner auf eine Spermienkonzentration von 60-100 $x10^6$ Spermien/ml verdünnt und im CASA SpermVision® gemessen. Von jedem Ejakulat wurde ein Anteil einem glyerolhaltigen Tris-Eidotter Verdünner verdünnt. Die Glycerin-Endkonzentration betrug 6%. Die Proben wurden eingefroren und nach dem Auftauen mit dem SpermVision® System untersucht. Dabei wurde in jedem Messfeld ausgezählt, wie viele Spermien korrekt erkannt wurden. Ferner wurde eine Zusatzeinstellung zur Erkennung und Abgrenzung von Partikeln mit der Bezeichnung „User Class1“ auf ihre Tauglichkeit überprüft.

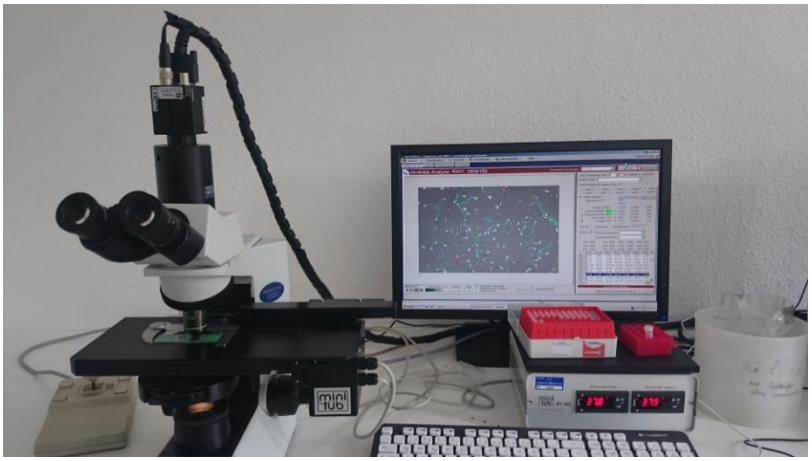


Abb. 2: Arbeitsplatz CASA SpermVision®.Mikroskop mit fahrbarem Heiztisch, vorgewärmtem Heizblock, PC- Bildschirm und Tastatur.

3.4.2 Durchflusszytometrische Analysen

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen stand das Gerät Dako Galaxy® (Fa. Agilent Technologies, Santa Clara, USA) zur Verfügung. Es ist mit einem 488 nm Argonlaser und einer UV-Lampe mit einer Anregungslinie von 365 nm ausgestattet. Die Steuerung des Gerätes erfolgt mittels FLOMAX Software (Fa. Partec, Münster)

Spermien mit einer geschädigten Plasmamembran nehmen den Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) auf, der an DNA und RNA der Zelle bindet und dabei rotes Licht emittiert. Spermien mit geschädigter Akrosommembran lassen sich durch Färbung mit an Fluoreszeinisothiocyanat gekoppeltes Peanut Agglutinin (FITC-PNA, Fa. Vector, Burlingame, USA) und Pisum Sativum Agglutinin (FITC-PSA, Fa. Vector, Burlingame, USA) anfärben. Dabei lagert sich der Fluoreszenzfarbstoff an der Innenseite der äußeren Akrosommembran an und emittiert grünes Licht. Auf diese Weise lassen sich durchflusszytometrisch vier verschiedene Populationen abgrenzen: Spermien mit geschädigter Plasmamembran (rot), Spermien mit geschädigter akrosomaler Membran (grün), Spermien mit sowohl geschädigter Plasmamembran als auch geschädigter Akrosommembran (rot und grün) und Spermien mit intakten Membranen (keine Färbung).

Zusätzlich lassen sich mittels des Farbstoffes Hoechst 342 (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) Partikel ohne Zellkern von Spermien differenzieren, da der Farbstoff durch Bindung an die DNA Zellkerne blau anfärbt.

Für die Bestimmung des Membranstatus wurden 2 µl des Probenmaterials mit jeweils 10 µl Propidiumiodid, Hoechst 342, FITC-PSA und FITC-PNA in 958 µl Tris-Puffer gelöst und für 5 Minuten bei 38 °C in einem abgedunkelten Raum inkubiert. Vor der Messung wurde die gefärbte Probe mittels Vortexmischer gründlich durchmengt. Jede Messung beinhaltete bei einer Flussrate von 300-400 Zellen/ Sekunde die Erfassung von 10.000 Ereignissen.

Die als Partikel erkannten Ereignisse (Hoechst 342 negativ) wurden mittels Gating aus der Messung genommen und die Rot-Grün-Fluoreszenz in einem Dotplot Diagramm gegeneinander aufgetragen. So entstand durch Einsetzen einer senkrechten und einer waagerechten Trennlinie (Quotient,Q) eine Unterteilung in vier Populationen:

Q1: plasmamembrandefekte und akrosommembranintakte Spermien

Q2: plasmamembrandefekte und akrosomdefekte Spermien

Q3: plasmamembranintakte und akrosomintakte Spermien

Q4: plasmamembranintakte und akrosomdefekte Spermien

Da sich der lipophile kationische Fluoreszenzfarbstoff JC-1 an die Mitochondrien der Spermien anlagert und bei hohem Potential der Mitochondrien J-Aggregate, bei niedrigem Potential M-Monomere formt, lassen sich diese unterschiedlich fluoreszierenden Formen durchflusszytometrisch darstellen. Die J-Aggregate emittieren Licht in einem Orangebereich mit einer Wellenlänge von 590 nm (COSSARIZZA 1993, GRAVANCE et al. 2000).

Zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) wurden zu 200 µl Probenmaterial die Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid (20 µl), Hoechst 342 (10 µl) und der mitochondriengängige Farbstoff JC-1 (1 µl) hinzugefügt und mittels Vortexmischer vermengt. Nach Inkubation bei 38°C in einem Wärmeblock in einem abgedunkelten Raum für mindestens 10 Minuten wurde ein Aliquot von 5 µl entnommen und in 995 µl Tris-Puffer pipettiert, erneut gevortext und dann mittels Durchflusszytometer untersucht.

Dementsprechend stellt sich neben den Vorwärts- und Seitwärtsscattern in den Messfeldern, auch ein Messfeld für das rot fluoreszierende PI, ein Feld für das blau fluoreszierende Hoechst und eines für die Orangefluoreszenz der JC-1 gefärbten Spermien dar. Außerdem wurde in einem Dotplot-Diagramm die Orangefluoreszenz

aufgetragen und durch Setzen einer waagerechten Trennlinie (Quotient) der prozentuale Anteil der lebenden Spermien mit positivem MMP bestimmt.

3.5 Ejakulataufbereitung zur Tiefgefrierung

3.5.1 Zentrifugation

Die spermienreiche Ejakulatfraktion wurde in zwei Teile mit identischem Volumen (mind. 1 ml) in skalierte Zentrifugationsröhrchen (Schraubröhre 15 ml mit Spitzboden, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) verbracht. Im Studienabschnitt I (s. 3.6) wurden drei verschiedene g-Zahl-Einstellungen (300 x g, 700 x g, 1400 x g) mit zwei unterschiedlichen Zentrifugationszeiten (5 Min., 10 Min.) verglichen. Im Studienabschnitt II (s. 3.7) wurde mit 700 x g für 5 Min. zentrifugiert. Als Zentrifuge stand „Megafuge 2.0 R“ (Fa. Heraeus, Hanau) zur Verfügung.

3.5.2 Verdünnung

Vergleichend kamen ein selbsthergestellter Tris-Eidotter-Glycerol Verdünner (8.2, Anhang) und ein kommerziell hergestellter Low-Density-Lipoprotein (LDL) Verdünner „CaniFreeze“ (Fa. IMV Technologies, L’Aigle, Frankreich) zum Einsatz. Nach Zentrifugation der spermienreichen Ejakulatfraktion, die vor der Zentrifugation in zwei Splitsample aufgeteilt wurde, wurde dem Spermienpellet 250 µl Verdünner zur Resuspension zugesetzt. In der vorverdünnten Resuspension wurde zunächst die Dichte ermittelt, um dann die Proben auf eine Dichte von 100 Mio. Samenzellen/ml verdünnen zu können. Dazu wurde der Verdünner dem Spermienpellet tropfenweise mit einer Pipette zugegeben und die entstehende Spermiensuspension gleichmäßig mit einer Pipette durchmischt.

3.5.3 Einfrier- und Auftauprozesse

Der zentrifugierte und verdünnte Samen wurde in zuvor beschriftete 0,5 ml Pailletten abgefüllt. Die Beschriftung beinhaltete den angewendeten Verdünner, die jeweilige fortlaufende Nummer des Rüden (1 bis 27) und das Jahr der Samenentnahme. Die

befüllten Pailletten wurden in Racks waagerecht für 90 Minuten bei 5° C äquilibriert, und anschließend für 10 Minuten im Stickstoffdampf, 4 cm über dem Niveau des flüssigen Stickstoffes, eingefroren. Dann wurden sie in flüssigen Stickstoff (-196° C)überführt und für mindestens 48 Stunden eingefroren gelagert.

Zum Auftrauen wurde jede Paillette einzeln für 30 Sekunden in ein 38 °C warmes Wasserbad verbracht. Nach der Entnahme aus dem Wasserbad und gründlichem Abgetrocknen wurde die Paillette am verschweißten Ende aufgeschnitten und der aufgetaute Samen durch vorsichtiges Vorschieben des am anderen Ende der Paillette befindlichen Polyvinylstopfens in ein Eppendorf-Röhrchen (1ml, Fa. Eppendorf AG, Hamburg) überführt.

Zur Überprüfung der Qualität des aufgetauten Spermas wurden mindestens zwei Pailletten pro Probe aufgetaut und untersucht, um ein ausreichend großes Probenvolumen für die Untersuchungen zur Verfügung zu haben.

3.6 Studienabschnitt I

Vorversuch 1

Der Vorversuch 1 diente dem Vergleich unterschiedlicher Zentrifugationsprotokolle. Er wurde in drei Abschnitte (A, B, C) mit identischem Aufbau gegliedert.

Die von den vier Beaglerüden gewonnenen spermienreichen Ejakulatfraktionen (mindestens 2 ml/Rüde) wurden nach kurzer Überprüfung der Spermienmotilität zu einer gepoolten Probe zusammengeführt, so dass sich ein Gesamtvolumen von mindestens 8 ml ergab. Von dem gepoolten Nativsperma wurde ein Basisspermiogramm angefertigt. Es folgte, unter Verwendung beider Verdünner, die Untersuchung zweier Aliquots der Poolprobe mit computergestützter Motilitätsanalyse und der durchflusszytometrischen Untersuchung von Plasmamembran und Akrosommembran, sowie die Bestimmung des

Mitochondrienmembranpotentials. Danach wurden vier Splitsample zu je 2 ml in Zentrifugationsröhrchen (Fa. Sarstedt, Nürmbrecht) pipettiert. Je zwei Splitsample wurden nach der Zentrifugation mit dem Tris-Eidotter Verdünner und dem LDL Verdünner versetzt (s. Abb. 3). Im Studienabschnitt 1A erfolgte die Zentrifugation für 5 bzw. 10 Minuten bei 300 x g, im Studienabschnitt 1B bei 700 x g und im Studienabschnitt 1C bei 1400 x g.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert. Im Überstand wurde die Spermienzahl ermittelt Darüber hinaus wurde die Morphologie der Spermien untersucht, wenn eine ausreichend hohe Anzahl an Spermien vorhanden war.

Das durch die Zentrifugation gebildete Samenpellet wurde mit 500 µl des jeweiligen Verdünners resuspendiert und nach Dichtebestimmung weiter auf 100 $x10^6$ Samenzellen/ml verdünnt. Das verdünnte Sperma wurde in 0,5 ml Pailletten abgefüllt und wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben eingefroren.

Nach frühestens 48 Stunden erfolgte das Auftauen im Wasserbad (38°C für 30 Sekunden) und die mikroskopische Bestimmung der Spermienmotilität, die Kontrolle der Spermienkonzentration und die mikroskopische Auszählung der Kopfkappenveränderungen. Ferner wurden die computergestützte Motilitätsanalyse (CASA SpermVision®) und die durchflusszytometrische Untersuchung der Akrosom- und Plasmamembranintegrität sowie des MMP durchgeführt. Die Messungen am CASA und am Durchflusszytometer fanden zeitgleich mit den mikroskopischen Untersuchungen statt. Beide Untersuchungsmethoden wurden immer von denselben beiden Personen durchgeführt.

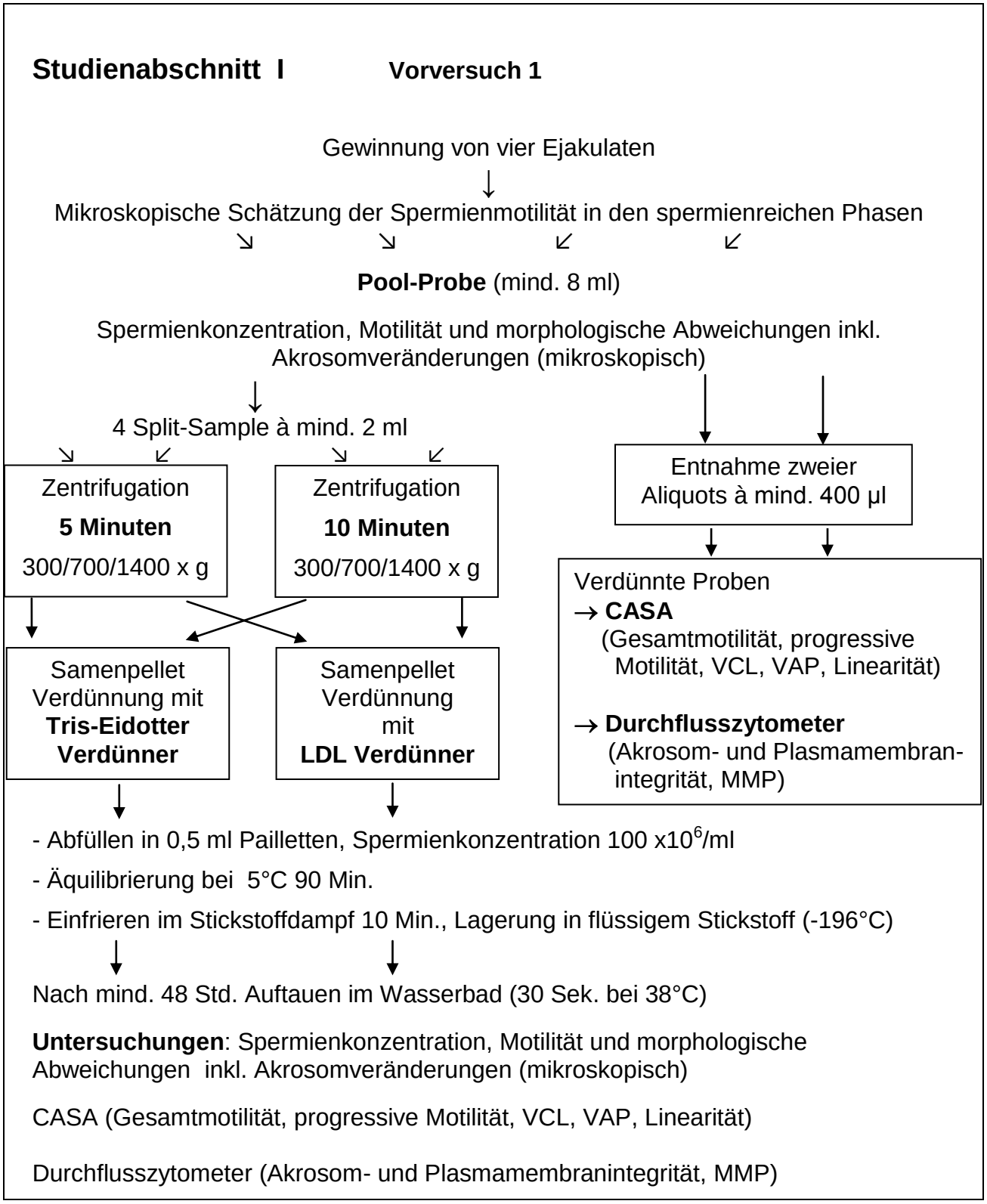


Abb. 3: Schematische Darstellung der Vorversuche 1 A, B, C - Vergleich der Zentrifugationsprotokolle.

Vorversuch 2

Im Rahmen des zweiten Vorversuchs wurde der Einfluss der Zentrifugation untersucht. Dazu wurde aus vier spermienreichen Ejakulatfraktionen derselben vier Beaglerüden eine weitere Poolprobe (8ml) hergestellt und wie beschrieben untersucht (Abb.4). Anschließend wurden zwei Splitsample für 5 Min. bei 700 x g zentrifugiert. Im Zuge der Verdünnung mit Tris-Eidotter-Glycerol Verdünner bzw. LDL Verdünner wurde die Spermienkonzentration auf 100 $x10^6$ pro ml eingestellt und das Sperma wie in Vorversuch 1 konfektioniert und eingefroren. Zwei weitere Splitsample wurden nicht zentrifugiert. Sie wurden mit drei Teilen des jeweiligen Verdünners versetzt und wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben eingefroren. Nach frühestens 48 Stunden in flüssigem Stickstoff wurden zentrifugierte und nicht zentrifugierte Proben aufgetaut und wie im Vorversuch 1 untersucht.

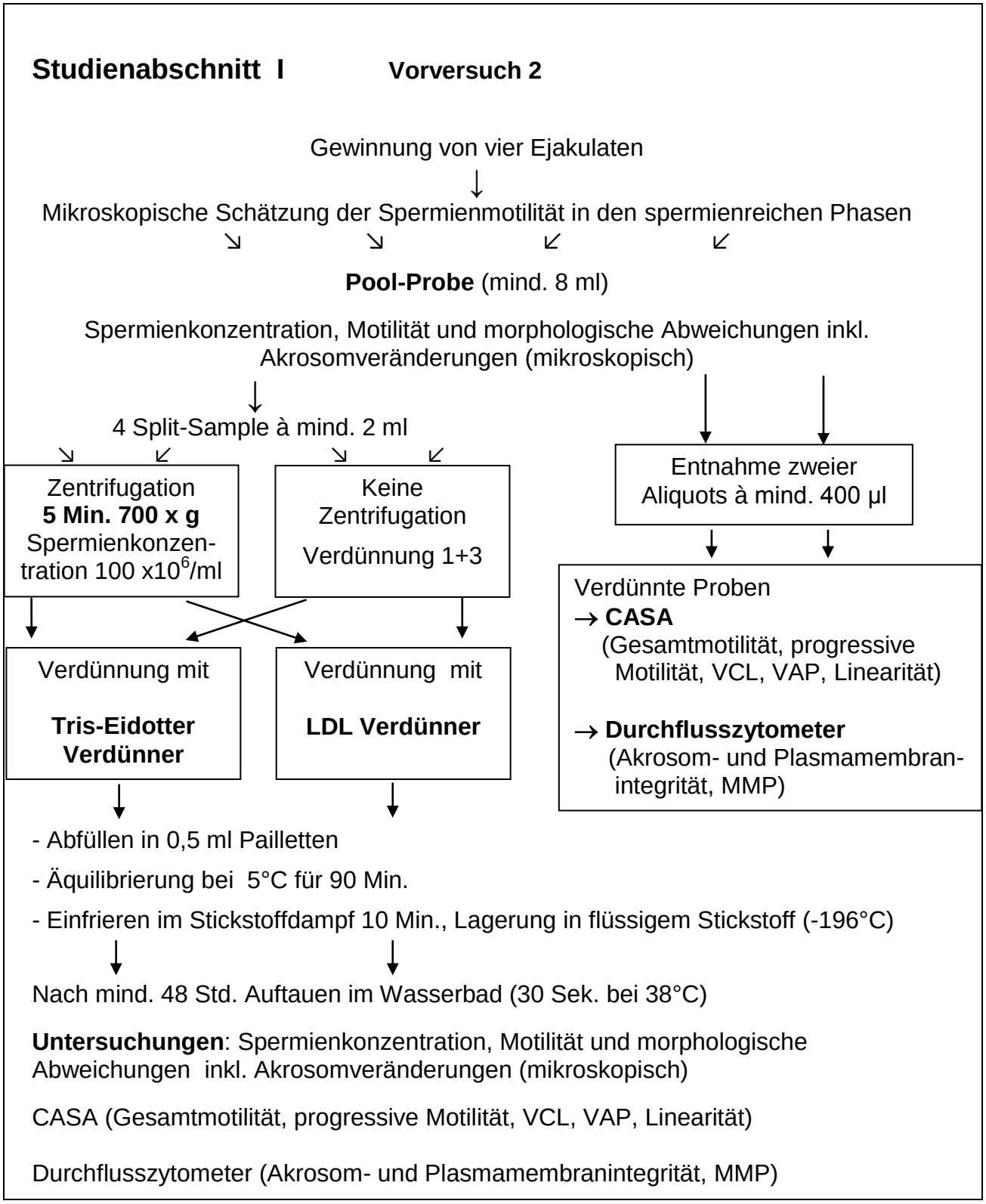


Abb. 4: Schematische Darstellung des Vorversuchs 2 - Vergleich zentrifugierter und unzentrifugierter Spermaproben.

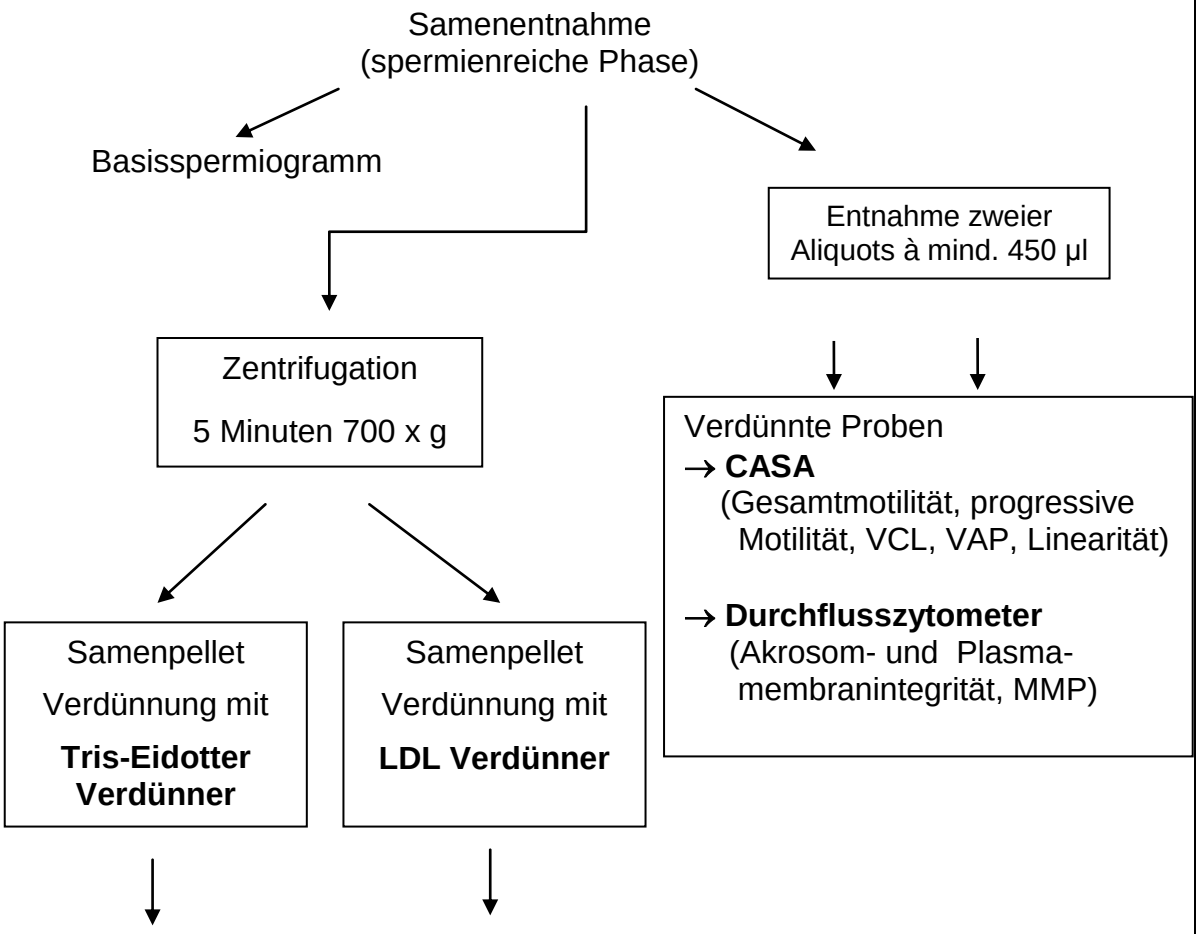
Vorversuch 3

Der Vorversuch 3 entsprach in seinem Ablauf dem Vorversuch 2 (Abb. 4), doch wurde die Spermienkonzentration nach der Zentrifugation auf 200 x 10^6/ml eingestellt.

3.7 Studienabschnitt II – Prüfung individueller Einflüsse der Samenspender auf die Qualität des aufgetauten Spermas

Von den 27 Rüden wurde je ein Ejakulat fraktioniert gewonnen und ein Basisspermiogramm erstellt. Für die computergestützten Analysen wurden zwei Aliquots von mindestens 450 µl entnommen und mit Tris-Eidotter oder LDL Verdünner versetzt (Abb.5). Die restliche spermienreiche Fraktion wurde je zur Hälfte auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 700 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Zur Resuspension wurde dem einen Samenpellet der Tris-Eidotter Verdünner, dem anderen der kommerzielle LDL Verdünner jeweils mit einem Volumen von 250 µl zugesetzt. Nach Bestimmung der Spermienkonzentration erfolgte die weitere Verdünnung auf 100 x10^6 Samenzellen/ ml. Das verdünnte Sperma wurde wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben eingefroren und für mindestens 48 Stunden bei -196°C gelagert. Unmittelbar nach dem Auftauenwurde die Motilität mikroskopisch geschätzt und mittels CASA gemessen. Außerdem wurde mittels Durchflusszytometrie der Status von Akrosom- und Plasmamembran bestimmt und mittels JC-1 Färbung(s. Kapitel 3.3.4) das Mitochondrienmembranpotential gemessen.

Studienabschnitt II



Abfüllen in 0,5 ml Pailletten, Spermienkonzentration 100 x10^6/ml

Äquilibrierung bei 5 °C für 90 Min.

Einfrieren im Stickstoffdampf 10 Min., Lagerung in flüssigem Stickstoff (-196°C)

Nach mind. 48 Std. Auftauen im Wasserbad (30 Sek. bei 38°C)

Untersuchungen: Spermienkonzentration, Motilität und morphologische Abweichungen inkl. Kopfkappenveränderungen (mikroskopisch)

CASA (Gesamtmotilität, progressive Motilität, VCL, VAP, Linearität)

Durchflusszytometer (Akrosom- und Plasmamembranintegrität, MMP)

Abb.5: Schematische Darstellung des Studienabschnitts II

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes SAS® (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, USA) und freundlicher Unterstützung von Dr. Beyerbach vom Institut für Biometrie und Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Für die Auswertung des Studienabschnitts I wurde eine 2- und 3- faktorielle Varianzanalyse durchgeführt, um die Einflüsse der Verdünner, der Beschleunigungszahl (g) und der Zentrifugationszeit zu untersuchen. Ebenso wurde der Einfluss der Zentrifugation an sich und der Samenzellkonzentration pro ml untersucht. Die Daten aus dem Studienabschnitt II wurden nach einer Verteilungsanalyse mit dem Signed-rank Test für nicht normal verteilte Stichproben nach Wilcoxon berechnet. Außerdem wurden mittels Rang-Korrelation nach Spearman Wechselbeziehungen in den aufgetauten Proben untersucht. Für deskripitve Statistiken wie Mittelwert, Standardabweichung und Variationsbreite (min.-max.) wurde zudem das Microsoft Office Programm Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet.

In sämtlichen Tests wurde der Wert $p < 0,05$ als statistisch signifikant festgelegt. Ein Wert von $p < 0,01$ wird als hoch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

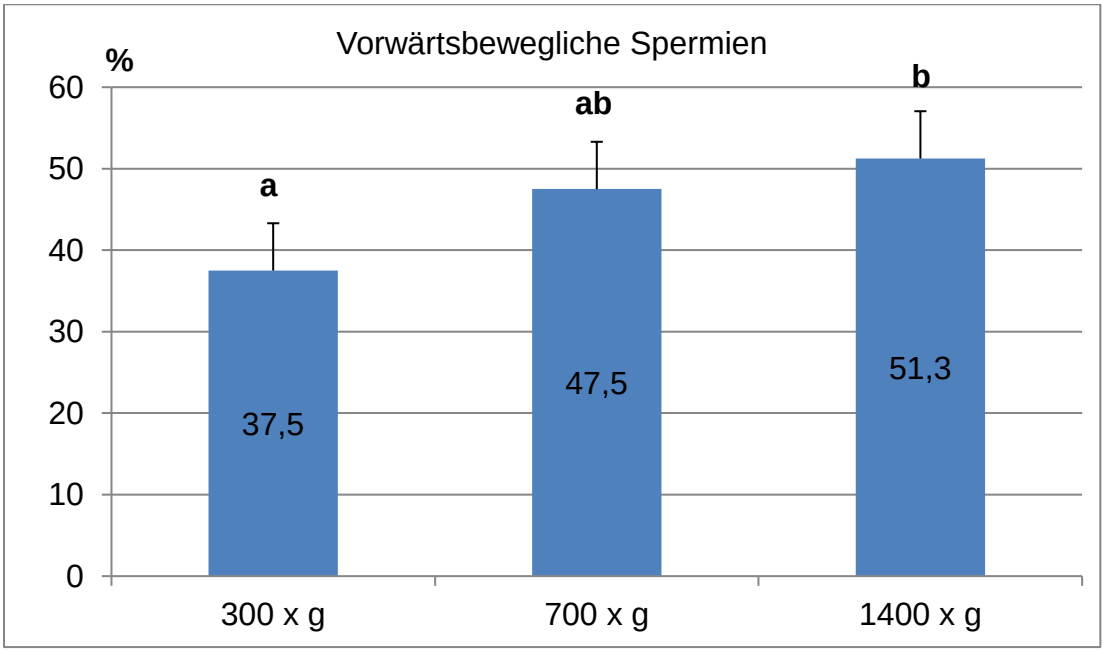
4.1 Studienabschnitt I

4.1.1 Vorversuch 1: Einfluss unterschiedlicher Zentrifugationsverfahren

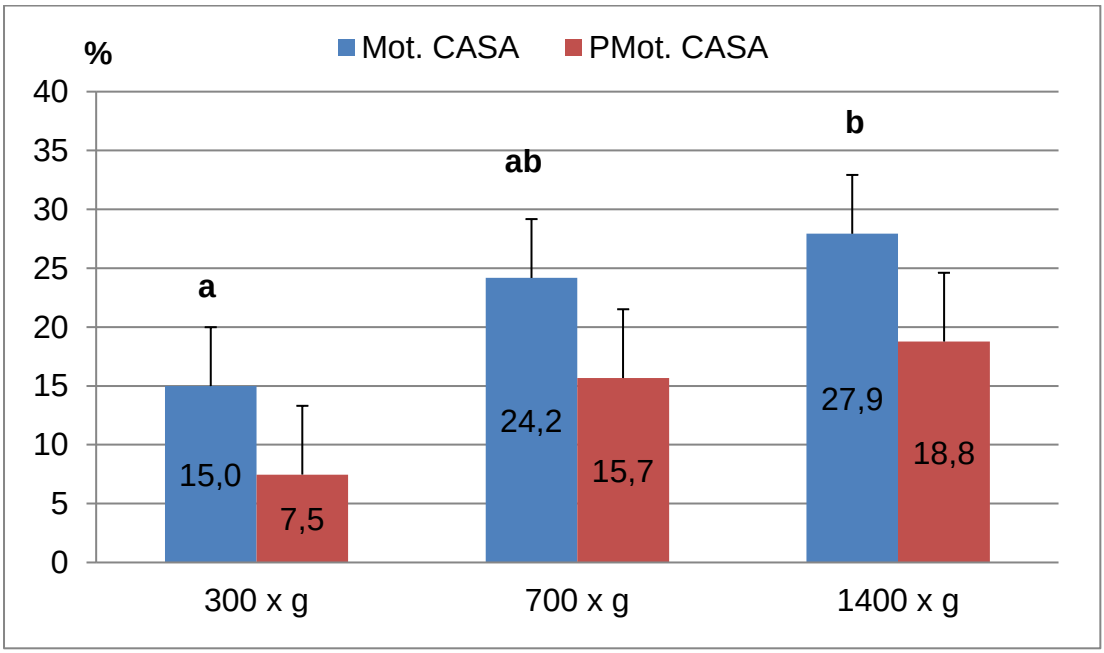
4.1.1.1 Spermienmotilität

Der mikroskopisch geschätzte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im gepoolten aufgetauten Sperma betrug unter Einbeziehung aller Proben unabhängig vom verwendeten Verdünner nach Zentrifugation mit 300 x g 37,5 ± 17,1%, nach Zentrifugation mit 700 x g 47,5 ± 17,6% und mit 1400 x g 51,3 ± 21,7% (300 x g: 1400 x g $p<0,05$) (Abb. 4). Die mittels SpermVision® erzielten Ergebnisse für die Gesamtmotilität (Mot) waren entsprechend nach Zentrifugation mit 300 x g 15,0 ± 3,1%, mit 700 x g 24,2 ± 8,3% und mit 1400 x g 27,9 ± 10,7% (300 x g:1400 x g $p<0,05$) (Abb. 6). Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien (PMot) zeigte im SpermVision® eine vergleichbare Tendenz, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant.

Bezüglich der Zentrifugationszeit ließ sich kein signifikanter Einfluss auf die Spermienmotilität nachweisen (s. Tab. 11 Anhang)



a)



b)

Abb. 6: a) Mikroskopisch geschätzter Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und b) mittels CASA gemessene Anteile motiler Spermien (Mot.) und progressiv motiler Spermien (PMot.) im aufgetauten Sperma nach Zentrifugation mit 300 x g, 700 x g und 1400 x g unabhängig von Verdünner und Zentrifugationszeit (n=4). (a:b $p<0,05$).

Die Mittelwerte für die im CASA ermittelte durchschnittliche Spermiengeschwindigkeit (VAP) lag mit einer Zentrifugation von 300 x g bei 58,5 ±2,7 µm/s, mit 700 x g bei 59,7 ±6,9 µm/s und mit 1400 x g bei 62,5 ±3,2 µm/s. Die kurvolineare Spermiengeschwindigkeit (VCL) betrug mit einer Zentrifugation von 300 x g im Mittel 84,4 ±11,1 µm/s. Mit einer Beschleunigungszahl von 700 x g lag die VCL bei 86,9 ±8,1 und mit einer Beschleunigungszahl von 1400 bei 89,1 ±7,8 µm/s. Die Linearität betrug, je nach g-Zahl bei 300 x g 0,61 ±0,06%, bei 700 x g 0,59 ±0,08% und bei 1400 x g 0,61 ±0,08%.

4.1.1.2 Spermienzahl im Überstand

Nach Zentrifugation bei 300 x g betrug die durchschnittliche Spermienzahl im Überstand 17,8 ± 10,2 x 10^6, bei 700 x g 4,1 ± 1,0 x 10^6 und bei 1400 x g 1,6 ± 1,8 x 10^6 (300 x g: 700 x g und 1400 x g $p<0,05$).

Zur Darstellung des Einflusses der Umdrehungszahl auf die Spermienverluste wurde zusätzlich die sog. Recovery Rate als Prozentsatz der noch im Pellet vorhandenen Spermien bestimmt. Dieser lag im Durchschnitt aller Proben unabhängig vom verwendeten Verdünner zwischen 95,9% und 99,9% (Abb. 7). Bei einer geringen Umdrehungszahl von 300 x g waren die geringsten Werte zu verzeichnen, Bei der Zentrifugationszeit von 5 Minuten deutet eine über dem Mittelwert liegende Standardabweichung auf eine ausgeprägte Variabilität der Recovery Rate hin. Unabhängig von der Zentrifugationszeit betrug die Recovery Rate nach Zentrifugation bei 700 x g und 1400 x g über 99%.

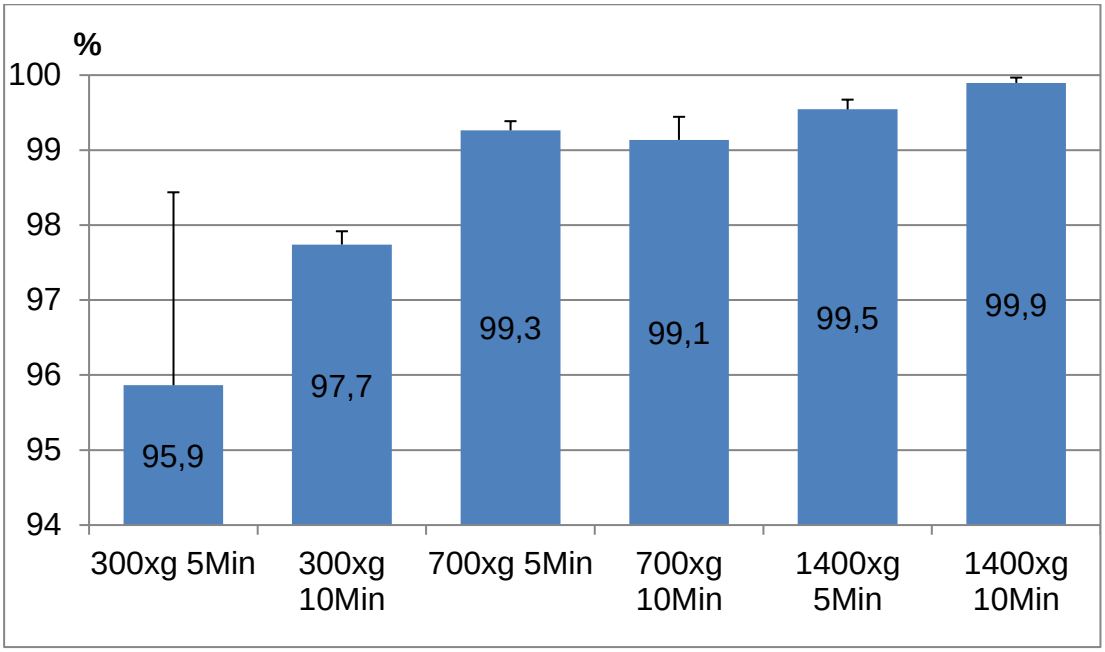


Abb. 7: Recovery Rate. Anteil der nach Zentrifugation im Spermienpellet vorhandenen Samenzellen nach Zentrifugation mit 300 x g, 700 x g und 1400 x g für jeweils 5 oder 10 Minuten (n=2).

4.1.1.3 Akrosomintegrität

Die phasenkontrastmikroskopische Beurteilung der Kopfkappen im aufgetauten Sperma erbrachte einen Anteil geschädigter Kopfkappen (geschwollen, in Ablösung, abgelöst) von 49,5 ± 13,5% bei Zentrifugation von 300 x g, 51,6 ± 10,4% bei 700 x g und 48,0 ± 2,0% bei 1400 x g. Diese Unterschiede waren nicht signifikant. Der Anteil geschädigter Akrosome von 43,9 ± 4,0 % nach 5-minütiger Zentrifugation war im Vergleich zu 55,5 ± 9,2% nach 10-minütiger Zentrifugation signifikant niedriger ($p<0,05$).

4.1.1.4 Spermienmembranstatus

Im Vergleich der unterschiedlichen Umdrehungszahlen, unabhängig der Zentrifugationszeit, ließ sich bezüglich der Membranintegrität kein signifikanter Unterschied feststellen. Für eine g-Zahl von 300 lag das Ergebnis für Q1 (plasmamembrandefekte Spermien) bei 30,2 ± 8,8%, Q2 (akrosom- und plasmamembrandefekte Spermien) 36,6 ± 11,6%, Q3 (akrosom-und

plasmamembranintakte Spermien) 32,1 ± 14,6% und für Q4 (akrosommembrandefekte Spermien) bei 1,1 ± 0,9%. Die Anwendung der Beschleunigung von 700 x g ergab folgende Ergebnisse: Q1: 22,5 ± 6,7%, Q2: 36,2 ± 6,3%, Q3: 39,3 ± 3,4% und Q4: 2,1 ± 1,1%. Die Messung der Membranintegrität bei einer g-Zahl von 1400 zeigte für Q1 einen Mittelwert von 25,1 ± 11,3%, für Q2 von 30,5 ± 2,3%, für Q3 von 42,6 ± 7,7% und für Q4 von 1,9 ± 2,5%.

Unabhängig vom verwendeten Verdünner und von der Umdrehungszahl war nach Zentrifugation des Nativspermas für 10 Minuten ein höherer Anteil an Membranschädigungen im aufgetauten Sperma zu finden als nach 5-minütiger Zentrifugation. Der Anteil an Spermien mit geschädigter Akrosommembran und Plasmamembran (Q2) betrug 30,3 ± 3,0% nach 5-minütiger Zentrifugation und 38,6 ± 8,7% nach 10-minütiger Zentrifugation ($p<0,05$) (Abb. 8). Der Anteil an Spermien mit intakten Membranen betrug entsprechend 42,0 ± 6,6% und 34,0 ± 11,6%, doch erwies sich dieser Unterschied nicht als signifikant.

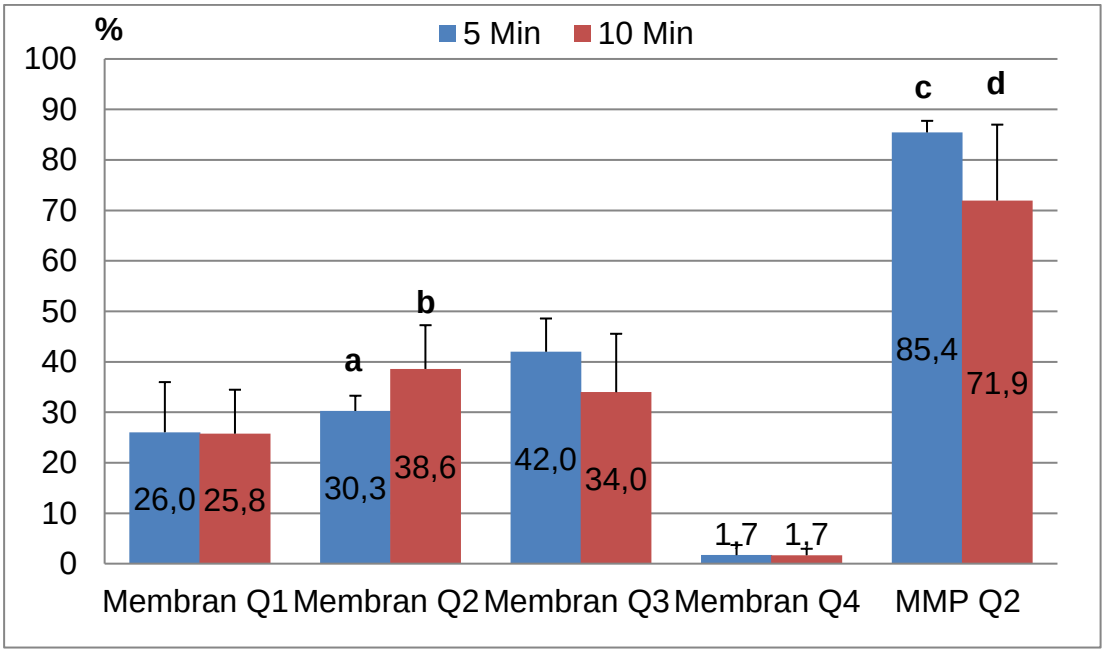


Abb. 8: Akrosom- und Plasmamembranstatus sowie Mitochondrienmembranpotential (MMP) im aufgetauten Sperma nach 5- und 10-minütiger Zentrifugation (a:b und c:d $p<0,05$). Q1= Zellen mit geschädigter Plasmamembran, Q2= Zellen mit geschädigter

Akrosom- und Plasmamembran, Q3= Zellen mit intakter Akrosom-und Plasmamembran, Q4= Zellen mit geschädigter Akrosommembran. MMP Q2= Zellen mit hohem MMP.

.

4.1.1.5 Mitochondrienmembranpotential

Das MMP betrug unabhängig vom verwendeten Verdünner nach 5-minütiger Zentrifugation 85,4 ± 2,3%, nach 10-minütiger Zentrifugation 71,9 ± 15,0% ($p<0,05$) (Abb. 8).

Unter gemeinsamer Berücksichtigung beider Zentrifugationszeiten war das MMP in den aufgetauten Proben, welche mit 700 x g zentrifugiert worden waren, signifikant höher (86,1%) als in dem mit 300 x g zentrifugierten Sperma (69,8%) ($p<0,05$). Bei den mit 1400 x g zentrifugierten Proben betrug der Wert 80,2% (Abb. 9).

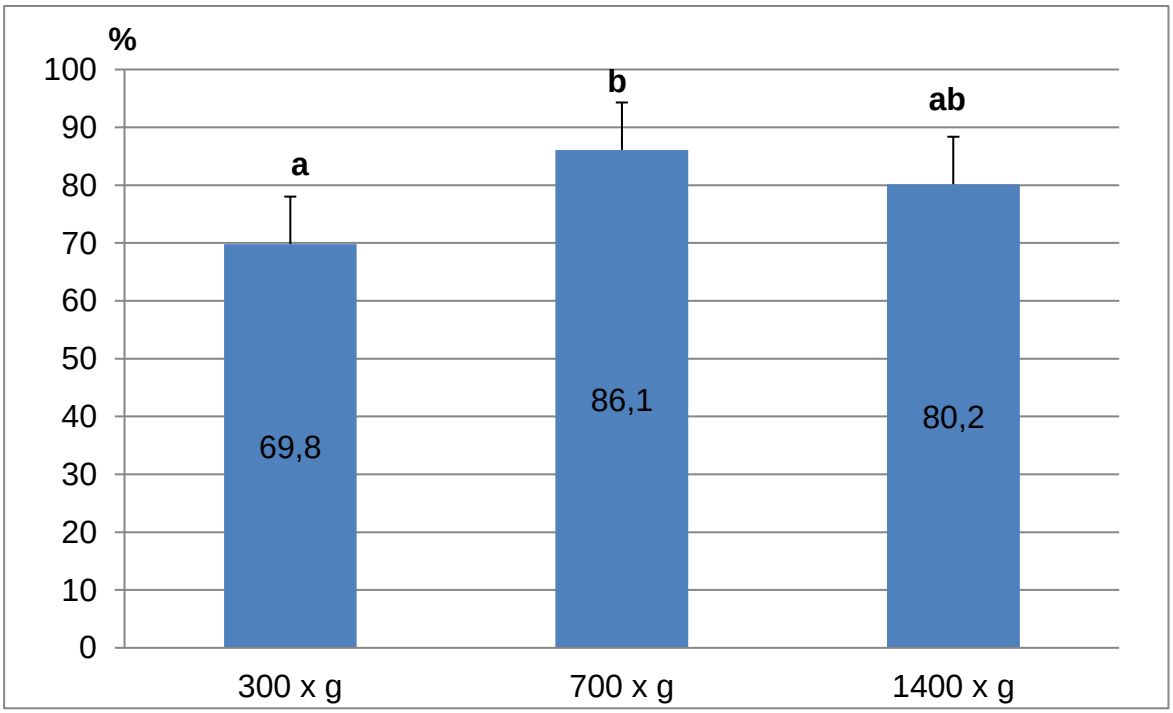


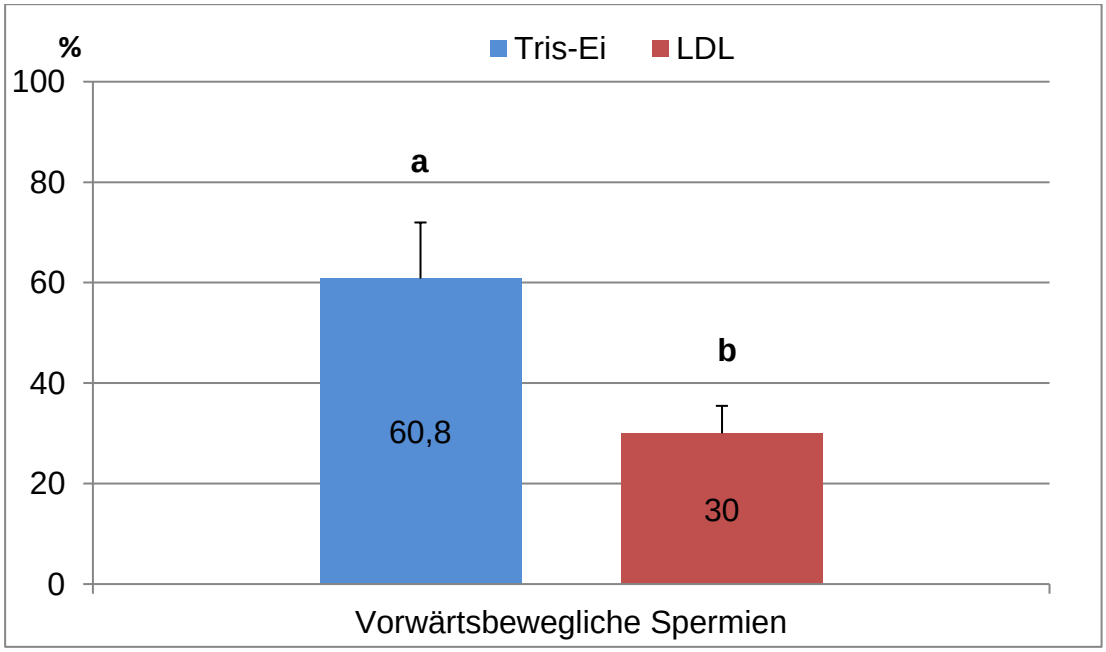
Abb. 9: Mitochondrienmembranpotential im aufgetauten Sperma nach Zentrifugation mit 300 x g, 700 x g und 1400 x g (n=4) (a:b $p<0,05$).

Aufgrund der Vorversuchsergebnisse aus dem ersten Teil des Studienabschnitts I wurde im Weiteren das Zentrifugationsprotokoll 5 min bei 700 x g verwendet, um den generellen Einfluss der Zentrifugation auf die Auftauergebnisse im Vergleich mit nicht zentrifugierten Split-Samples zu untersuchen.

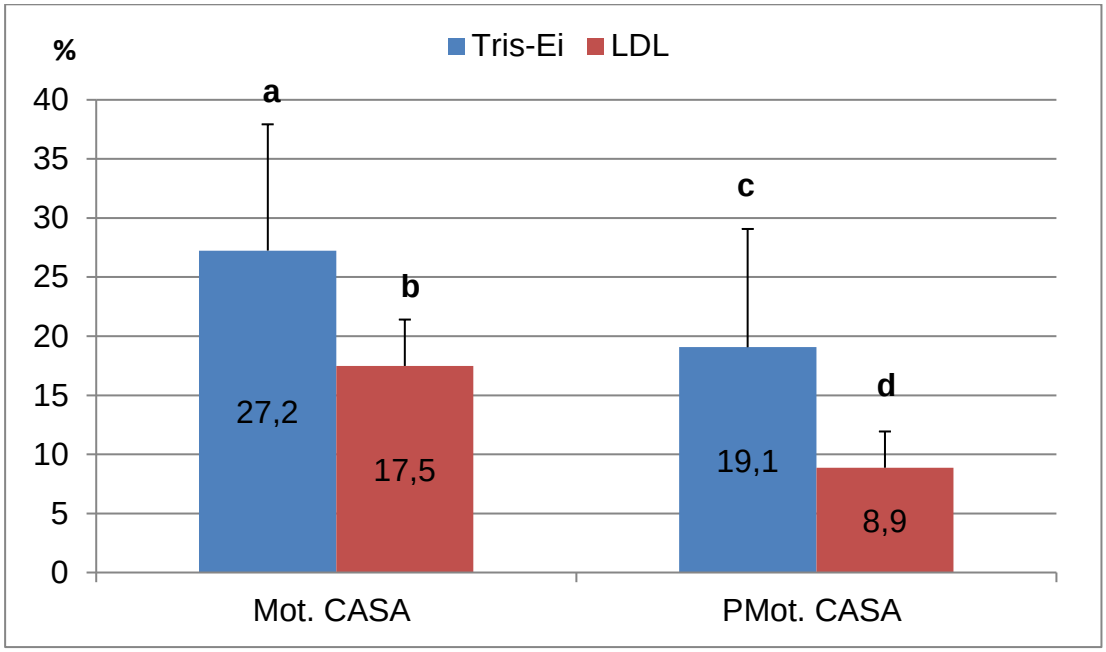
4.1.1.6 Einfluss des Verdünnermediums

Spermienmotilität

Die mit dem Tris-Eidotter Verdünner eingefrorenen Proben zeigten nach dem Auftauen einen signifikant höheren Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien im Vergleich zu dem mit dem LDL Verdünner versetzen Split-Sample (Abb.10).



a)



b)

Abb. 10: a) Mikroskopisch geschätzter Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und b) mittels CASA gemessene Anteile motiler Spermien (Mot.) und progressiv motiler Spermien (PMot.) im aufgetauten Sperma unter Verwendung zweier Verdünnermedien (jeweils n=6) (a:b und c:d $p<0,05$).

Von den zusätzlich mittels SpermVision® gemessenen Motilitätsparametern wiesen lediglich die kurvolineare Geschwindigkeit (VCL) und die Linearität Verdünner-abhängige Unterschiede auf, wobei die VCL in den mit LDL verdünnten Proben mit 91,9 µm/sec signifikant höher war als im mit Tris-Eidotter verdünnten Sperma (81,7 µm/sec) ($p<0,05$) (Abb. 11). Dagegen war die Linearität höher bei Verwendung des Tris-Eidotter-Mediums (0,66%) als bei Verwendung von LDL (0,54%) ($p<0,05$) (Abb. 11). Bei allen anderen mittels CASA gemessenen Motilitätsparametern waren keine Einflüsse des Verdünnermediums zu beobachten.

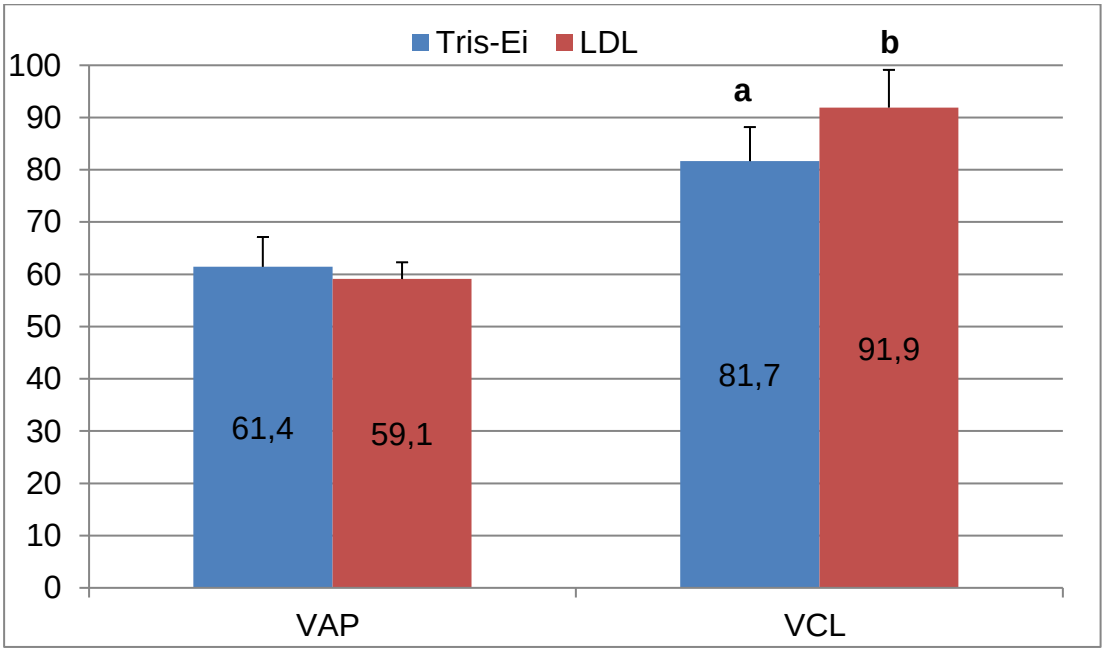


Abb. 11: Geschwindigkeit über eine mittlere Bahn (VAP) und kurvolineare Geschwindigkeit (VCL) der einzelnen Spermien im aufgetauten Sperma unter Verwendung zweier Verdünnermedien (jeweils n=6) (a:b $p<0,05$).

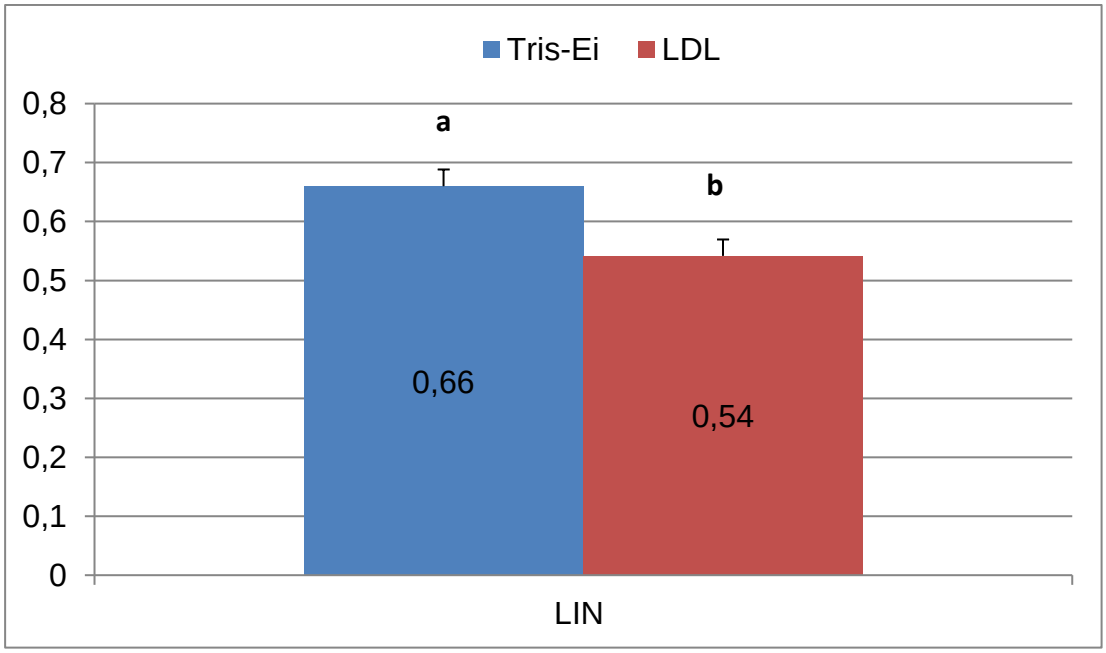


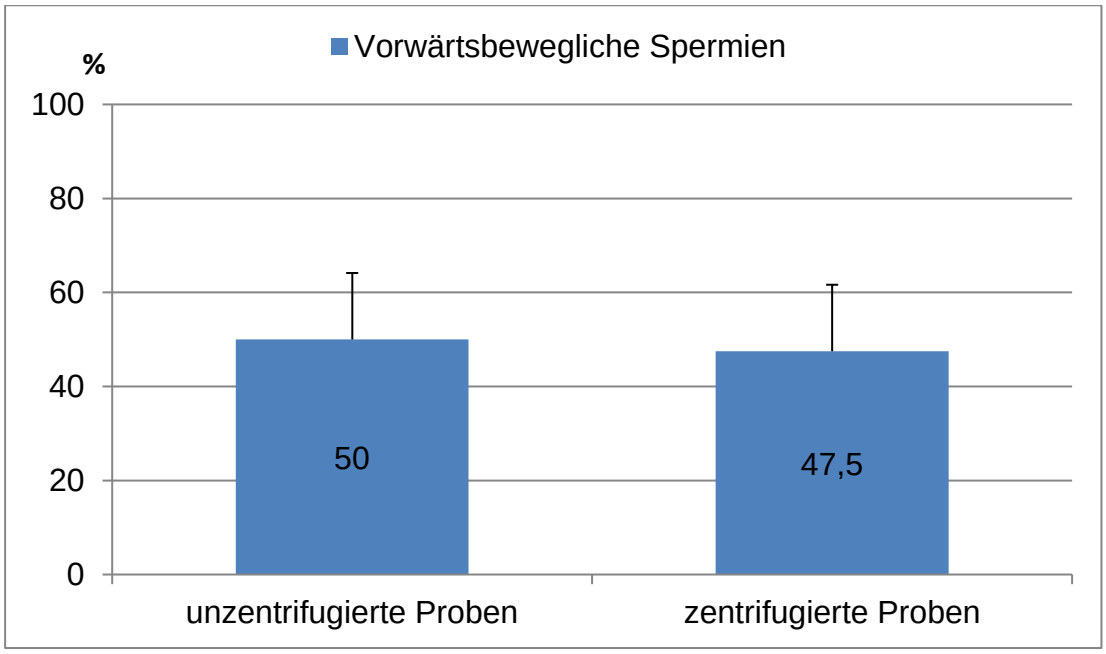
Abb.12: Linearität (LIN) der Bewegung der einzelnen Spermien im aufgetauten Sperma unter Verwendung zweier Verdünnermedien (jeweils n=6) (a:b $p<0,05$).

In den durchflusszytometrischen Messungen zeigte sich bezüglich des Verdünnervergleichs in diesem Teil der Vorversuche keine signifikante Differenz (s. Anhangstabelle).

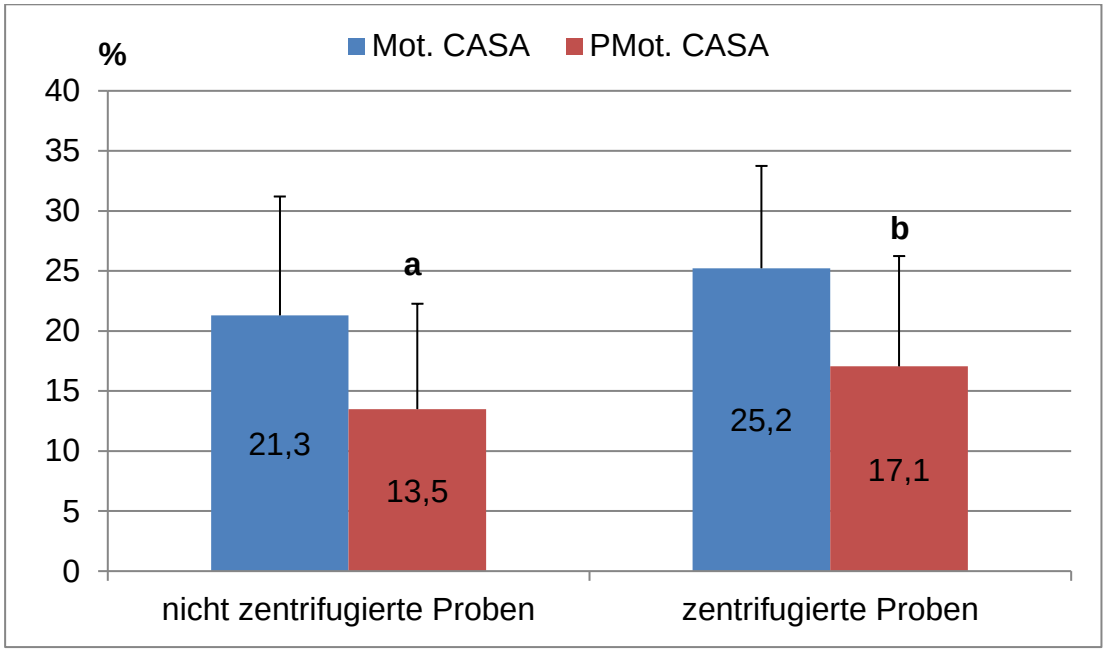
4.1.3 Vorversuch 2 – Einfluss der Zentrifugation (Vergleich zentrifugierter und nicht zentrifugierter Proben)

4.1.3.1 Spermienmotilität

Unabhängig vom verwendeten Verdünner zeigte sich in der mittels CASA gemessenen progressiven Motilität eine signifikante Differenz zwischen zentrifugierten Proben (17,1 ± 9,2%) und nicht zentrifugierten Proben (13,5 ± 8,8%) (p=0,05) (Abb. 13b) Der mikroskopisch geschätzte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien war dagegen annähernd identisch (Abb. 13a).



a)



b)

Abb.13: a) Mikroskopisch geschätzter Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und b) mittels CASA gemessene Anteile motiler Spermien (Mot.) und progressiv motiler Spermien (PMot.) im nicht zentrifugierten und zentrifugierten aufgetauten Sperma unabhängig vom verwendetenVerdünner (jeweils n=2) (a:b p=0,05).

4.1.3.2 Akrosomintegrität

Der mikroskopisch ausgezählte Anteil an Spermien mit Kopfkappenveränderungen im aufgetauten Sperma zeigte keinen Unterschied zwischen den zentrifugierten (43,0 ± 4,9%) und nicht zentrifugierten Proben (44,8 ± 5,3%).

4.1.3.3 Spermienmembranstatus und Mitochondrienmembranpotential

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen zeigten keinen negativen Einfluss der Zentrifugation auf die aufgetauten Spermien. Der Anteil an Spermien, die sowohl eine Akrosom- als auch Plasmamembranschädigung aufwiesen (Q2), betrug in den nicht zentrifugierten Proben 33,6 ± 4,2%, in den zentrifugierten Proben 22,9 ± 3,5% ($p<0,05$) (Abb. 14). Der Anteil an Spermien mit intakten Membranen

(Q3) betrug entsprechend 38,1 ±0,92% und 47,8 ±3,1%, doch rechnerisch erwies sich dieser Unterschied nicht als signifikant.

Das Mitochondrienmembranpotential war in den nicht zentrifugierten und zentrifugierten Proben annähernd identisch (Abb. 14).

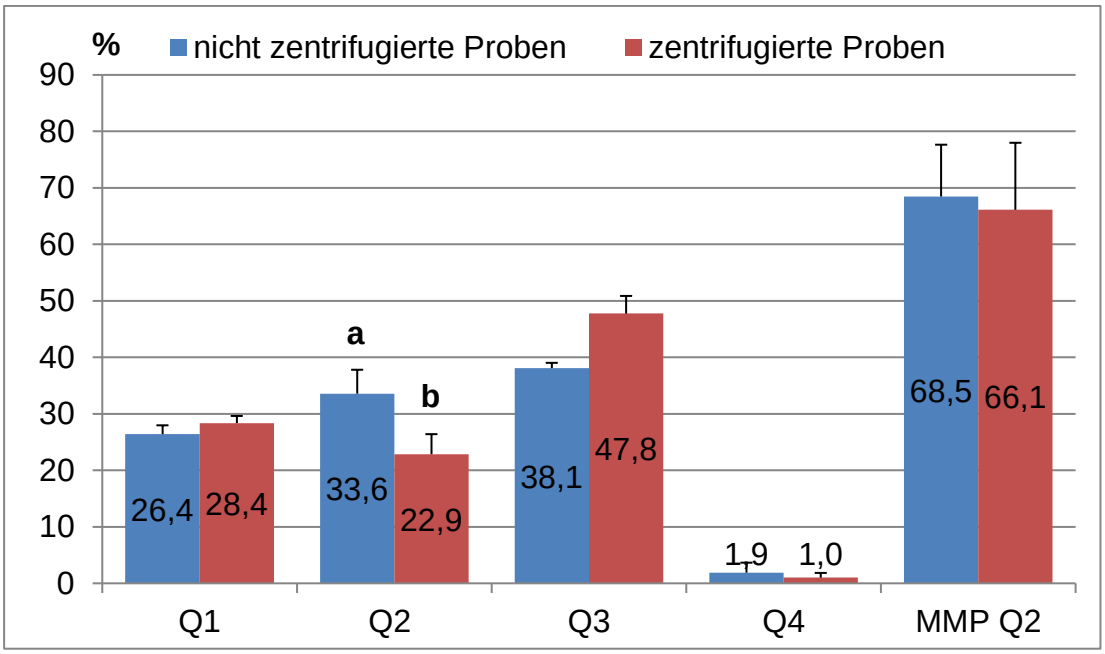


Abb.14: Akrosom- und Plasmamembranstatus sowie Mitochondrienmembranpotential (MMP) im aufgetauten nicht zentrifugierten und zentrifugierten Sperma. . (a:b p<0,05). Q1= Zellen mit geschädigter Plasmamembran, Q2= Zellen mit geschädigter Akrosom- und Plasmamembran, Q3= Zellen mit intakter Akrosom-und Plasmamembran, Q4= Zellen mit geschädigter Akrosommembran. MMP Q2= Zellen mit hohem MMP.

4.1.3.4 Einfluss des Verdünnermediums

Spermienmotilität

Der mittels CASA gemessene Gesamtanteil motiler Spermien betrug im aufgetauten Sperma bei Verwendung des Tris-Eidotter Verdünners 29,8 ± 2,1%, in dem mit LDL-Verdünner versetzten Sperma 16,8 ± 3,5% (p<0,05). Auch die progressive Motilität

war für den LDL-Verdünner mit 8,9 ± 2,3% signifikant geringer als für den Tris-Eidotter-Verdünner (21,6 ± 2,7%) ($p<0,05$).

Die Ergebnisse der Spermienbewegung VAP, VCL und LIN zeigten im Verdünnervergleich keine Unterschiede. So lag unter Verwendung des Tris-Ei Verdünners die VAP bei 65,3 ±7,8 µm/sec, die VCL bei 90,8 ±3,8µm/sec und die LIN bei 0,64 ±0,08%. Die Anwendung des LDL Verdünners erbrachte in diesem Versuchsteil Ergebnisse von 58,3 ±10,3 µm/sec für die VAP, 91,9 ±10,3 µm/sec für die VCL und 0,55 ±0,02 für die LIN.

Spermienmembranstatus und Mitochondrienmembranpotential

Auch für die durchflusszytometrischen Messungen konnten keine Verdünnerunterschiede in diesem Versuchsteil nachgewiesen werden. Die Werte für die mit Tris-Eidotter Verdünner versetzten Proben lagen bei 26,4 ±1,5% (Q1), 31,0 ±7,9% (Q2), 41,5 ±5,7% (Q3) und 1,2 ±0,7% (Q4). Von den mit LDL Verdünner versetzten Proben lagen die Werte im Vergleich dazu bei 28,4 ±1,2% (Q1), 25,5 ±7,2% (Q2), 44,4 ±7,9% (Q3) und 1,8 ±1,9% (Q4). Der Anteil an Spermien mit hohem MMP lag bei Anwendung des Tris-Eidotter Verdünners bei 59,9 ±3,0% und bei Anwendung des LDL Verdünners bei 74,7 ±0,3%. Die Anzahl der Proben betrug jeweils n=2.

4.1.4 Vorversuch 3 - Einfluss der Spermienzahl in der Paillette

4.1.4.1 Spermienmotilität

Unabhängig vom verwendeten Verdünnen zeigte weder die mikroskopisch geschätzte noch die mittels CASA bestimmte Spermienmotilität einen Unterschied bezüglich der Spermienzahl pro Paillette (50 $x10^6$ und 100 $x10^6$ Samenzellen). Lediglich die kurvolineare Spermiengeschwindigkeit wurde durch die Spermienzahl

in der Paillette beeinflusst (50 x10^6 Spermien: 96,3 ± 4,0 µm/sec, 100 x 10^6 Spermien: 74,8 ± 4,1 µm/sec, p<0,01). Die Geschwindigkeit über eine mittlere Bahn (VAP) der Spermien, die mit einer geringeren Dichte eingefroren wurden wiesen ebenfalls höhere Ergebnisse auf, die aber keine Signifikanz zeigten (Abb. 15).

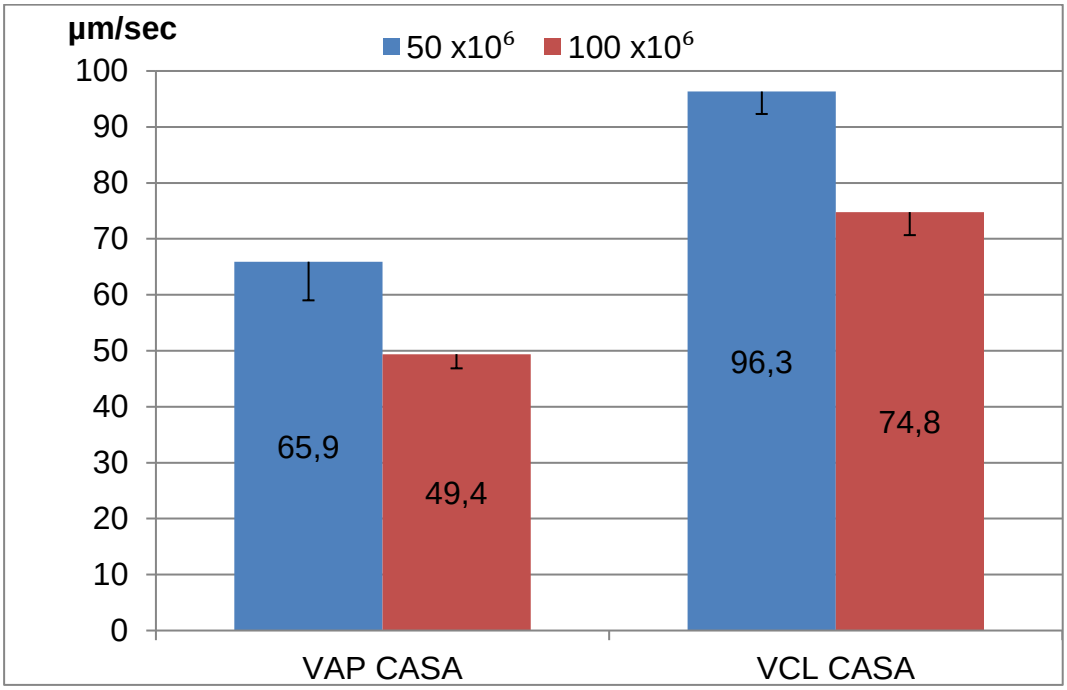


Abb.15: Geschwindigkeit über eine mittlere Bahn (VAP) und kurvolineare Geschwindigkeit (VCL) der Spermien im aufgetauten Sperma bei 50 x10^6 und 100 x10^6 Spermien pro Paillette unabhängig vom verwendeten Verdünner (n=2) (a:b p<0,01).

4.1.4.2 Akrosomintegrität

Die mikroskopische Auszählung der Kopfkappenveränderungen ergab keinen signifikanten Einfluss der Spermienzahl pro Paillette. In den Proben mit 50 x 10^6 Spermien pro Paillette wurden 43,0 ± 5,0%in den Proben mit 100 x 10^6 Spermien pro Paillette 48,8 ± 11,0% Samenzellen mit geschädigtem Akrosom festgestellt.

Spermienmembranstatus und Mitochondrienmembranstatus

Die durchflusszytometrischen Messungen ergaben keine Unterschiede zwischen den Konzentrationen in den Pailletten. In der Erfassung des Membranstatus lagen die Werte für eine Konzentration von 50 x10^6 Spermien pro Paillette bei 28,4 ±1,3% (Q1), 22,9 ± 3,5% (Q2), 47,8 ± 3,1% (Q3) und 1,0 ± 0,8% (Q4). Die Ergebnisse bei Konzentrationen von 100 x 10^6 Spermien pro Paillette lagen bei 20,1 ± 5,3% (Q1), 29,2 ± 1,9% (Q2), 49,7 ± 7,1% (Q3) und 1,0 ± 0,1% (Q4). Der Mitochondrienmembranstatus betrug 66,1 ± 11,9% (50 x 10^6 Spermien/Paillette) und 62,5 ± 12,4% (100 x 10^6 Spermien/Paillette).

Aufgrund der Ergebnisse aus dem zweiten und dritten Vorversuch des Studienabschnitts I wurde im Studienabschnitt II folgende Vorgehensweise bei der Spermatiefgefrierung gewählt: Zentrifugation der spermienreichen Ejakulatfraktion bei 700 x g für 5 Minuten, Verdünnung auf 50 x 10^6 Spermien pro Paillette im Vergleich mit dem Tris-Eidotter-Verdünner und dem LDL-Verdünner.

4.2 Studienabschnitt II

4.2.1 Ejakulatbeschaffenheit gemäß Basisspermiogramm

Die Ejakulate der 27 untersuchten Rüden wiesen im Mittel eine Spermiengesamtzahl (SGZ) von 1234,3 ± 452,8 x 10^6 auf. Der mikroskopisch geschätzte Anteil progressiv motiler Spermien betrug 83,5 ± 7,5%. Der prozentuale Anteil an formabweichenden Spermien betrug 25,5 ± 19,3%, davon hatten 4,6 ± 3,8% der Spermien veränderte Kopfkappen. Der Anteil an Eosin-gefärbten, d.h. plasmamembran-geschädigten Spermien lag bei 9,5 ± 3,9% (Tab. 2).

Die Ejakulatbeschaffenheit in den beiden Altersgruppen wies keine Unterschiede auf. Dies betraf sowohl die Ergebnisse der spermatologischen Routineuntersuchung

(Basisspermiogramm)(Tab. 2), als auch der computergestützten Analysen des frisch verdünnten Spermas (Tab. 3).

Tabelle 2: Ejakulatbeschaffenheit der 27 untersuchten Rüden nach Alter (<48 Monate, >48 Monate) und insgesamt (Basisspermiogramm).

Alter		Gesamt-volumen (ml)	Spermien-gesamtzahl (x 10^6)	Vorwärts-bewegliche Spermien (%)	Eosin-gefärbte Spermien (%)	Form-abweichende Spermien (%)	Spermien mit veränderte m Akrosom (%)
<48 Monate n=13	$\bar{x}$	19,7	1227,1	83,8	9,9	21,2	4,8
	±SD	10,3	439,7	6,6	3,7	14,7	3,8
	min-max	3,2-43,4	506,2-2018,0	70,0- 90,0	5,0- 17,0	7,0- 56,5	1,0-15,0
>48 Monate n=14	$\bar{x}$	32,7	1241,5	83,3	9,1	29,5	4,5
	±SD	23,3	489,2	8,7	4,3	22,9	3,9
	min-max	13,0-82,5	474,4-2048,5	60,0- 90,0	3,0- 17,0	8,5- 77,5	0,0- 15,5
Gesamt n=27	$\bar{x}$	26,4	1234,3	83,5	9,5	25,5	4,6
	±SD	19,0	452,8	7,5	3,9	19,3	3,8
	min-max	3,2-82,5	474,4-2048,5	60,0- 90,0	3,0- 17,0	7,0- 77,5	0,0- 15,5

4.2.2 Ejakulatbeschaffenheit gemäß computergestützten Analysen

Die im CASA ermittelte Gesamtmotilität der Spermien betrug nach Verdünnung des Nativejakulates im Mittel 84,1 ± 10,2%, ohne Berücksichtigung der verwendeten Verdünner (Tab. 3). Der Anteil progressiv motiler Spermien lag bei 80,5 ± 11,6%. Die mittels Durchflusszytometer bestimmte Akrosom- und Plasmamembranintegrität zeigte im ersten Quadranten (Q1) = 16,1 ± 11,1%plasmamembrandefekte Spermien. Der mittlere Anteil an akrosom- und plasmamembrandefekten Spermien (Q2) betrug 5,8 ± 3,8%. Die im dritten Quadranten (Q3) erfassten membranintakten Spermien machten 76,0 ± 13,9% aus. Der Anteil an Spermien mit geschädigter Akrosommembran (Q4) lag bei 2,1 ± 6,4%.

Die durchflusszytrometrische Bestimmung der Spermien mit hohem MMP erbrachte, unabhängig vom verwendeten Verdünner, im Mittel 82,2 ± 13,1%.

Tabelle 3: Ejakulatbeschaffenheit der 27 untersuchten Rüden nach Alter (<48 Monate, >48 Monate) und insgesamt (CASA und Durchflusszytometer).

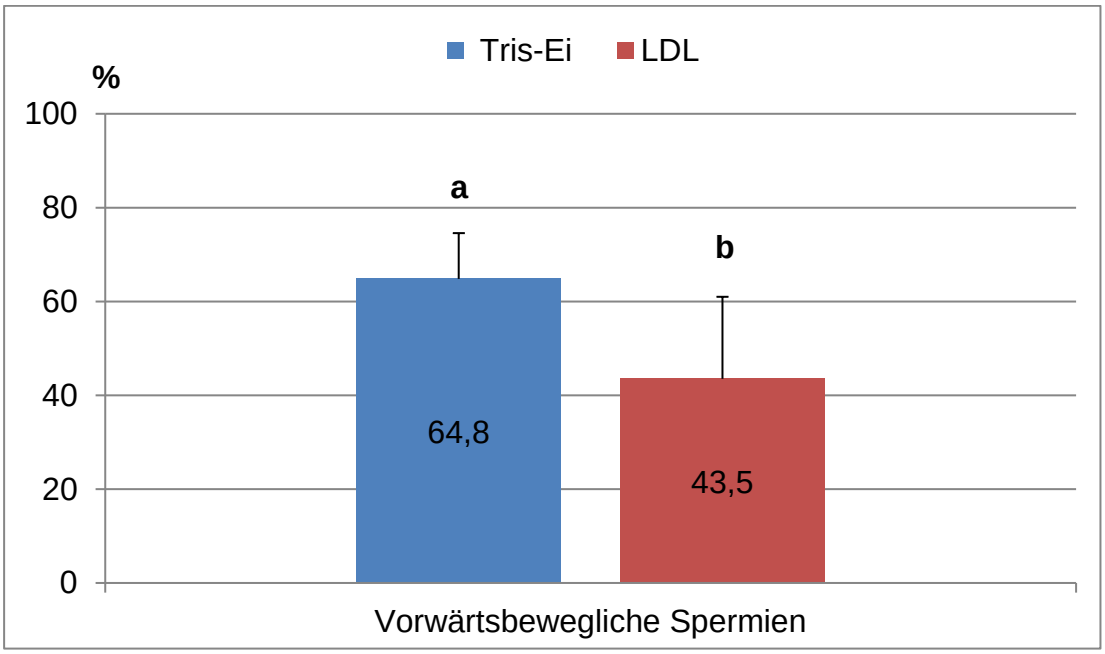
Alter		Motile Spermien (%)	Spermien mit defekter Plasma-membran Q1 (%)	Spermien mit defekter Akrosom- und Plasma-membran Q2 (%)	Membran-intakte Spermien Q3 (%)	Spermien mit defekter Akrosom-membran Q4 (%)	MMP (%)
<48 Mo. n=13	$\bar{x}$	84,9	14,8	5,8	78,4	1,0	82,7
	±SD	7,5	10,4	3,1	11,1	0,8	11,5
	min-max	69,7-95,0	4,4-47,4	1,8-14,9	44,4-92,6	0,1- 3,2	50,2-97,4
>48 Mo. n=14	$\bar{x}$	83,3	17,3	5,7	73,8	3,1	81,6
	±SD	12,3	11,7	4,3	15,9	8,7	14,6
	min-max	51,8-95,7	5,2-49,2	0,0-18,8	40,0-90,8	0,0-34,0	50,3-97,0
Gesamt n=27	$\bar{x}$	84,1	16,1	5,8	76,0	2,1	82,2
	±SD	10,2	11,1	3,8	13,9	6,4	13,1
	min-max	51,8-95,7	4,4- 49,2	0,0-18,8	40,0-92,6	0,0-34,0	50,2-97,4

4.2.3 Beschaffenheit des aufgetauten Spermas

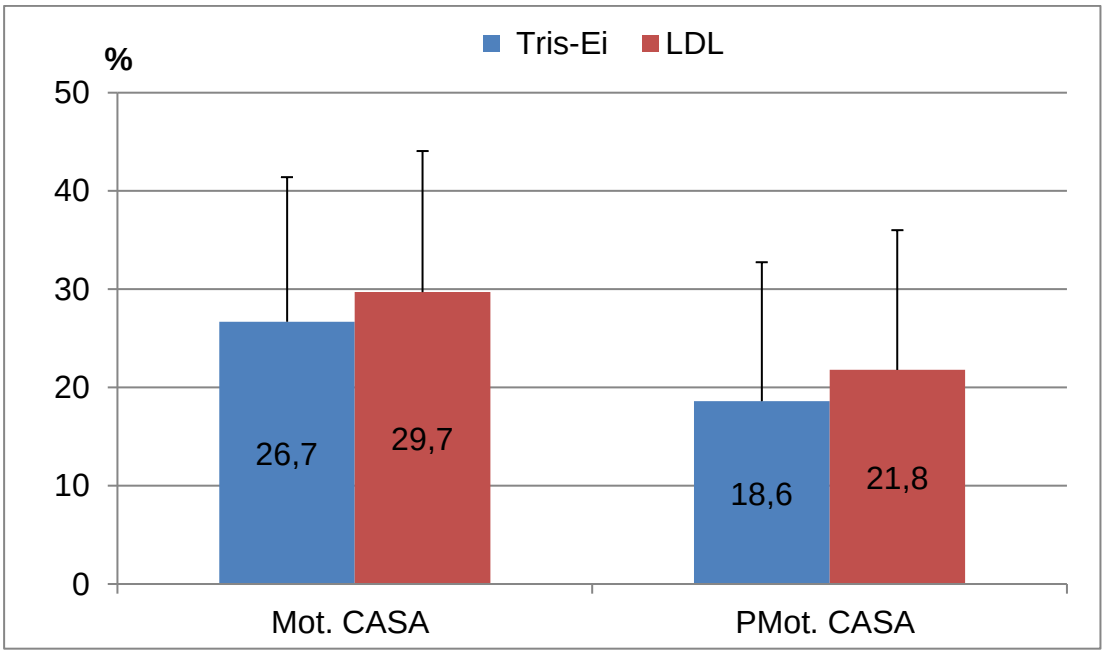
4.2.3.1 Einfluss des Verdünners

Der mikroskopisch geschätzte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien betrug in dem mit Tris-Eidotter Verdünner eingefrorenen Sperma durchschnittlich 64,8 ± 9,8%, im Vergleich zu 43,5 ± 17,5% in den mit dem LDL-Verdünner kryokonservierten Proben ($p<0,01$) (Abb.16a). Ein vergleichbarer Unterschied war bei den Messungen mittels CASA Spermvision® nicht zu verzeichnen. Hier lag der mittlere Anteil progressiv

motiler Spermien auf deutlich niedrigerem Niveau und betrug für den Tris-Eidotter Verdünner 18,6 ± 14,1% und für den LDL-Verdünner 21,8 ± 14,2% (Abb.16b).



a)



b)

Abb. 16: a) Mikroskopisch geschätzter Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und b) mittels CASA gemessene Anteile motiler Spermien (Mot.) und progressiv motiler

Spermien (PMot.) im aufgetauten Sperma nach Kryokonservierung mit Tris-Eidotter Verdünner und LDL-Verdünner (n=27) (a:b p<0,01).

Die Geschwindigkeit der Spermien auf der mittleren Bahn (VAP) zeigte keine verdünnerabhängigen Unterschiede (Tris-Eidotter: $\bar{x}$= 61,4 ± 11,1 µm/sec; LDL: $\bar{x}$= 61,8 ± 10,5 µm/sec). Die kurvolineare Geschwindigkeit (VCL) betrug bei der Anwendung des LDL-Verdünners durchschnittlich 94,3 ± 13,5 µm/sec und lag damit über den VCL in den mit Tris-Eidotter Verdünner eingefrorenen Vergleichsproben ($\bar{x}$= 85,8 ± 12,3 µm/sec) (p<0,05) (Abb.17). Dagegen war die Linearität (LIN) der Spermienbewegung bei Anwendung des Tris-Eidotter Verdünners höher ($\bar{x}$= 0,64 ± 0,08%) als bei der Verwendung des LDL-Verdünners ($\bar{x}$= 0,54 ± 0,08%) (p<0,01) (Abb.18).

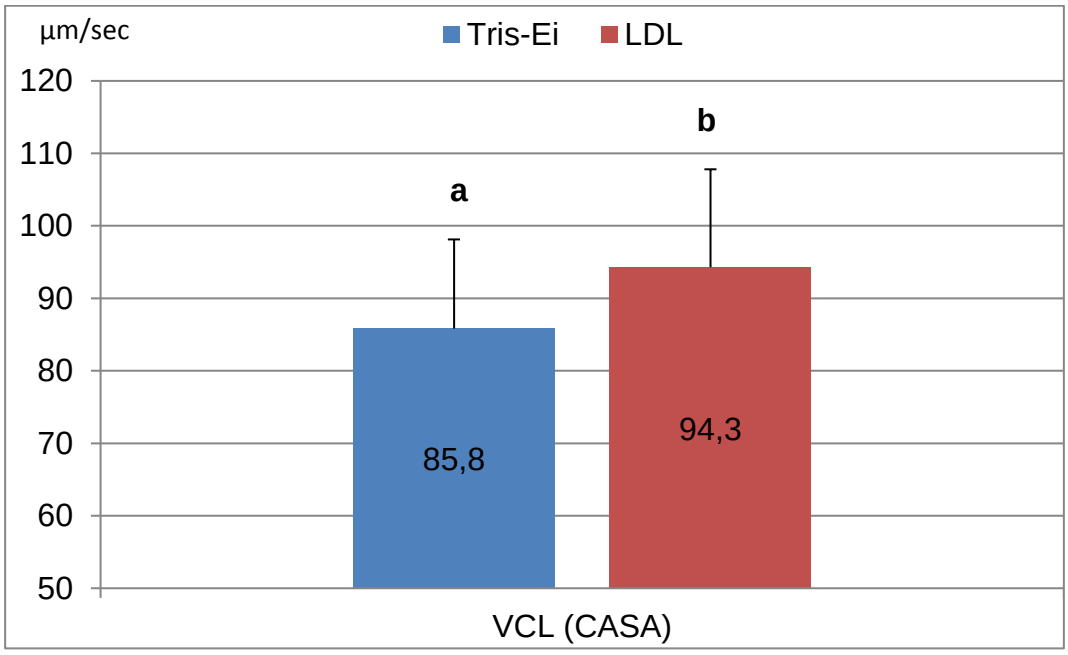


Abb. 17: Kurvolineare Geschwindigkeit (VCL) im aufgetauten Sperma nach Kryokonservierung mit Tris-Eidotter Verdünner und LDL-Verdünner (n=27) (a:b p<0,05).

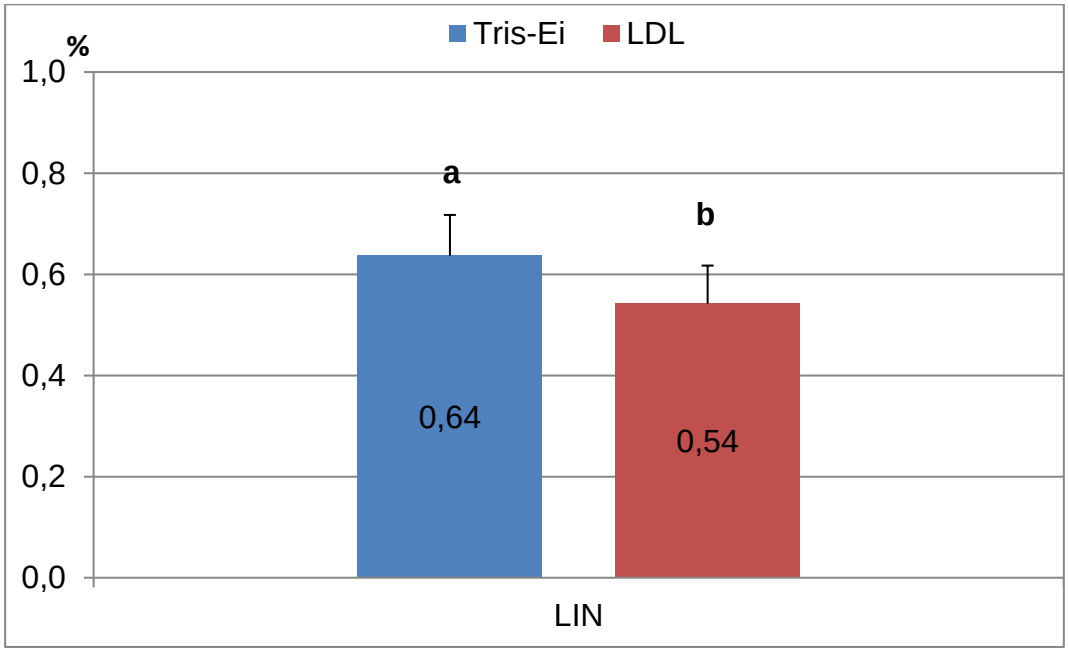


Abb.18: Linearität (LIN) im aufgetauten Sperma nach Kryokonservierung mit Tris-Eidotter Verdünner und LDL--Verdünner. n=27 (a:b p<0,01)

Die phasenkontrastmikroskopische Beurteilung der Akrosomschädigungen (geschwollen, in Ablösung, abgelöst) im aufgetauten Sperma ergab nach Tris-Eidotter Verdünner versetzten Proben im Mittel 46,3 ± 13,5%, nach Verdünnung mit dem LDL-Verdünner 37,6 ± 18,2% (p<0,01) (Abb.19).

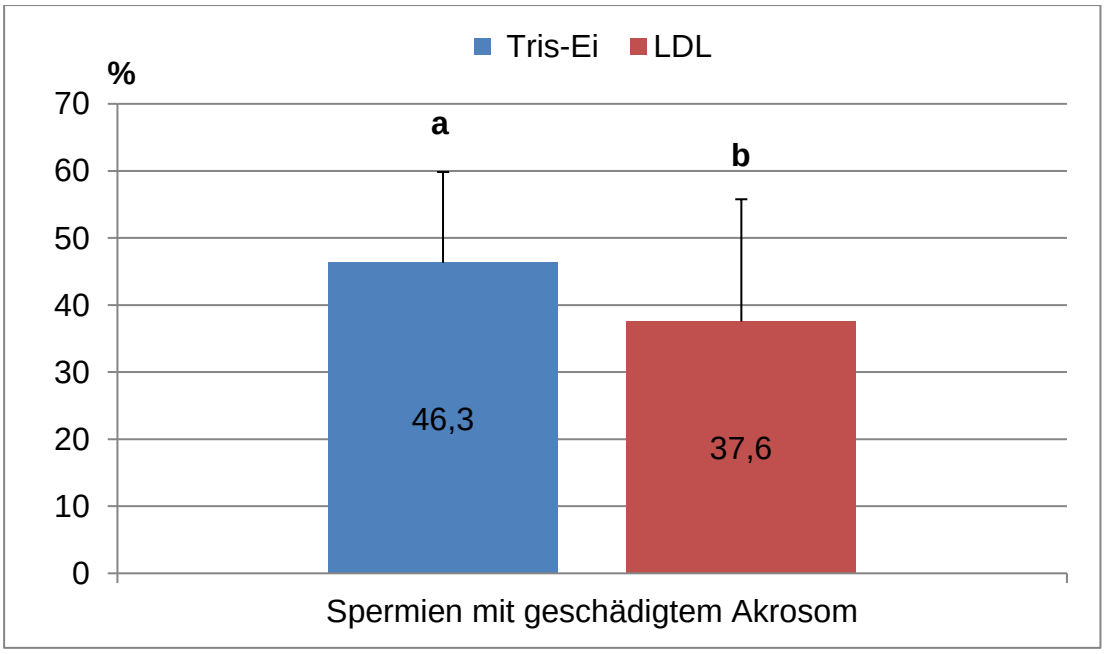


Abb. 19: Anteil an Spermien mit geschädigter Kopfkappe im aufgetauten Sperma nach Kryokonservierung mit Tris-Eidotter Verdünner und LDL-Verdünner (n=27) (a:b p<0,01).

.

Die durchflusszytometrische Bestimmung des Membranstatus erbrachte für die mit dem Tris-Eidotter Verdünner eingefrorenen Proben einen mittleren Anteil plasmamembrandefekter Spermien (Q1) von 15,7 ± 9,2%, für die mit dem LDL-Verdünner verarbeiteten Vergleichsproben 27,1 ± 13,6% (p<0,01) (Abb.20). Spermien mit defekter Akrosom- und Plasmamembran (Q2) waren mit 39,8 ± 15,9% in den Tris-Eidotter Verdünner, mit 26,1 ± 11,9% in den mit LDL-Verdünner eingefrorenen Proben zu finden (p<0,01) (Abb.20). Spermien mit Schädigungen der Akrosommembran (Q4) waren gleichermaßen lediglich in geringen Anteilen nachweisbar (Tris-Eidotter Verdünner: 3,2 ± 6,9%; LDL-Verdünner: 2,5 ± 6,5%. Der Anteil membranintakter Spermien (Q3) zeigte lag für beide Verdünner auf ähnlichem Niveau (Tris-Eidotter Verdünner: 41,3 ± 19,6%; LDL-Verdünner: 45,0 ± 17,7%) (Abb. 20).

Das Mitochondrienmembranpotential (MMP) wies keine Unterschiede zwischen den unterschiedlich verdünnten Spermaproben auf (Tris-Eidotter Verdünner: 71,5 ± 10,3%; LDL-Verdünner: 72,5 ± 13,7%).

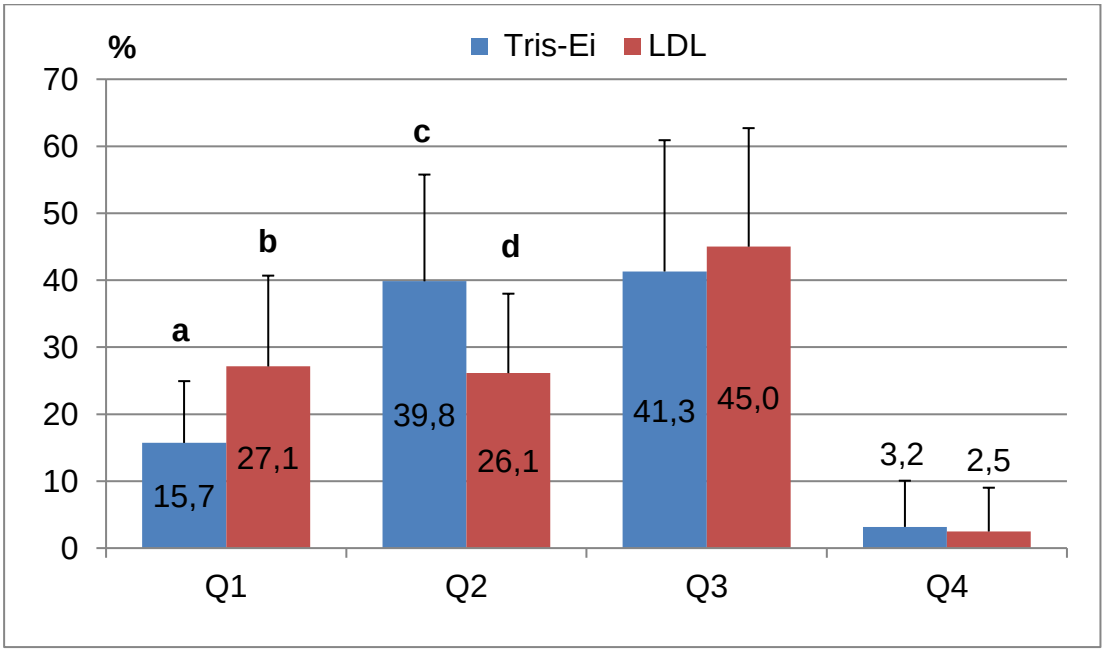


Abb.20: Akrosom- und Plasmamembranstatus im aufgetauten Sperma nach Kryokonservierung mit Tris-Eidotter Verdünner und LDL-Verdünner. n=27. (a:b, c:d p<0,01)

Q1: Plasmamembrangeschädigte Spermien, Q2: Akrosom- und Plasmamembrangeschädigte Spermien, Q3: Akrosom-und Plasmamembranintakte Spermien, Q4: Akrosommembrangeschädigte Spermien.

4.2.3.2 Einfluss des Alters

Der mikroskopisch geschätzte Anteil progressiv motiler Spermien im aufgetauten Sperma betrug bei den ≤48 Monate alten Rüden (n=13) 55,4 ± 17,1%, bei den > 48 Monate alten Rüden (n=14) 53,0 ± 18,4% und lag damit auf identischem Niveau. Die computergestützte Motilitätsanalyse ergab für die jüngeren Rüden eine Gesamtmotilität von 32,2 ± 14,4%, bei den älteren Rüden von 24,5 ± 13,8%. Diese Differenz erwies sich als nicht signifikant. Progressiv motile Spermien wurden im aufgetauten Sperma der jungen Rüden zu 23,9 ± 14,1%, der älteren Rüden zu 16,7 ± 13,5% nachgewiesen (Abb.21).

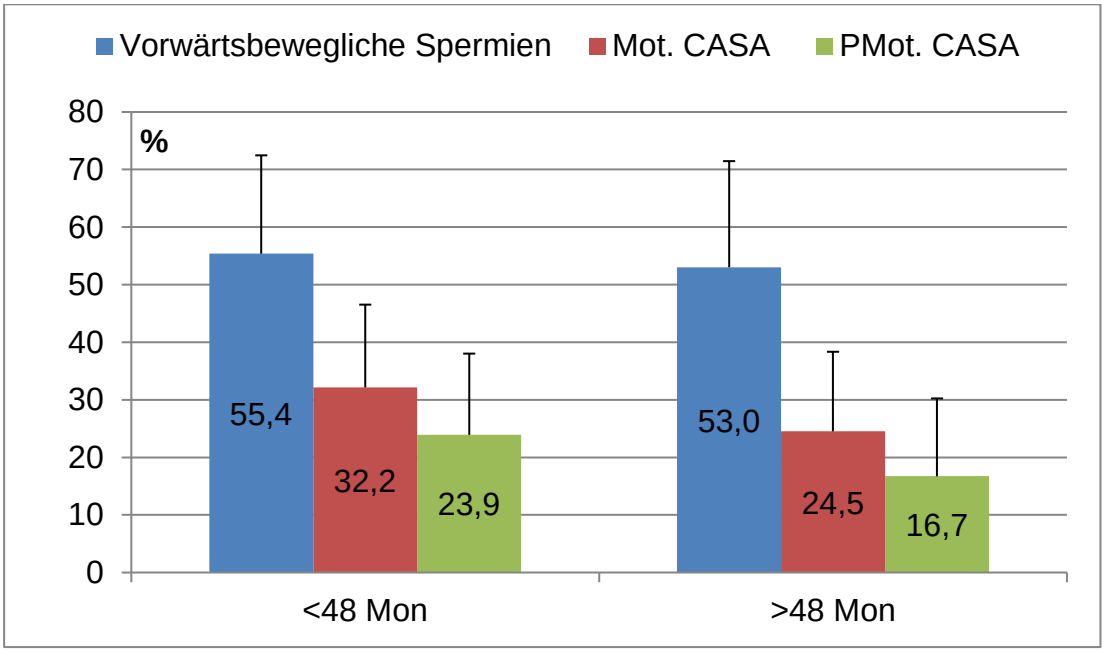


Abb. 21: Mikroskopisch geschätzter Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien, mittels CASA gemessene Anteile an motilen (Mot.) und progressiv motilen Spermien (PMot.) im aufgetauten Sperma von Rüden mit einem Alter <48 Monaten (n=13) und >48 Monaten (n=14).

Die mittlere Bahngeschwindigkeit (VAP) und die kurvolineare Geschwindigkeit (VCL) waren im aufgetauten Sperma der jungen Rüden (VAP: 64,5 ± 10,8 µm/s; VCL: 94,8 ± 12,8 µm/s) tendenziell höher als bei den älteren Rüden (VAP: 58,9 ± 10,0 µm/s; VCL: 85,7 ± 13,0 µm/s).

Der Anteil membranintakter Spermien (Q3) betrug bei den jungen Rüden 49,9 ± 20,4%, bei den älteren 36,9 ± 14,4%. Dementsprechend lagen die Anteile an Spermien mit Plasmamembranschäden (Q1), Akrosom- und Plasmamembranschäden (Q2) und Akrosomschäden (Q4) bei den älteren Rüden höher als bei den jüngeren (<48 Monate: Q1: 18,5 ± 11,0%, Q2: 30,5 ± 16,6%, Q4: 1,2 ± 1,1%; >48 Monate: Q1: 24,2 ± 14,0%, Q2: 35,3 ± 14,4%, Q4: 4,3 ± 9,0%) (Abb.22). Das MMP zeigte mit 73,3 ± 11,9% und 70,8 ± 12,3% keine signifikante Differenz zwischen den beiden Altersgruppen.

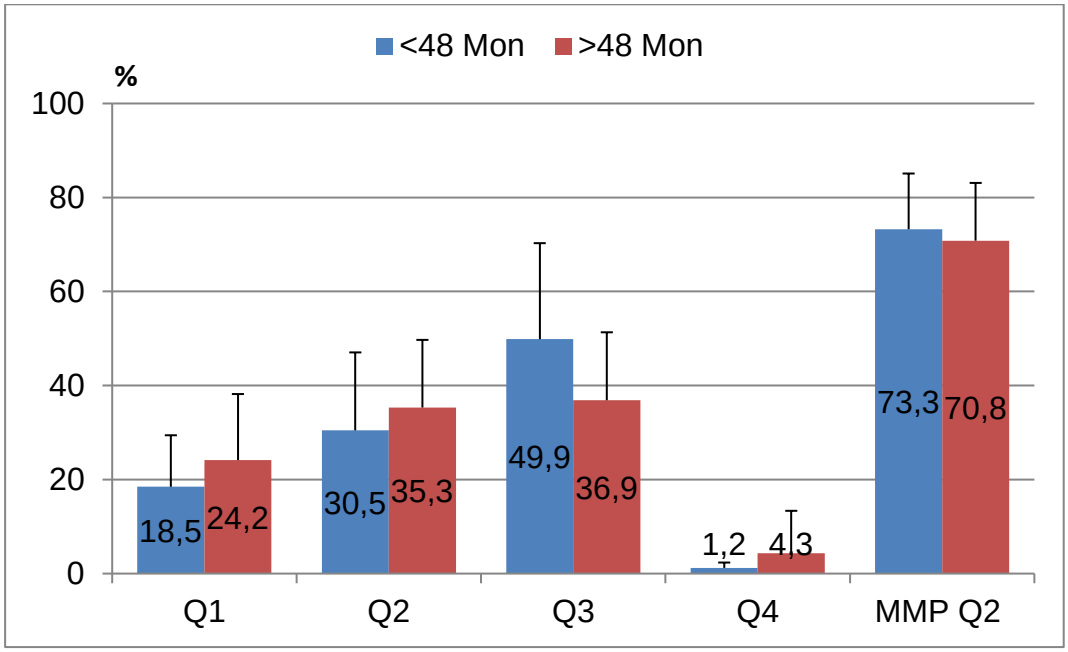


Abb. 22: Akrosom- und Plasmamembranstatus sowie Mitochondrienmembranpotential (MMP im aufgetauten Sperma von Rüden mit einem Alter unter 48 Monaten (n=13) und über 48 Monaten (n=14).

Q1: Plasmamembrangeschädigte Spermien, Q2: Akrosom- und Plasmamembrangeschädigte Spermien, Q3: Akrosom-und Plasmamembranintakte Spermien, Q4: Akrosommembrangeschädigte Spermien.

Bei Betrachtung der beiden angewendeten Verdünner und ihrem Einfluss auf die Auftau-Qualität, waren bezüglich des Rüdenalters nur tendenzielle Unterschiede zu erkennen. Bezüglich der im CASA gemessenen Motilität und progressiven Motilität der Spermien junger Rüden zeigte sich eine deutlichere Differenz zwischen den verwendeten Verdünnern (Mot: Tris-Eidotter Verdünner: 29,8 ±13,7%; LDL Verdünner: 34,5 ±15,2%; PMot: Tris-Eidotter Verdünner: 21,5 ±13,1%, LDL Verdünner: 26,4 ±15,2%) als bei älteren Rüden (Mot: Tris-Eidotter Verdünner: 23,8 ±15,5%, LDL Verdünner: 25,3 ±12,4%; PMot: Tris-Eidotter Verdünner: 15,9 ±15,0%, LDL Verdünner: 17,5 ±12,4%).

Bei Rüden, die älter als 48 Monate waren, wurden mikroskopisch tendenziell mehr Kopfkappenschädigungen nach Verwendung des Tris-Eidotter Verdünners (47,4 ±

15,1%) als für den LDL-Verdünner (37,3 ± 14,1%) festgestellt. Im Sperma der junge Rüden war die gleiche Tendenz zu beobachten (Tris-Eidotter Verdünner: 45,3 ± 12,1%; LDL-Verdünner: 37,8 ± 22,4%). Bei den übrigen Parametern waren keine Unterschiede nachweisbar.

4.2.3.3 Einfluss der Ejakulatbeschaffenheit (Normospermie/Teratozoospermie)

Der mikroskopisch ermittelte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien bei Ejakulaten mit einer Normospermie lag im Mittel bei 55,4 ± 17,3% und bei Ejakulaten mit einer Teratozoospermie bei 50,7 ± 18,8%. Dabei wurde weder der verwendete Verdünner noch das Alter der Rüden berücksichtigt. Die mittels CASA gemessene Gesamtmotilität (Mot.) zeigte für Ejakulate mit Normospermie einen Mittelwert von 30,2 ± 14,5% und für solche mit Teratozoospermie von 22,4 ± 13,1%. Die im CASA ermittelten Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien lagen bei 22,0 ± 14,4% für Normospermie und 15,1 ± 12,5% für Teratozoospermie. Diese Ergebnisse zeigten keine signifikanten Unterschiede. Auch die Parameter zur Bewegung der einzelnen Spermien zeigten keine signifikanten Differenzen. Die Mittelwerte für Ejakulate mit Normospermie waren 62,6 ± 10,6 µm/sec (VAP); 91,1 ± 13,6 µm/sec (VCL) und 0,59 ± 0,08% (LIN). Die Werte für Ejakulate mit Teratozoospermie lagen bei 58,7 ± 10,7 µm/sec (VAP); 87,2 ± 13,1 µm/sec und 0,59 ± 0,13% (LIN).

In der Gruppe der jungen Rüden betrug der Gesamtanteil motiler Spermien (Mot.) nach dem Auftauen des mit einer Normospermie eingefrorenen Spermas (n=11) unabhängig des verwendeten Verdünners 34,8 ± 14,0%, bei im Nativsperma bestehender Teratozoospermie (n=2) bei 17,8 ± 3,9% ($p<0,05$). Bei den >48 Monate alten Rüden war die Gesamtmotilität im aufgetauten Sperma im Vergleich nahezu identisch (Normospermie, n=9: 24,7 ± 13,5%, Teratozoospermie, n=5: 24,2 ± 15,2%).

Die Geschwindigkeit der Spermien auf der gemittelten Bahn (VAP) lag bei den jungen Rüden mit Normospermie (n=11) bei 66,4 ± 10,5 µm/sec, mit Teratozoospermie (n=2) bei 54,3 ± 7,8 µm/sec. Eine ähnliche Differenz war bei den

>48 Monate alten Rüden nicht zu verzeichnen (Normospermie, n=9: 58,0 ±9,1 µm/sec; Teratozoospermie, n=5: 60,5 ± 11,8 µm/sec).

Unabhängig vom verwendeten Verdünner und vom Alter der Rüden war der Anteil akrosom-und plasmamembranintakter Spermien (Q3) im aufgetauten Sperma für die Ejakulate mit einer Normospermie (48,1 ± 18,9%, n=20) signifikant höher als für die Ejakulate mit einer Teratozoospermie (29,0 ± 6,6%, n=7) ($p<0,05$). Für weitere Parameter wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Tab. 4).

Tab.4: Gesamtanteil im CASA ermittelter motiler Spermien (Mot), Anteile plasmamembrandefekter (Q1), akrosom-und plasmamembrandefekter (Q2), akrosom-und plasmamembranintakter (Q3) und akrosommembrandefekter (Q4) Spermien und Mitochondrienmembranpotential (MMP) im aufgetauten Sperma bei Normospermie (n=20) und Teratozoospermie (n=7) unabhängig vom Alter der Rüden.

Ejakulat-beschaffenheit		Mot. (%)	Q1 (%)	Q2 (%)	Q3 (%)	Q4 (%)	MMP (%)
Normo-spermie n=20	$\bar{x}$	30,2	19,0	31,5	48,1	1,9	71,1
	±SD	14,5	11,9	16,9	18,9	3,5	11,9
	min-max	8,2- 58,9	2,3-54,6	3,2- 74,7	12,8-94,2	0,1- 19,9	45,9-91,2
Teratozoo-spermie n=7	$\bar{x}$	22,4	28,5	37,2	29,0	5,4	74,5
	±SD	13,1	13,3	10,3	6,6	11,6	12,5
	min-max	9,3- 63,7	3,4- 44,2	17,8-74,7	17,6-42,2	0,0- 35,9	46,5-90,2
Insgesamt n=27	$\bar{x}$	28,2	21,4	33,0	43,1	2,8	72,0
	±SD	14,5	12,9	15,5	18,6	6,7	12,0
	min-max	8,2- 63,7	2,3- 54,6	3,2- 74,7	12,8-94,2	0,0- 35,9	45,9-91,2

4.3 Korrelationen

4.3.1 Ejakulatbeschaffenheit (Nativsperma)

Der mikroskopisch geschätzte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien war positiv mit der mittels CASA gemessene Gesamtmotilität (r=0,63; p<0,01) korreliert. Ebenso zeigte die im CASA ermittelte Vorwärtsmotilität (r=0,6; p<0,05) eine positive Korrelation zu den mikroskopisch eingeschätzten vorwärtsbeweglichen Spermien.

Desweiteren zeigten die im Routinespermiogramm ermittelten ausgewerteten MAS (r=0,5; p<0,05) und Kopfkappenveränderungen (r=0,3; p<0,05) eine signifikante Korrelation zu dem mittels Durchflusszytometer gemessenen Anteil akrosom-und plasmamembrandefekter Spermien (Q2).

Der Anteil akrosom-und plasmamembranintakter Spermien (Q3) war positiv mit dem im CASA gemessenen Gesamtanteil motiler Spermien (Mot.) korreliert (r=0,5; p<0,05). Für das Mitochondrienmembranpotential ergab sich im frisch verdünnten Sperma weder eine Korrelation mit der Spermienmotilität noch mit dem Membranstatus.

Zwischen dem Alter der Rüden und den Ejakulatparametern war kein Zusammenhang feststellbar.

4.3.2 Aufgetautes Sperma

4.3.2.1 Spermienmotilität

Der mikroskopisch geschätzte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien war sowohl mit dem mittels CASA gemessenen Gesamtanteil motiler Spermien (Mot.) als auch mit dem Anteil progressiv motiler Spermien (PMot.) positiv korreliert (Mot.: r=0,45; PMot.: r=0,44; jeweils p<0,05).

Die Spermiengeschwindigkeit über die gemittelte Bahn (VAP) korrelierte unabhängig vom verwendeten Verdünner hochsignifikant mit der mittels CASA bestimmten

Gesamtmotilität (r=0,72; p<0,01). Für die mit Tris-Eidotter Verdünner versetzten Proben wurde diesbezüglich der Korrelationskoeffizient r=0,64, für die mit dem LDL-Verdünner verarbeiteten Proben r=0,75 ermittelt.

Für das Alter der Rüden ergab sich kein Zusammenhang zu dem mittels CASA gemessenen Gesamtanteil motiler Spermien (Mot.) und dem Anteil progressiv motiler Spermien(PMot). Lediglich die kurvolineare Spermiengeschwindigkeit (VCL) war mit dem Alter signifikant negativ korreliert (r= -0,37; p<0,05).

Zwischen dem mittels CASA gemessenen Gesamtanteil motiler Spermien im aufgetauten und im verdünnten Sperma vor dem Einfrieren bestand keine Korrelation. Ebenso verhielt es sich mit den mikroskopisch geschätzten Anteilen vorwärtsbeweglicher Spermien vor und nach dem Einfrier- und Auftauprozess.

4.3.2.2 Akrosom- und Plasmamembran

Der Anteil phasenkontrastmikroskopisch ausgewerteter akrosomgeschädigter Spermien und der durchflusszytometrisch gemessene Anteil akrosom-und plasmamembrandefekter Spermien (Q2) war hoch signifikant korreliert (unabhängig vom Verdünner: r=0,6; p<0,01; für den Tris-Eidotter Verdünner: r=0,54; für den LDL-Verdünner: r=0,46; jeweils p<0,05). Eine Korrelation mit dem durchflusszytometrisch ermittelten Anteil an Spermien, welche ausschließlich eine defekte Akrosommembran aufwiesen (Q4) war nicht nachweisbar.

4.3.2.2 Mitochondrienmembranpotential

Für das Mitochondrienmembranpotential ergaben sich keinerlei Korrelationen zu den anderen untersuchten Parametern. Dies gilt auch hinsichtlich des Alters der Rüden.

5 Diskussion

Die vorliegende Studie diente der Optimierung der Kryokonservierung von Hundesamen durch Einbeziehung eines Zentrifugationsprotokolls und durch Standardisierung der Spermienzahl pro 0,5 ml Paillette. Darüber hinaus wurden zwei Verdünner hinsichtlich ihrer Eignung für die Spermatiefgefrierung einerseits und für die computergestützte Spermaanalyse andererseits verglichen. Die Untersuchungen erfolgten in zwei Studienabschnitten (I und II). Im Studienabschnitt I wurden im Rahmen von Vorversuchen an gepooltem Beaglesperma verschiedene Zentrifugationsprotokolle, Verdünnungsraten bzw. Spermienzahlen pro Paillette, sowie zwei Spermaverdünner anhand der Auftauergebnisse verglichen. Im Studienabschnitt II wurden die im Vorversuch jeweils am besten abschneidenden Vorgehensweisen (Zentrifugationsgeschwindigkeit und –zeit, Spermienzahl pro Paillette) unter vergleichendem Einsatz derselben beiden Verdünner zur Tiefgefrierkonservierung von 27 unterschiedlichen Rüdenejakulaten angewendet. Damit sollten Einflüsse von Verdünnermedien auf die individuelle Tiefgefrierfähigkeit von Hundesperma dargestellt werden.

5.1 Spermatologische Untersuchungsverfahren

Mithilfe der Basisspermatologie konnte die Beschaffenheit der frisch gewonnenen Ejakulate im unverdünnten Zustand präzise bestimmt werden. Auf dieser Grundlage war im Studienabschnitt II die diagnostische Zuordnung der Ejakulate als Normospermie (alle Ejakulatparameter weisen Normwerte auf) oder Teratozoospermie (der Anteil an morphologisch abweichenden Spermien ist erhöht) zweifelsfrei möglich. Zur Anwendung der computergestützten Analyseverfahren war die Verdünnung des Nativsamens auf eine einheitliche Spermienkonzentration erforderlich. Der durch computergestützte Motilitätsanalyse mittels SpermVision® erhobenen Befunde für den Anteil insgesamt motiler (Mot.) und den Anteil progressiv

motiler Spermien (PMot.) erwies sich bei allen Messungen im Vergleich zum phasenkontrastmikroskopisch geschätzten Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien als um durchschnittlich im 3 % verdünnten Frischsamen, und 20% im aufgetauten Sperma, geringer. Als Ursache hierfür kommen unterschiedliche Faktoren in Frage. So werden für phasenkontrastmikroskopische Motilitätsschätzung für aufgetauten Samen Spermatropfen von ca. 5µl auf den Objektträger pipettiert, wogegen für die CASA-Messung ein Probenvolumen von 3,5µl in eine Leja-Messkammer verbracht wird. Zudem wird mit dem CASA- System eine große Anzahl an Spermien in kurzer Zeit erfasst und dabei jedes Spermium einer Kategorie (immotil, lokal motil oder progressiv motil) zugeordnet. Im Rahmen der mikroskopischen Schätzung beurteilt eine geübte Person den Gesamtanteil der beweglichen Spermien in mehreren Gesichtsfeldern und differenziert dabei zwischen vorwärts-, orts- und unbeweglichen Spermien und ordnet diese prozentual zu. Die Anzahl auf diese Weise beurteilter Spermien ist auch bei Untersuchung mehrerer Proben bzw., Gesichtsfelder vergleichsweise gering.

Die durchgeführten Vergleiche verschiedener Zentrifugationsprotokolle, Spermienkonzentrationen und Verdünner erfolgten sowohl anhand mikroskopischer als auch mittels computergestützter Verfahren erhobener Befunde der Spermienmotilität, sowie der Akrosom- und Plasmamembranintegrität. Als zusätzlicher Parameter wurde das Mitochondrienmembranpotential (MMP) durchflusszytometrisch erfasst. Obwohl davon ausgegangen werden muss, dass die computergestützten Verfahren aufgrund der Erfassung einer hohen Anzahl an Spermien innerhalb eines kurzen Zeitraums und standardisierter Messprozesse repräsentativere Ergebnisse liefern als die subjektiven Einflüssen unterworfenen, durch mikroskopische Beurteilung ermittelten Werte, zeigte die überwiegende Mehrzahl der Ergebnisse eine gute Übereinstimmung bezüglich der Eignung der geprüften methodischen Schritte. Hierzu dürfte beigetragen haben, dass die subjektiven und die computergestützten Messungen jeweils von ein und derselben Person durchgeführt worden sind.

5.2 Zentrifugation (Studienabschnitt I)

Die Auswirkungen der an gepooltem Sperma von vier Beaglerüden getesteten Zentrifugationsprotokolle wurden anhand der Beschaffenheit des aufgetauten Spermas untersucht. Der Vergleich der drei verschiedenen Zentrifugationsprotokolle erbrachte sowohl für die mikroskopische Schätzung als auch für die CASA Messungen einen mit Zunahme der g- Zahl (300 x g, 700 x g, 1400 x g) einhergehenden Anstieg des Anteils vorwärtsbeweglicher und des Gesamtanteils motiler Samenzellen im aufgetauten Sperma. Dabei erwies sich der Unterschied zwischen 300 x g und 1400 x g als signifikant. Dagegen konnten RIJSSELAERE et al. (2002), bei flüssig konserviertem, gekühltem Hundesperma keinen Einfluss unterschiedlicher Beschleunigungen bei der Zentrifugation auf die Spermienmotilität feststellen. Ein ursächlicher Zusammenhang für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darin zu sehen, dass die Kühlung verdünnten Spermas auf +4 °C eine weitaus geringere Belastung für die Spermien darstellt als das Durchlaufen der Einfrier- und Auftauprozesse, so dass die Einflüsse der Beschleunigung bei der Zentrifugation deutlicher zum Ausdruck kommen. Auch der Prozentsatz an Spermien mit hohem MMP war bei Zentrifugation mit 300 x g am geringsten. Dies lässt die Hypothese zu, dass bei langsamerer Beschleunigung mehr Mitochondrien geschädigt werden oder ihre ATP-Produktion drosseln. Studien über Auswirkungen der Zentrifugation auf das MMP von Spermien liegen bisher nicht vor. Ob das bei Zentrifugation mit 300 x g bestehende verminderte MMP ursächlich mit der geringeren Spermienmotilität verknüpft ist, erscheint fraglich, da hierfür keine Korrelation gefunden wurde.

Im Vergleich der Zentrifugationszeiten zeigte sich ein signifikant höherer mittlerer Anteil an Spermien mit hohem MMP (85,4%) nach 5-minütiger Zentrifugation gegenüber 69,8% nach 10-minütiger Zentrifugation. Auch hier war ein kausaler Zusammenhang zwischen MMP einerseits und dem Gesamtanteil motiler Spermien sowie dem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien andererseits nicht zu erkennen.

In der Humanmedizin wird das MMP als Indikator für Apoptosevorgänge verwendet. So konnte TISCHLEDER (2008) einen hemmenden Einfluss einer HIV-Infektion auf

die mitochondriale Aktivität nachweisen und einen Zusammenhang mit einer erhöhten Apoptoserate mit Untergang der T- Lymphozyten feststellen.

Wie erwartet war die Spermienzahl im Überstand und damit der Verlust an Spermien für die Tiefgefrierkonservierung signifikant höher nach Zentrifugation bei 300 x g im Vergleich zur 700 x g und 1400 x g. Allerdings waren in den aufgetauten Samenproben keine Auswirkungen der unterschiedlichen Zentrifugationsgeschwindigkeiten auf die Membranintegrität nachweisbar. Dagegen kam es in der Studie von RIJSSELAERE et. al (2002) zu einer Zunahme an Plasmamembranschädigungen mit Erhöhung der Geschwindigkeit, welche sich besonders nach 2- und 3-tägiger Lagerung der gekühlten Proben manifestierte. In der vorliegenden Studie spielte die Dauer der Zentrifugation als Ursache von Spermienmembranschädigungen eine größere Rolle. So wurde bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen ein signifikant höherer Anteil an Spermien mit geschädigter Akrosom- und Plasmamembran (Q2) nach Zentrifugation für 10 Minuten im Vergleich zu 5 Minuten nachgewiesen. Ein signifkanter Unterschied zeigte sich auch für die phasenkontrastmikroskopisch ausgezählten Spermien mit akrosomalen Schädigungen (Akrosom geschwollen, in Ablösung, abgelöst) und bestätigt somit die Messungen im Durchflusszytometer (Q2). Auch in Studien an menschlichem Sperma konnte ein schädigender Einfluss einer längeren Zentrifugationszeit nachgewiesen werden. Dabei wurde besonders eine Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies nach einer Zentrifugationszeit von 10 Min. im Vergleich zu 2 Min. gesehen (SHEKARRIZ et al. 1995). Allerdings muss beim Vergleich mit anderen Spezies die unterschiedliche Sensitivität der Spermien gegenüber der Zentrifugalkraft berücksichtigt werden. So sind Bullen- und Hengstspermien im Vergleich zu denen von Männern oder Mäusen wesentlich unempfindlicher gegenüber einer schnelleren und längeren Zentrifugation (PICKETT et al. 1975, FREDERICCSON u. KINNARI 1975, KATKOV u. MAZUR 1998). Folglich war es wichtig, in der vorliegenden Studie die spezifische Widerstandsfähigkeit der Membranen von Hundespermien bezüglich der Zentrifugation zu prüfen, um ein möglichst schonendes Zentrifugationsprotokoll anwenden zu können.

Bei dem Vergleich des MMP zwischen den Zentrifugationszeiten von 5 oder 10 Minuten, zeigte sich eine signifikant höheres Potential von 85,4% für 5 Minuten. Das MMP für die Zentrifugation von 10 Minuten lag dagegen im Mittel bei 69,8%. Da sich allerdings die Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien im Vergleich kaum unterschieden, weder für die mikroskopisch bewertete Motilität noch für die im CASA gemessene GMot. und PMot. kann in diesem Fall nicht unbedingt ein direkter Zusammenhang zwischen Motilität und MMP hergestellt werden.

Insgesamt waren die Auftauergebnisse des gepoolten Spermas bezüglich der Motilität und des MMP nach Zentrifugation bei 700 x g oder 1400 x g besser als nach Zentrifugation bei 300 x g. Desweiteren bewirkte die höhere Beschleunigung geringere Samenzellverluste im Überstand. In Kombination mit der Zentrifugationszeit von 5 Minuten ließ sich auch das Ausmaß an Akrosom- und Plasmamembranschädigungen günstig beeinflussen. Allerdings lässt sich im Rahmen dieser Studie keine Aussage zu Langzeiteffekten der Zentrifugation treffen, wie sie von RIJSSELAERE et al. (2002) für verdünntes, bei +4 °C gelagerten Samen in Bezug auf die Plasmamembranintegrität, beschrieben werden. Hierzu hätte ggf. die Durchführung eines Thermoresistenztests am aufgetauten Sperma beitragen können.

Im Vergleich von zentrifugierten und nicht zentrifugierten aufgetauten Spermaproben erwies sich in der vorliegenden Studie die Zentrifugation als vorteilhaft bezüglich des mittels CASA gemessenen Anteils progressiv motiler Spermien (PMot.: zentrifugiert: 17,1 ± 9,2%; nicht zentrifugiert: 13,5 ± 8,8%) und des Anteils an membrangeschädigten Samenzellen (Q2: zentrifugiert: 22,9 ± 3,5%; nicht zentrifugiert: 33,6 ± 4,2). Auch wenn die Werte für die VAP von zuvor zentrifugierten Proben tendenziell über denen von unzentrifugierten lagen (s. Tab. Anhang), konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Auch SCHÄFER-SOMI et al. (2006) stellten bei Anwendung des sog. Uppsala-Verdünners eine höhere Motilität der aufgetauten Spermien fest, wenn die Proben zuvor bei 700 x g für 5 Min. zentrifugiert worden waren. Ferner wirkte sich in dieser Studie die Zentrifugation günstig auf die Membranintegrität aus, was anhand eines

höheren Anteils an akrosom- und plasmamembranintakten Spermien (Q3) zum Ausdruck kam. Ähnliches beobachteten wiederum SCHÄFER-SOMI et al. (2006) in Form eines positiven Effektes der Zentrifugation auf die Erhaltung der Plasmamembran. Bezüglich des Anteils an phasenkontrastmikroskopisch ausgezählten Kopfkappenschädigungen war kein Unterschied zwischen zentrifugierten (43 ± 5,0 %) und nicht zentrifugierten Proben(44,8 ± 5,3 %) feststellbar. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Beobachtungen von KODERLE et al. (2009), die im aufgetauten Sperma sowohl bezüglich der Motilität als auch der Samenzellmorphologie negative Effekte der Zentrifugation feststellte.

Der Vergleich des MMP zwischen zentrifugierten (66,1 ± 11,9%) und nicht zentrifugierten Proben (68,5 ± 9,2%) zeigte keinen Unterschied. Allerdings sollte insgesamt bedacht werden, dass die Probenanzahl (n=4) recht niedrig war und in weiterführenden Studien, besonders der Einfluss der Zentrifugation auf das MMP untersucht werden sollte.

5.3 Verdünnermedium

Der eidotterfreie LDL Verdünner war zum Vergleich mit dem herkömmlichen Tris-Eidotter Verdünner gewählt worden, da er aufgrund des Fehlens von störenden Partikeln als besonders geeignet für die computergestützte Motilitätsanalyse dargestellt wird (BELALA et al. 2016). Darüber hinaus stehen mit den aus dem Eidotter extrahierten Low Density Proteinen die für den Schutz der Spermienmembranen wichtigen Substanzen in einheitlicher Zusammensetzung für die Spermakonservierung zur Verfügung, während dies im Eidotter, welches in Abhängigkeit von seiner Herkunft bzw. von zahlreichen Faktoren wie Haltung und Fütterung der Hühner, nicht gegeben ist.

Wider Erwarten und im Gegensatz zu den Beobachtungen von Bencharif et al. (2010) war der phasenkontrastmikroskopisch geschätzte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien ebenso wie die mittels SpermVision® gemessenen Anteil insgesamt motiler und progressiv motiler Spermien in den mit dem LDL Verdünner

kryokonservierten Sperma im ersten Studienabschnitt signifikant geringer als in den mit dem Tris-Eidotter Verdünner versetzten Proben. Dieselbe Beobachtung wurde beim Vergleich der zentrifugierten mit den nicht zentrifugierten Proben gemacht. Dass dieser Befund auf fehlerhaft erkannten Eidotterpartikeln beruht kann ausgeschlossen werden, da insbesondere alle durch computergestützte Analyse erhobenen Befunde nachträglich überprüft und ggf. korrigiert werden. Außerdem wurde mit einer Zusatzeinstellung („UserClass1“) eine Detektion der Partikel vorgenommen, um diese aus der Messung des Systems raus zu halten. Die Ursache für die Motilitätsergebnisse könnte darin bestehen, dass die für die gepoolte Split-Sample Probe jeweils die gleichen vier Rüden als Samenspender dienten. Da der individuelle Einfluss auf die Auftauqualität des Spermas entscheidend ist, könnte durch die kleine Auswahl an Rüden das Ergebnis unter Verwendung des LDL Verdünners in diesem Studienabschnitt schlechter sein.

Die zusätzlich berücksichtigten Bewegungsparameter VCL, VAP und Linearität wiesen dagegen in den mit LDL Verdünner eingefrorenen Proben signifikant bessere (VCL, LIN) oder annähernd identische Werte (VAP) auf. In diesem Ergebnis kann die Freiheit des LDL Verdünners von Partikeln, welche die Spermiengeschwindigkeit bzw. die geradlinige Vorwärtsbewegung stören können, zum Ausdruck kommen.

Im Vergleich der beiden Verdünner konnte für den LDL-Verdünner ein geringerer Anteil an akrosom- und plasmamembranschäden gemessen werden.

In dieser Studie mit den angewendeten Verdünnern zeigte sich ein positiver Effekt der Zentrifugation auf die Qualität des Auftauergebnisses. Allerdings muss man die geringe Anzahl an ausgewerteten Proben beachten, die ein wirklich aussagekräftiges Ergebnis verhindern. Da die Ergebnisse unserer Studie sich mit den Tendenzen der Ergebnisse von SCHÄFER- SOMI et al. (2006) und RIJSSELAERE et al. (2002) decken, haben wir uns im Fortverlauf der Arbeit für die Verwendung des Protokolls von 700 x g für 5 Minuten entschieden. Nach unseren Ergebnissen ist aber eine

Anwendung von 1400 x g für 5 Minuten ebenso mit einer Verbesserung der Auftaumotilität und wenig Samenzellverlusten verbunden.

5.4 Spermienkonzentration/Anzahl Spermien pro Paillette

In diesem Studienabschnitt kam bereits das in den vorausgegangenen Untersuchungen erarbeitete Zentrifugationsprotokoll (700 x g für 5 Min.) an gepooltem Sperma von vier Beaglerüden zur Anwendung. Wiederum wurden Vergleichsproben mit Tris-Eidotter- oder LDLVerdünner versetzt. In den 0,5 ml Pailletten waren mit 50 x 10^6 (Spermienkonzentration 100 x 10^6/ml) oder 100 x 10^6 Spermien (Spermienkonzentration 200 x 10^6/ml) enthalten. Der mikroskopisch geschätzte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im aufgetauten Sperma war in den mit 50 x 10^6 Samenzellen gefüllten Pailletten besser (47,5 ± 24,8 %) als bei doppelt so hoher Spermienzahl (25 ± 7,1 %). Ähnlich verhielt sich der mittels CASA gemessene Gesamtanteil motiler Spermien (50 x 10^6: 25,2 ± 8,5 %; 100 x 10^6: 12,9 ± 2,2 %). Obwohl sich diese Unterschiede als nicht signifikant erwiesen, wird die geringere Spermienzahl pro Paillette aufgrund der signifikant größeren VCL (96,3 ±4,0 µm/sec im Vergleich zu 74,8 ±4,1 µm/sec für 100 x 10^6) als günstiger für das Einfrieren beurteilt.

Die Werte aller untersuchten Parameter zur Erfassung der Membranintegrität wiesen keine wesentlichen Unterschiede auf, sodass diesbezüglich ein Einfluss der Spermienzahl pro Paillette weitestgehend ausgeschlossen werden kann. Demgegenüber beurteilten PEÑA und LINDE-FORSBERG (2000b) 100 x 10^6 Spermien pro Paillette als vorteilhaft in Bezug auf die Spermienmotilität im aufgetauten Sperma. Auch die Überlebensdauer der aufgetauten Spermien nach Zusatz von Tris-Puffer (Verhältnis 1:4) war am längsten. Die Autoren konnten zeigen, dass mit steigender Spermienzahl in der Paillette (25 x 10^6, 50 x 10^6, 100 x 10^6, 200 x 10^6) die Anzahl akrosomreagierter Spermien zunahm. Dieser Effekt führte zu der Vermutung, dass Enzyme und Abfallprodukte der zerstörten Akrosome Schädigungen der anderen Samenzellen hervorriefen. Allerdings sind die Ergebnisse der o.g. Studie und der eigenen Untersuchungen aufgrund

unterschiedlicher Verfahrensschritte bei der Tiefgefrierkonservierung nur bedingt vergleichbar. So zentrifugierten PEÑA und LINDE- FORSBERG (2000b) das Sperma mit 700 x g für 8 Min. und äquilibrierten den Samen vor dem Tiefgefrieren für 60 Minuten.

Wie BELALA et al. (2016) zeigten, kann schon die Dauer der Äquilibrierung die Qualität des aufgetauten Spermas beeinflussen. Sowohl bei Verwendung eines 6%igen LDL Verdünners als auch eines Verdünners auf Eidotterbasis war die Spermienmotilität im aufgetauten Sperma deutlich besser nach 6-stündiger Äqulilibrierung bei Kühlschranktemperatur im Vergleich zu kürzeren Anpassungszeiten.

Allerdings stellt sich hier die Frage, wie eine Äquilibrierungszeit von 6 Stunden nach Samenentnahme, -untersuchung und –verdünnung in den Praxis- und Laboralltag integriert werden kann. Außerdem wird in vielen Studien auf Vorgänge zurückgegriffen, die lediglich auf empirischen Erfahrungen der jeweiligen Forschungsgruppe basieren. So hat sich in einigen Studien die Verdünnung des Spermas auf 100 x 10^6 Spermien/ml durchgesetzt (ANDERSEN 1975, STRÖM et al. 1997) ohne diese zu überprüfen.

Die Überlebensfähigkeit von aufgetauten Spermien wurde in der vorliegenden Studie nicht untersucht. Hier wären ggf. zusätzliche interessante Hinweise bezüglich der Erhaltung der Motilität und der Akrosom- und Plasmamembranintegrität bei mehrstündiger Lagerung bzw. Inkubation bei Körpertemperatur zu erwarten. Desweiteren liegen bisher keine Daten über Veränderungen des MMP von Hundespermatozoen im Verlauf der Tiefgefrierkonservierung und nach dem Auftauen sowie bei anschließender Lagerung vor. Erste diesbezügliche Hinweise liefern die Vorversuche der vorliegenden Studie durch die Einbeziehung des MMP in die zur Bewertung der Verfahrensschritte herangezogenen spermatologischen Parameter, auch wenn diese zunächst an einer relativ geringen Probenzahl gepoolten Spermas gewonnen wurden.

5.5 Studienabschnitt II

Im zweiten Teil dieser Studie wurde je ein Ejakulat von 27 Rüden kryokonserviert. Die Ejakulatgewinnung und die spermatologische Basisuntersuchung erfolgten im Rahmen einer Zuchttauglichkeitsuntersuchung an der reproduktionsmedizinischen Einheit der Kliniken. Von diesen Hunden waren n=13 jünger als 48 Monate und n=14 Rüden älter als 48 Monate. Die Ejakulatbeschaffenheit von 20 Rüden entsprach einer Normospermie, während die Ejakulate von sieben Rüden eine Teratozoospermie aufwiesen. Zwei dieser Hunde gehörten der Altersgruppe <48 Monate, fünf der Altersgruppe >48 Monate an.

Ziel dieses Studienabschnittes war es, neben dem Einfluss des Verdünnermediums individuelle Einflüsse auf die Tiefgefriertauglichkeit von Ejakulaten zu untersuchen. Diesbezüglich spielten das Alter der Tiere und die Beschaffenheit des Nativspermas als Ausgangsmaterial (Normospermie, Teratozoospermie) eine Rolle. Die Tiefgefrierkonservierung erfolgte in Anlehnung an die Ergebnisse aus den Vorversuchen (Studienabschnitt I) nach Zentrifugation der spermienreichen Ejakulatfraktion bei 700 x g für 5 Min. vergleichend mit dem Tris-Eidotter Verdünner und dem LDL Verdünner. Die Spermienkonzentration wurde auf 100 x 10^6/ml eingestellt, so dass sich in einer Paillette (0,5 ml) 50 x 10^6 Spermien befanden.

5.5.1. Verdünnervergleich

Wie bereits im Studienabschnitt I zu beobachten war, wurden die in den LDL Verdünner gelegten Erwartungen auch bei Anwendung für die Tiefgefrierkonservierung individueller Ejakulate nicht erfüllt. Dagegen wird in verschiedenen Publikationen über eine signifikante Verbesserung der Samenqualität, insbesondere der Akrosomintegrität, und Spermienmotilität im aufgetauten Sperma von Hunden berichtet, welches mit einem LDL-haltigen Verdünner eingefroren worden war (VARELA JUNIOR et al. 2009, BENCHARIF et al. 2010, BELALA et al. 2016). Dieser Unterschied zeigte sich gerade auch im Vergleich mit Tris-Eidotter-haltigen Verdünnern. Dagegen war der phasenkontrastmikroskopisch beurteilte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien signifikant geringer in den mit dem LDL-Verdünner CaniFREEZE® verarbeiteten Samenproben (Tris-Eidotter Verdünner:

64,8 ±9,8%; LDL Verdünner: 43,5 ±17,5%). Die computergestützte Motilitätsanalyse erbrachte keinen entsprechend deutlichen Unterschied, doch waren die Anteile insgesamt motiler und progressiv motiler Spermien für beide Verdünner auf identischem Niveau (Mot: Tris-Ei: 26,7 ± 14,7%, LDL: 29,7 ± 14,4 %; PMot: Tris-Ei: 18,6 ± 14,1%, LDL: 21,8 ± 14,2). Hier kommt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine unterschiedliche Verdünnerakzeptanz der Spermien individueller Rüden zum Ausdruck. So betrug der mikroskopisch geschätzte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im aufgetauten Sperma des Rüden 5 (Beagle, 32 Monate) für den Tris-Eidotter Verdünner 75% und mit dem LDL Verdünner 70%. Die mittels CASA gemessene Gesamtmotilität lag bei diesem Rüden für den Tris-Eidotter Verdünner bei 32,2% und für den LDL Verdünner bei 51,1% und damit deutlich höher. Im Gegensatz dazu waren beim Rüden 8 (Dt. Langhaar, 69 Monate) die mikroskopisch und mittels CASA bestimmten Motilitätswerte für den Tris- Eidotter höher als für den LDL Verdünner (mikroskopisch: Tris-Eidotter - 80%, LDL - 75%; CASA: Tris-Eidotter - : 63,7%, LDL - 30,3%). Die Ergebnisse der einzelnen Rüden unterstreichen außerdem die höhere Messgenauigkeit des CASAs durch Erfassung der einzelnen Spermien und Verfolgung ihrer Wege. Die Mehrzahl der publizierten Studien, in denen auch CASA Systeme eingesetzt werden, führen den Vergleich von Verdünnern mit gepooltem Sperma durch oder mit mehreren Einzelejakulaten einer kleinen Anzahl von Samenspendern, so dass individuelle Faktoren allenfalls geringfügig zum Tragen kommen.

Auch die mithilfe des CASA SpermVision® gemessenen Spermienbewegungsparameter VCL, VAP und LIN wiesen Verdünner-abhängige Unterschiede auf. Spermien, der mit dem kommerziellen LDL Verdünner eingefroren wurden, zeigten nach dem Auftauen eine signifikant höhere kurvolineare Geschwindigkeit (VCL) bei geringerer Linearität. Die Geschwindigkeit über die durchschnittliche Bahn (VAP) lag dagegen für beide Verdünner einheitlich zwischen 61 und 62 µm/sec. Die schnellere VCL der mit dem LDL Verdünner eingefrorenen Spermien kann Merkmal einer Hyperaktivierung sein. Diese wird von VERSTEGEN et al. (2002) als positives Kriterium im Hinblick auf die Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen gewertet. Allerdings sollten die Hyperaktivierung und die damit

einhergehende Kapazitation der Spermien erst im weiblichen Genitaltrakt stattfinden, und kann somit auch Anzeichen eines hohen Anteils an kapazitierten und akrosomgeschädigten Spermien sein. Dagegen spricht jedoch der in den mit dem LDL Verdünner versetzten Spermaproben signifikant geringere Anteil an Spermien mit geschädigten Kopfkappen (mikroskopisch beurteilt 37,6 ±18,2%) im Vergleich zu den mit dem Tris-Eidotter Verdünner eingefrorenen Spermien (46,3 ±13,5%). Ebenso war der mittels Durchflusszytometer gemessene Anteil an Spermien mit Akrosom- und Plasmamembrandefekten (Q2) geringer, wenn der LDL Verdünner zum Einsatz kam. Demgegenüber konnten BENCHARIF et al. (2010) im aufgetauten Sperma keinen Unterschied zwischen der Akrosombeschaffenheit der mittels Tris-Eidotter und LDL Verdünner eingefrorenen Spermien feststellen. Allerdings wurden die Proben in dieser Studie nicht mittels Durchflusszytometer , sondern mikroskopisch in mit Spermac® gefärbten Spermienausstrichen ausgewertet.

Bei Betrachtung des aufgetauten Spermas einzelner Rüden waren auch bei den akrosom-geschädigten Spermien deutliche individuelle Unterschiede zu beobachten. So wurde bei Rüde 9 (Dt. Langhaar, 30 Monate, Normospermie) ein deutlich höherer Anteil an Spermien mit geschädigtem Akrosom im mit dem LDL Verdünner eingefrorenen Sperma (93%) im Vergleich zu den mit dem Tris-Eidotter verarbeiteten Proben (52%) festgestellt. Damit scheint bei diesem Tier der Tris-Eidotter Verdünner eine wesentlich nachhaltigere kryoprotektive Wirkung zu entfalten als der LDL Verdünner, obwohl beiden das klassische Kryoprotektivum Glycerol in identischer Konzentration zugefügt worden war. Außerdem lag der mikroskopisch geschätzte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien für den LDL Verdünner bei lediglich 20%, für den Tris-Eidotter Verdünner bei 60%. Parallel laufende Ergebnisse erbrachte auch die Motilitätsbestimmung mittels CASA (Mot: Tris-Eidotter: 27,4%, LDL:15,8%). Interessant ist ebenfalls die Messung des MMP, da auch hier der Wert unter Verwendung des LDL Verdünners (50,2%) niedriger ist als unter Verwendung des Tris-Eidotter Verdünners (77,8%). Die aufgetauten Spermien des Rüden 22 (Irish Setter, 48 Monate, Normospermie) zeigten dagegen einen geringeren Anteil an akrosomal geschädigten Spermien bei den mit LDL Verdünner eingefrorenen Spermien (34%) verglichen mit den Tris-Eidotter verdünnten Proben (62%). Der

subjektiv beurteilte Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien lag bei diesem Rüden bei Verdünnung mit Tris-Eidotter (60%) nur geringfügig über dem in den mit LDL Verdünner versetzten Vergleichsproben (50%). Davon abweichend waren die mittels CASA gemessenen Werte für den Gesamtanteil motiler Spermien bei Verwendung des LDL Verdünners höher (42,8%) als nach Verdünnung mit dem Tris-Eidotter Medium (17,1%). Die Messung des MMP zeigte in diesem Fall kaum einen Unterschied (Tris-Eidotter: 68,3%, LDL: 65,8%). Diese beiden Beispiele (Tiefgefrierkonservierung von Ejakulaten mit physiologischer Ausgangsbeschaffenheit; Alter der Samenspender ≤48 Monate) verdeutlichen die individuellen Reaktionen der Spermien auf die Art der Konservierung, in diesem Fall des verwendeten Verdünners, und damit auf die Qualität des aufgetauten Spermas und seiner Befruchtungsfähigkeit. Dabei muss auch hier die Frage gestellt werden, ob – wie in der Routine üblich - in erster Linie die Spermienmotilität als Kriterium für die zu erwartende Befruchtungsfähigkeit verwendet wird, oder diese Rolle eher der Akrosom- und Plasmamembranintegrität zukommt. Für die praktische Anwendung der Tiefgefrierkonservierung resultiert aus diesem Ergebnis die Anregung, insbesondere bei bestehender Normospermie das erste Ejakulat entweder vergleichend mit zwei Verdünnern einzufrieren und für weitere Ejakulate den besser geeigneten Verdünner zu verwenden oder im Falle eines unbefriedigenden Auftauergebnisses für das nächste Ejakulat einen anderen Verdünner zu erproben.

Das Alter der Rüden zeigte weder bezüglich der Motilität noch der anderen Auftauergebnisse signifikante Unterschiede zur Gruppe der jungen Rüden. Allerdings konnte bezüglich der kurvolinearen Geschwindigkeit (VCL) der Spermien eine negative Korrelation zum Alter der Rüden in Monaten nachgewiesen werden. Je älter also die Rüden waren, desto niedriger war die im CASA gemessene VCL der Spermien. So könnte man zum Beispiel die Auftauergebnisse älterer Rüden, die nachweislich eine geringere kurvolineare Geschwindigkeit ihrer Spermien haben, mit gezieltem Einsatz des LDL- Verdünners verbessern. Die signifikant verbesserte VCL konnten auch BENCHARIF et al. (2010) bei Einsatz des LDL- Verdünners nachweisen. Da in dieser Studie aber insgesamt nur zwei Rüden älter als 7 Jahre

waren, sollten die Ergebnisse bezüglich der Altersunterschiede differenziert bewertet werden.

Ebenso wenig ließ sich ein Einfluss des Alters auf die Auftauergebnisse der Spermienmembranintegrität oder das mitochondriale Potential feststellen. In Folgestudien wäre eine objektive Erfassung der Tiefgefriertauglichkeit insbesondere von Rüden über 7 Jahren interessant. Da diese Gruppe Patienten im Klinikalltag besonders häufig zur Samentiefgefrierung vorstellig wird und trotz einer Normospermie im Nativejakulat oft das Sperma aufgrund hochgradiger Mängel nicht zu Besamungen genutzt werden kann.

Insgesamt lässt sich durch die in dieser Studie ermittelten Ergebnisse im Vergleich der beiden Verdünner keine eindeutige Empfehlung aussprechen. Der Tris-Eidotter Verdünner konnte nach dem Auftauen mikroskopisch eine eindeutig bessere Motilität aufweisen, zeigte aber in Motilitätsmessungen des CASA keinen signifikanten Unterschied zum LDL- Verdünner. So steht zur Debatte, ob die Messungen am CASA durch Erfassung der einzelnen Spermien, eine deutlich höhere Messgenauigkeit aufweisen oder durch eine vorherige Inkubation die Werte am CASA für den Tris-Eidotter Verdünner anders ausfielen. So kam es meist nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 38°C vor den CASA Messungen schon zu einer besseren Beweglichkeit der LDL- verdünnten Spermien. Diese Vermutung könnte in einem nachfolgenden Versuch zur Langlebigkeit von LDL- verdünntem TG- Samen evaluiert werden. Spermien bewegten sich durchschnittlich, wenn sie mit LDL verdünnt wurden, mit einer höheren kurvolinearen Geschwindigkeit (VCL). Ein Vorteil des LDL- Verdünners waren die durchschnittlich besseren Werte für Samenzellveränderungen nach dem TG- Prozess. Es zeigten sich sowohl mikroskopisch durchschnittlich weniger Kopfkappenveränderungen, als auch weniger Akrosom- und Plasmamembranschäden im Durchflusszytometer (Q2). Das impliziert das der LDL einen besseren kryoprotektiven Effekt erzielt als der Tris-Eidotter Verdünner. PACE u. GRAHAM (1974) haben erstmals den nachteiligen Effekt von Granula im Eidotter auf die Spermien beim Tiefgefrierprozess nachgewiesen. Auch andere Bestandteile des Dotters, die durch Extraktion bei Herstellung des LDL

Verdünners eliminiert werden, könnten für diesen vorteilhaften Effekt verantwortlich sein. Demnach könnte auch diesbezüglich ein gezielter Einsatz des LDL- Verdünners bei Rüden mit einem höheren Anteil Akrosom- oder Plasmamembran geschädigter Spermien vorteilhafte Auftau-Ergebnisse bringen. Ein Verdünnereinfluss auf das Mitochondrienmembranpotential konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Die Werte mit 71,5 ± 10,3% für den LDL Verdünner und 72,5 ± 13,7 für den Tris-Eidotter Verdünner waren nahezu identisch.

Im Hinblick auf die Messungen des Mitochondrienmembranpotentials waren in der vorliegenden Studie keine Korrelationen zur Motilität oder Bewegungsform/Geschwindigkeit der Spermien feststellbar. Dagegen fanden VOLPE et al. (2009)eine positive Korrelation zwischen Spermien mit hohem MMP und den Anteilen motiler und plasmamembranintakter Spermien sowie der Spermiengeschwindigkeit (VAP). Allerdings wurden die JC-1 gefärbten Spermien in dieser Studie nicht durchflusszytometrisch detektiert, sondern mittels Fluoreszenzmikroskopie durch Evaluierung von 200 Samenzellen pro Probe ausgezählt. Aufgrund des Fehlens jeglicher Korrelationen zwischen MMP und Motilitäts- oder Spermienmembranparametern erscheint die Eignung des MMP zur Beurteilung von Verfahrensschritten im Rahmen der Spermakonservierung und der Befruchtungsfähigkeit von Hundespermien fraglich.

5.6 Messung mittels computergestützter Analyse Verfahren

Die vorliegende Studie und insbesondere der Einsatz des partikelfreien LDL Verdünners richtete sich auch auf die Verbesserung der Anwendung computergestützter Analyseverfahren im Rahmen der Tiefgefrierkonservierung von Hundesperma. So wird von SMITH und ENGLAND (2001) sowie von RIJSSELAERE et al. (2005) auf den negativen Einfluss von Eidotterpartikeln auf die Messungen mittels CASA und Durchflusszytometer hingewiesen. Die Extraktion der Lipoproteine aus dem Eidotter dient unter anderem auch der Reduktion der Partikeldichte

(MOUSSA et al. 2002). In der vorliegenden Studie wurden die Partikel durch Einstellungen der Analyseoptionen im CASA SpermVision® detektiert. Die Differenzierung der Partikel von Spermienköpfen gelang aufgrund ihrer runden Form und einer kreiselnden Bewegung. Dazu wurde eine Zusatzeinstellung („User Class 1“) gewählt, mit deren Hilfe die Ereignisse mit einer durchschnittlichen Kopfdrehung (AOC) über 12 ° Grad angezeigt wurden. So konnten Partikel mit einer den Spermienköpfen entsprechenden Größe relativ zuverlässig detektiert und aus der Motilitätsanalyse ausgeschlossen werden. Daraus erklärt sich zumindest teilweise, weshalb die Ergebnisse der computergestützten Motilitätsmessungen keinen besonderen Vorteil des partikelreduzierten LDL Verdünner erkennen ließen. Allerdings war unter dieser Voraussetzung der vorgenommene Vergleich der mit den beiden unterschiedlichen Verdünnern versetzten Proben methodisch gerechtfertigt.

Durchflusszytometrische Messungen nehmen mittlerweile einen festen Platz in den etablierten Methoden der Samenanalyse ein (PEÑA u. LINDE-FORSBERG 2000). Durch die Anwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 342 lassen sich Partikel von DNA-haltigen Zellen differenzieren und aus der Messung eliminieren. Bei gleichzeitiger Anwendung der zur Messung von Membranintegrität und MMP geeignetene Farbstoffe, färben sich DNA-haltige Zellen blau und können durch ein sog. Gating in die Messung aufgenommen werden. Vom Durchflusszytometer erfasste Ereignisse ohne DNA werden durch Setzen des Gates nicht in die Auswertung einbezogen. So war durch die Nutzung des Durchflusszytometers auch ein objektiver Vergleich morphologischer Spermienmembranparameter in den mit unterschiedlichen Verdünnern versetzten Samenproben gewährleistet. Allerdings muss bei Verwendung eines Eidotterhaltigen Verdünners mit einem erhöhten Risiko für Verunreinigung oder Verstopfung der Kanäle des Gerätes gerechnet werden. Aus diesem Grund sind nach jeder Messung mehrfach wiederholte Spülungen mit Aqua dest. erforderlich, um Schäden am Gerät zu verhindern und nachfolgende Messungen nicht zu beeinträchtigen.

Insgesamt hängt bezüglich des Einsatzes computergestützter Spermaanalyserverfahren die Erzielung repräsentativer Ergebnisse unabhängig vom verwendeten Verdünner von den vorgenommenen Einstellungen, Messverfahren und Färbetechniken ab. Dies betrifft insbesondere CASA-Systeme (IGUER-OUADA u. VERSTEGEN 2001, RIJSSELAERE et al. 2005, BEHR 2010). Aufgrund fehlender Standardeinstellungen, unterschiedlicher Analyzer mit variierender Software sowie laborspezifischer Gegebenheiten (u.a. Auswahl der Messkammern, Dauer der Inkubationszeit), steht für Hundesperma die Festlegung international einheitlicher Richtwerte, wie sie für Nutztierspezies seit langem bestehen, noch aus. Erst durch eine konsequente Standardisierung können die Vorteile der computergestützten Spermaanalyse, wie Objektivität und Wiederholbarkeit, Erfassung einer Vielzahl an Spermienparametern in einer großen Zellpopulation in relativ kurzer Zeit nutzbar werden. Hier dürfte jedoch nach wie vor der Schwerpunkt der Anwendung weniger in der tierärztlichen Praxis als vielmehr im Bereich der Forschung anzusiedeln sein. Diesbezüglich spielt auch die damit einhergehende, methodenabhängige Anhebung der Untersuchungskosten eine Rolle, zumal es sich in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle um die Untersuchung eines einzelnen Tieres handelt.

6 Zusammenfassung

Anke Baumeister:

Untersuchungen zur Optimierung der Kryokonservierung von Hundesperma mittels Zentrifugation und Verwendung eines Eidotter-freien Verdünners

Ziele der vorliegenden Studie waren 1. die Einbeziehung der Zentrifugation der nativen spermienreichen Ejakulatfraktion in das Prozedere der Tiefgefrierkonservierung von Hundesperma zur Vereinheitlichung des Seminalplasmaanteils und der Resuspension auf eine standardisierte Spermienkonzentration (10^6/ml) bzw. Spermienzahl pro 0,5 ml Paillette, 2. die Optimierung der Nutzung computergestützter Spermien-Analyseverfahren durch Anwendung eines Eidotter-freien und damit weitgehend Partikel-freien Low Density Lipoprotein (LDL) Verdünners, 3. die Erfassung individueller Einflüsse auf die Tiergefrierfähigkeit von Hundesperma. Dazu wurden im Studienabschnitt I in Vorversuchen an gepooltem Sperma von vier geschlechtsgesunden Beaglerüden mit Normospermie in drei Durchgängen Zentrifugationsprotokolle mit den Beschleunigungszahlen 300 x g, 700 x g und 1400 x g für jeweils für 5 und 10 Minuten vergleichend angewandt. Die resultierenden Samenpellets wurden je zur Hälfte mit Tris-Eidotter Verdünner und einem kommerziell erhältlichen LDL Verdünner (CaniFREEZE®, IMV Technologies) versetzt. Als Kryoprotektivum wurde einheitlich Glycerol in einer Endkonzentration von 6% zugefügt. Alle Proben wurden vor und nach der Kryokonservierung mit konventionellen und computergestützten Untersuchungsmethoden bezüglich der Spermienmotilität, der Akrosom- und Plasmamemembranintegrität und des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) analysiert. In einem weiteren Schritt wurde das Zentrifugationsprotokoll (700 x g für 5 Min), welches im ersten Vorversuch die besten Ergebnisse erbrachte, im Vergleich zu einem Einfrierprotokoll ohne Zentrifugation angewandt. Dabei wurden die Spermienpellets der zentrifugierten Proben auf eine Spermienkonzentration von 100

x 10^6 oder 200 x 10^6 resuspendiert, so dass in einer 0,5 ml Paillette 50 x10^6 bzw. 100 x 10^6 Spermien enthalten waren.
Im Studienabschnitt II wurden die Ejakulate von 27 Rüden unterschiedlicher Rassen, aufgeteilt in die Altersgruppen ≤48 Monate (n=13) und >48 Monate (n=14) und nach Ejakulatbeschaffenheit (Normospermie n=20, Teratozoospermie n=7) unter vergleichender Anwendung beider Verdünner nach Zentrifugation bei 700 x g für 5 Minuten tiefgefroren und entsprechend der Vorgehensweise im Studienabschnitt I untersucht. Für die computergestützte Motilitätsanalyse stand das SpermVision® System (Fa. Minitüb, Tiefenbach), für die Untersuchung der Spermienmembranen und des MMP das Durchflusszytometer Dako Galaxy® (Fa. Agilent Technologies, Santa Clara, USA) zur Verfügung.
Die Anwendung der Zentrifugationsprotokolle von 700 x g und 1400 x g resultierten in einem höheren Anteil an motilen Spermien im Vergleich zu 300 x g, die Zentrifugationszeit von 5 Minuten wirkte sich positiv auf die Integrität von Akrosom- und Plasmamembranen sowie auf das MMP aus. Auch im Vergleich zu nicht zentrifugierten Proben erwies sich die Zentrifugation in Bezug auf die Membranintegrität als vorteilhaft. Die Resuspension der Spermienpellets auf 100 x 10^6 Spermien/ml zeigte lediglich anhand eines signifikant höheren kurvolinearen Geschwindigkeit (VCL) der Samenzellen einen Vorteil gegenüber den höher konzentrierten Proben. In den Vorversuchen waren in den mit dem Tris-Eidotter Verdünner eingefrorenen Proben signifikant höhere Anteile insgesamt und progressiv motiler Spermien als in den mit LDL Verdünnern verarbeiteten Vergleichsproben nachweisbar, in welchen jedoch die VCL höher war. Der letztgenannte Befund war auch im Studienabschnitt II im Durchschnitt der 27 individuellen Spermaproben zu verzeichnen, dagegen waren die Anteile insgesamt und progressiv motiler Spermien für beide Verdünner annähernd identisch. Verdünner-abhängige Unterschiede ergaben sich für die Anteile an Spermien mit geschädigter Plasmamembran (Tris-Eidotter < LDL) und mit geschädigter Akrosom- und Plasmamembran (LDL < Tris-Eidotter), jedoch nicht für den Anteil an Spermien mit intakten Membranen.
Bezüglich des Alters der Samenspender zeigten die untersuchten Parameter im aufgetauten Sperma keine Unterschiede. Aus dem Einfrieren von Sperma mit einem

erhöhten Anteil an formabweichenden Spermien (Teratozoospermie) resultierte nach dem Auftauen ein signifikant geringerer Anteil an membranintakten Spermien als in den Vergleichsproben mit Normospermie gefunden wurden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist als erster Schritt nach Erstellung des Basisspermiogramms die Zentrifugation der nativen spermienreichen Fraktion bei 700 x g für 5 Minuten und die Resuspension auf 100 x 10^6 Spermien/ml im Sinne einer Standardisierung zu empfehlen. In der vorliegenden Studie hat sich das MMP nicht als geeigneter zusätzlicher Parameter zur Qualitätsbeurteilung von aufgetautem Hundesperma erwiesen.
Trotz der geringeren Partikelzahl im LDL Verdünner war bezüglich der Beurteilbarkeit des aufgetauten Spermas mittels computergestützter Verfahren kein Vorteil zum Tris-Eidotter Verdünner zu erkennen.

7 Summary

Anke Baumeister:

Investigations for optimizing cryopreservation of dog semen using centrifugation and an egg yolk-free semen extender.

The aims of the present study were 1. the use of centrifugation of the sperm-rich fraction in the procedure of dog semen cryopreservation in order to standardise the proportion of seminal plasma and the resuspension to a uniform sperm concentration (10^6/ml) or sperm number per 0.5 ml straw, 2. the improvement of computer-assisted sperm analysis by using an egg yolk-free and by this largely particle-free Low Density Lipoprotein (LDL) extender, 3. the recognition of individual influences on post-thaw quality of dog semen. For this, in study section I pooled semen of four healthy Beagle dogs with normospermia was used to evaluate centrifugation protocols using the accelerations 300 x g, 700 x g, and 1400 x g, each for 5 and 10 minutes. The resulting sperm pellets were resuspended in half with Tris-egg yolk-extender and a commercially available LDL extender (CaniFREEZE®, IMV Technologies). As cryoprotective agent glycerol was added at a final concentration of 6%. Before and after cryopreservation all samples were examined for sperm motility, integrity of acrosomal and plasma membranes and mitochondrial membrane potential (MMP) using conventional and computer-assisted methods. In a further step the centrifugation protocol (700 x g), which in the first preliminary test had turned out to bring the best results, was used in comparison with a freezing protocol working without centrifugation. There the sperm pellets of the centrifuged samples were resuspended in half to a sperm concentration of 100 x 10^6 and 200 x 10^6, resulting in 50 x 10^6 and 100 x 10^6 spermatozoa per 0.5 ml straw.

In study section II, ejaculates of 27 individual dogs of different breeds, divided into age groups ≤48 months (n=13) and >48 months (n=14) and semen quality groups (normospermia n=20, teratozoospermia n=7) were frozen by comparing the two diluents after centrifugation at 700 x g for 5 minutes and examination as described for

study section I. For computer-assisted motility analysis the SpermVision® system (Minitüb, Tiefenbach), for investigation of the sperm membranes and MMP the flowcytometer Dako Galaxy ® (Agilent, Santa Clara, USA) were available.
High speed centrifugation (700 x g and 1400 x g) resulted in a higher percentage of motile sperm compared with 300 x g. Centrifugation for 5 minutes had positive effects on the integrity of acrosomal membranes and plasma membranes as well as on the MMP. Centrifugation also proved to be advantageous regarding post-thaw membrane integrity compared with not centrifuged semen. Resuspension of sperm pellets to 100 x 10^6 sperm/ml proved better regarding curvilinear velocity (VCL) compared with the higher concentrated samples. In the preliminary tests semen samples diluted with Tris-egg yolk extender showed significantly higher proportions of overall motile and progressively motile spermatozoa than in the LDL diluted semen, which showed, however, higher VCL. The latter finding was also observed in study section II in the average of 27 individual semen samples, whereas the percentages of overall motile and progressively motile spermatozoa were almost identical for the two diluents. Extender related differences yielded for the proportions of spermatozoa with damaged plasma membrane (Tris-egg yolk < LDL) and with damaged acrosomal membrane and plasma membrane (LDL < Tris-egg yolk), but not for the percentage of membrane intact spermatozoa. No differences in the investigated sperm parameters were found regarding the semen donors´ age. Freezing of semen showing teratozoospermia resulted in a significantly lower post-thaw proportion of spermatozoa with intact membranes compared with the normospermia samples. Based on the present results, after ejaculate evaluation centrifugation of the native sperm rich fraction with 700 x g for 5 minutes and resuspension to 100 x 10^6 spermatozoa/ml is recommended regarding standardization. In the present investigation the MMP did not prove to be a suitable additional parameter for assessing the quality of frozen-thawed dog semen. Despite the lower amount of particles, the LDL extender was not advantageous over the Tris-egg yolk extender regarding the assessability of frozen-thawed semen using computer- assisted methods.

8 Literaturverzeichnis

ALHAIDER, A. K. u. P. F. WATSON (2006)
Cryopreservation of dog semen: The use of Equex STM Paste and its effect on plasma membrane fluidity.
Cryobiology 53, 420- 421

ALMLID, T. u. L. A. JOHNSON (1988)
Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws.
J. Anim. Sci. 66, 2899- 2905

AMANN, R. P. u. D. F. KATZ (2004)
Reflections on CASA after 25 years.
J. Androl. 25, 317- 325

AMIRAT, L., D. TAINTURIER, L. JEANNEAU, C. THORIN, O. GERARD, J.L. COURTENS u. M. ANTON (2004)
Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl1, a commercial egg yolk extender.
Theriogenology 61, 895- 907

ANDERSEN, K. (1972)
Fertility of frozen dog semen.
Acta Vet. Scand. 13, 128- 130

ANDERSEN, K. (1975)
Insemination with frozen dog semen based in a new insemination technique.
Zuchthyg. 10, 1- 4

BAUMGARTL, C. (1980)
Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über Veränderungen der Plasmamembran und Akrosomstruktur von Pferdespermien.
Tierärztliche Hochschule Hannover, Dissertation

BEDFORD, J. M. (1983)
Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals.
Biol. Reprod. 28, 108- 120

BEHR, M. (2010)
Standardisierung der computergestützten Spermienanalyse durch Einsatz einer E-Learning- Applikation
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
BELALA, R., L. AMIRAT-BRIAND, L. VINCIGUERRA, D. TAINTURIER, R. KAIDI, C. THORIN et al. (2016)
Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders.
Res. Vet. Sci. 106, 66-73

BENCHARIF, D., L. AMIRAT- BRIAND, A. GARAND, M. ANTON, E. SCHMITT, S. DESHERCES, G. DELHOMME, ML. LANGLOIS, P. BARRIERE, S. DESTRUMELLE, O. VERA-MUNOZ u. D. TAINTURIER (2010)
Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low density lipoprotein).
Anim. Reprod. Sci. 119, 305- 313

BERGERON, A., M. H. CRETE, Y. BRINDLE u. P. MANJUNATH (2004)
Low- density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane.
Biol. Reprod. 70, 708- 717

BERTHELSEN, J.G. (1981)
Vital staining of spermatozoa performed by the patient
Fertil. Steril. 35, 86- 88

BOYERS, S., R. DAVIS u. D. KATZ (1989)
Automated semen analysis.
Current problems in Obstetrics, Gynecology and Fertility 12, 167-200

BUHR, M. M. u. M. J. PETTITT (1996)
Frozen-thawed boar sperm: isolation of membranes and fluidity measurement.
In: JOHNSON, L. A., RATH, D. u. K. F. WEITZE (Hrsg.): Boar semen preservation. Proceedings of the 3rd International Congress on boar semen preservation, Mariensee.
Reprod. Dom. Anim. 1, Suppl., 147- 152

BURKMANN, L. J. (1991)
Discrimination between non hyperactivated and classical hyperactivated motility patterns in human spermatozoa using computerized analysis.
Fertil. Steril. 55, 363- 371

BUSCH, W. u. D. WABERSKI (2007)
Entwicklung der künstlichen Besamung.
In: BUSCH, W., D. WABERSKI (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren
Verlag Schattauer, Stuttgart, S. 1- 3

CANVIN, A. T. u. M. M. BUHR (1989)
Effect of temperature on the fluidity of boar sperm membranes.
J. Reprod. Fert. 85, 533- 540

CHEN, L.B. (1998)
Mitochondrial membrane potential in living cells.
Ann. Rev. Cell Biol. 4, 155- 181

COSSARIZZA, A., M. BACCARANI- CONTRI, G. KALASHNIKOVA u. C. FRANCESCHI (1993)
A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-Aggregate Forming Lipophilic Cation 5,5′,6,6′-Tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine Iodide (JC-1)
Biochem. Biophys. Res. Com.197, 40-45

CUMMINS, J.M. u. P. F. WOODALL (1985)
On mammalian sperm dimensions.
J. Reprod. Fert. 75, 153- 175

DE LEEUW, F. E., CHEN, H.-C., COLENBRANDER, B., u. A.J. VERKLEIJ (1990)
Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes.
Cryobiology 27, 171- 183

EILTS, B. (2005)
Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation.
Theriogenology 64, 685- 691

ENGLAND, G. C. W. (1993)
Cryopreservation of dog semen: a review
J. Reprod. Fert. Suppl. 47, 243- 255

ENGLAND, G. C. W. u. K.M. MILLAR (2008)
Ethics and role of AI with fresh and frozen semen in dogs.
Reprod. Dom. Anim. 43, Suppl. 2, 165- 171

ENGLAND, G. C. W. u. P. PONZIO (1996)
Comparison of the quality of frozen- thawed and cooled- rewarmed dog semen.
Theriogenology 46, 165- 171

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

EVENSON, D.P., Z. DARZYNKIEWICZ u. M. MALAMED (1982)
Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to sperm motility.
J. Histochem. Cytochem. 30, 279- 280

FARSTAD, W. u. K. ANDERSEN BERG (1989)
Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog.
J. Reprod. Fert. Suppl. 39, 289- 292

FERGUSON, J. M., J. P. RENTON, W. FARSTAD u. T. A. DOUGLAS (1989)
Insemination of beagle bitches with frozen semen.
J. Reprod. Fert. Suppl. 39, 293

FONTBONNE, A. u. F. BADINAND (1993)
Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine insemination of semen.
J. Reprod. Fert. Suppl. 47, 325- 327

FREDERICSSON, B. u. S. KINNARI (1975)
Vitality and morphology of human spermatozoa: Studies on the resistance to storage and centrifugation and on the removal of dead spermatozoa.
Andrologia 11, 135- 141

GADELLA, B. M., F. M. FLESCH, L.M.G. VAN GOLDE u. B. COLENBRANDER (1999)
Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization.
Vet. Quart. 21, 142- 146

GADELLA, B. M. u. J.P. EVANS (2011)
Membrane fusions during mammalian fertilization.
In: T. DITTMAR u. K.S. ZÄNKER (Hrsg.): Cell Fusion in Health and Disease.
Springer Science and Business Media, Berlin, S. 65- 80

GAMZU, R., H. YAVETZ, D. LICHTENBERG, G. PAZ, Z.T. HOMONNAI u. L. YOGEV (1994)
The effect of egg yolk on the binding capacity of human spermatozoa to zona pellucida.
Fertil. Steril. 62, 1221- 1225

GARNER, D.L., C.A. THOMAS, H.W. JOERG, J. DEJARNETTE u. C. MARSHALL (1997)
Assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine sperm.
Biol. Reprod. 57, 1401- 1406

GRAVANCE, C.G., GARNER, D. L., BAUMBER, J. u. B. BALL (2000)
Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1.
Theriogenology 53, 1691- 1703

GRÖPPER, B. (2004)
Einflüsse unterschiedlicher Verfahren zur Sperma-Tiefgefrierkonservierung auf Motilität und Membranintegrität von Hundespermien - Einsatz moderner spermatologischer Analyseverfahren.
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

GSCHWEND, H. J. (1986)
Untersuchungen über die Motilität von Bullenspermien, insbesondere über den Einfluss ihrer Geschwindigkeit auf das Befruchtungsvermögen.
München, Ludwig- Maximilian- Univ., Diss.

GÜNZEL, A.-R. (1986)
Zur Spermagewinnung, -beurteilung und –konservierung sowie Samenübertragung beim Hund.
Tierärztl. Praxis 14, S. 275- 282

GÜNZEL-APEL, A.-R., GÜNTHER, C., TERHAER, P., u. H. BADER (1993)
Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa.
J. Reprod. Fert. Suppl. 47, 271- 278

GÜNZEL-APEL, A.- R., TERHAER, P. u. D. WABERSKI (1994)
Hodendimensionen und Ejakulatbeschaffenheit fertiler Rüden unterschiedlicher Körpergewichte.
Kleintierpraxis 39, 483- 486

GÜNZEL- APEL, A.- R. (2007)
Künstliche Besamung beim Hund.
In: BUSCH, W. u. D. WABERSKI (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren.
Verlag Schattauer, Stuttgart, S. 262- 272

HAMMERSTEDT, R. H., J. K. GRAHAM u. J. NOLAN (1990)
Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive.
J. Androl. 11, 73- 88

HARRISON, R.A.P. u. S.E. VICKERS (1990)
Use of fluorescent probes to access membrane integrity in mammalian spermatozoa.
J. Reprod. Fert. 88, 343-352

HEUTELBECK, A., H. OLDENHOF, K. ROHN, G. MARTINSSON u. J. M. MORRELL (2014)
Use of density centrifugation for delayed cryopreservation of stallion sperm: perform sperm selection directly after collection or after storage?
Reprod. Dom. Anim. 70, 76- 83

HOFFMANN, B. (2003)
Künstliche Besamung (KB).
In: HOFFMANN, B. (Hrsg.): -Andrologie- Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung.
Verlag Lehmans Media, Berlin, S. 85- 106

HOLT, C, W.V. HOLT, H.D. MOORE, H.C. REED u. R.M. CURNOCK (1997)
Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials.
J. Androl. 18, 312-323

IGUER- OUADA, M. u. J.P. VERSTEGEN (2001)
Validation of the sperm quality analyzer (SQA) for dog semen analysis.
Theriogenology 55, 1143- 1158

JASKO, D.J., D.M. MORAN, M. FARLIN u. E. SQUIRES (1991)
Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled stallion semen.
Theriogenology 35, 1059- 1067

JIANG, Z., Q. W. LI, W. Y. LI, J. H. HU, H. W. ZAHO u. S. ZHANG (2007)
Effect of low density lipoprotein on DNA integrity of freezing- thawing boar sperm by neutral comet assay.
Anim. Reprod. Sci. 99, 1279- 1289

JØRGENSEN, N., J. AUGER, A. GIWERCMAN, D.S. IRVINE, T.K. JENSEN, P. JOUANNET, N. KEIDING, C. LEBON, E. MACDONALD, A. M. PEKURI, T. SCHEIKE, M. SIMONSEN, J. SUOMINEN u. N. E. SKAKKEBAEK (1997)
Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study.
Int. J. Androl. 20, 201-208

KAMPSCHMIDT, R., D. MAYER u. H. HERMAN (1953)
Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa.
J. Dairy Sci. 36, 733-742

KARRE, I., A. MEYER-LINDENBERG, C. URHAUSEN, A. BEINEKE, B. MEINECKE, M. PIECHOTTA, M. BEYERBACH u. A.-R. GÜNZEL-APEL (2012)
Distribution and viability of spermatozoa in the canine female genital tract during post- ovulatory oocyte maturation.
Acta Vet. Scand. 54;49

KASIMANICKAM, V., R. KASIMANICKAM, M. MEMON u. H. ROGERS (2012)
Effect of extenders on sperm mitochondrial membrane, plasma membrane and sperm kinetics during liquid storage of canine semen at 5 °C.
Anim. Reprod. Sci. 136, 139- 145

KATKOV, I.I. u. P. MAZUR (1998)
Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa.
J. Androl. 19, 232- 241

KAYACELEBI, H. (2014)
Morphologische und funktionelle Charakterisierung des caninen Nebenhodens unter Berücksichtigung klinisch-palpatorischer, sonographischer und spermatologischer Befunde.
Hannover, Tierärztl. Hochsch,, Diss.

KRAUSE, D. (1965):
Zur Fertilitätsuntersuchung beim Hund.
Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 72, 3-10

KODERLE, M, C. AURICH u. S. SCHÄFER-SOMI (2009)
The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog spermatozoa.
Theriogenology 72, 1215- 1220

KOOLMAN, J. u. K. H. RÖHM (1994)
Taschenatlas der Biochemie.
Verlag Georg Thieme, Stuttgart, S. 200- 214

KULKARNI, G., W. LEE, A. SETH u. C.A. MCCULLOCH (1998)
Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A-induced apoptosis.
Exp. Cell. Res. 245, 170- 178

LARSEN, R.E. (1980)
Infertility in the male dog.
In: MORROW, D.A. (Hrsg.), Current therapy in theriogenology 2
W.B. Saunders Company, Philadelphia, 646- 654

LEHNINGER, A.L., NELSON, D. L. u. M. M. COX (1994)
Prinzipien der Biochemie
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 33- 344

LEIDL, W, H. KATO, J. HOLLERRIEDER u. J. BRAUN (1993)
Analysis of sperm motility by computer assisted methods, with special consideration of in-vitro fertilization.
Mol. Reprod. Dev. 36, 224- 228

LEIDL, W., P. RIEMKE u. I. SCHRÖPPEL (1987)
Computer-controlled videomicrographic evaluation for the determination of sperm motility in the bull model.
Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 94, 461- 464

LENZI, A. (1997)
Computer- aided sperm analysis (CASA) 10 years later: a test- bed for the European scientific andrological community.
Int. J. Androl. 20, 1-2

LIEBICH, H.- G. (1993)
Funktionelle Histologie: Farbatlas und Kurzlehrbuch der mikroskopischen Anatomie der Haussäugetiere
Verlag Schattauer, Stuttgart, New York, S. 233- 254

LIU Y. T. u. P. K. WARME (1977)
Computerized evaluation of sperm cell motility.
Comput. Biomed. Res. 10, 127- 138

LOVE, C.C., J.A. THOMPSON, S.P. BRINSKO, S. RIGBY, T. BLANCHARD, V. LOWRY u. D. VARNER (2003)
Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry.
Theriogenology 60, 1127- 1138

MAHI, C. A. u. R. YANAGIMACHI (1976)
Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro.
J.Exp. Zool. 196, 189- 196

MARTINEZ- PASTOR, F., M. MATA- CAMPUZANO, M. ALVAREZ- RODRIGUEZ, M. ALVAREZ, L. ANEL u. P. DE PAZ (2010)
Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry.
Reprod. Dom. Anim. 45, 67- 78

MAXWELL, W.M. u. L.A. JOHNSON (1997)
Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation.
Theriogenology 48, 209- 219

MAXWELL, W.M., G.R. WELCH u. L.A. JOHNSON (1996)
Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma.
Reprod. Fert. Dev. 8, 1165- 1178

MAZUR, P. (1984)
Freezing of living cells: mechanism and implications.
Am. J. Physiol. 247, C125- C142

MIß, N. (2012)
Untersuchungen zur Optimierung der Kryokonservierung caniner Spermien unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Verdünner.
Giessen, Justus- Liebig Univ., Diss.

MONESI, V. (1976)
Spermatogenese und Spermatozoen. In: AUSTIN, C. R. und R.V. SHORT (Hrsg.): Fortpflanzungsbiologie der Säugetiere, 1. Keimzellen und Befruchtung,
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, S. 43-71

MORENO, D., D. BENCHARIF, L. AMIRAT- BRIAND, A. NEIRA, S. DESTRUMELLE u. D. TAINTURIER (2013)
Preliminary results: The advantages of Low-density lipoproteins for the cryopreservation of equine semen.
J. Equine Vet. Sci. 33, 1068- 1075

MORTIMER, D., E. F. CURTIS u. R. G. MILLER (1987)
Specific labeling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermium.
J. Reprod. Fert. 81, 127- 135

MORTON D. B. u. S.G. BRUCE (1989)
Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs.
J. Reprod. Fert. Suppl. 39, 311- 316

MOUSSA, M., V. MARTINET, A. TRIMECHE, D. TAINTURIER u. M. ANTON (2002)
Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen- thawed bull semen.
Theriogenology 57, 1695- 1706

OETTLÉ, E. E. (1986)
Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen.
Anim. Reprod. Sci. 12, 145- 150

OLAR, T. T., R. A. BOWEN u. B. W. PICKETT (1989)
Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws.
Theriogenology 31, 451- 461

ORTMANN, K. u. H. RODRIGUEZ- MARTINEZ (1994)
Membrane damage during dilution, cooling and freezing- thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags.
J. Vet. Med. 41, 37- 47

PACE, M.M. u. E. F. GRAHAM (1974)
Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing.
J. Anim. Sci. 39, 1144- 1149

PARKS, J. E. u. J. K. GRAHAM (1992)
Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes.
Theriogenology 38, 209- 222

PEÑA, A., A. JOHANNISSON u. C. LINDE- FORSBERG (2001)
Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation.
J. Reprod. Fert. Suppl. 57, 371- 376

PEÑA, A. u. C. LINDE- FORSBERG (2000a)
Effects of equex, one- or two- step dilution, and two freezing and thawing rates on post- thaw survival of dog spermatozoa.
Theriogenology 54, 859- 875

PEÑA, A. u. C. LINDE- FORSBERG (2000b)
Effects of spermatozoal concentration and post- thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa.
Theriogenology 54, 859- 875

PEÑA, A., A. JOHANNISSON u. C. LINDE-FORSBERG (1998)
Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry.
Theriogenology 50, 1211- 1220

PICKETT, B.W., J. SULLIVAN, M.S. BYERS, M.M. PACE u. E. REMMENGA (1975)
Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa.
Fertil. Steril. 26, 167- 173

QUINN, P. J. (1985)
A lipid phase separation model of low-temperature damage of biological membranes.
Cryobiology 22, 128- 146

REERS, M, T. THOMAS u. L. BO CHEN (1991)
J-Aggregate formation of carbocyanine as a quantitative fluorescence indicator of membrane potential.
Biochemistry 30, 4480- 4486

REID, R. A., J. MOYLE u. P. MITCHELL (1966)
Synthesis of adenosin triphosphate by a protonmotive force in rat liver mitochondria.
Nature 212, 257- 258

RIJSSELAERE, T., D. MAES, G. HOFLACK, A. DE KRUIF u. A. VAN SOOM (2007)
Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by Hamilton-Thorne-Analyser.
Reprod. Dom. Anim. 42, 143- 148

RIJSSELAERE, T., A. VAN SOOM, D. MAES u. A. DE KRUIF (2002)
Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa.
Theriogenology 57, 1669- 1681

RIJSSELAERE, T., A. VAN SOOM, S. THANGE, M. CORYN, D. MAES u. A. DE KRUIF (2005)
New techniques for the assessment of canine semen quality: a review.
Theriogenology 64, 706- 719

RODRIGUEZ- MARTINEZ, H., H. EKWALL u. C. LINDE- FORSBERG (1993)
Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog semen.
J. Reprod. Fert. Suppl. 47, 279- 285

ROTA, A., A. PEÑA, C. LINDE-FORSBERG, H. RODRIGUEZ-MARINEZ (1999)
In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chloretetracycline assay and changes in motility patterns.
Anim. Reprod. Sci. 57, 199- 215

ROTA, A., C. LINDE- FORSBERG, J. VANNOZZI, S. ROMAGNOLI u. H. RODRIGUEZ- MARTINEZ (1998)
Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates.
Reprod. Dom. Anim. 33, 355- 361

ROTA, A., C. MILANI u. S. ROMAGNOLI (2007)
Effect of post-thaw dilution with autologous prostatic fluid on dog semen motility and sperm acrosome status.
Theriogenology 67, 520- 525

ROTA, A., B. STÖM u. C. LINDE- FORSBERG (1995)
Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4° C.
Theriogenology 44, 885- 899

SCHÄFER- SOMI, S. u. C. AURICH (2007)
Use of a new computer- assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution.
Anim. Reprod. Sci. 102, 1-13

SCHÄFER-SOMI, S., S. KLUGER, E. KNAPP, D. KLEIN u. C. AURICH (2006)
Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa.
Theriogenology 66, 173- 182

SCHNORR, B. (1989)
Embryologie der Haustiere
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, S. 6-13

SCHÜLKE, B. (1991)
Grundstruktur der Spermienzelle und Biochemie des Spermas.
In: BUSCH, W., K. KÖHLE u. W. PETER (Hrsg.): Künstliche Besamung der Nutztiere.

SEAGER, S. W. J. (1969)
Successful pregnancies utilizing frozen dog semen.
A. I. Digest 17, 16

SHEKARRIZ, M., D.M. DEWIRE, A.J. THOMAS Jr. u. A. AGARWAL (1995)
A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species.
Eur. Urol. 28, 31-35

SINGER, S. J. u. G. L. NICOLSON (1972)
The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science 175, 720- 731

SMITH, S. C. u. G. C. England (2001)
Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured used computer-aided sperm analysis.
J. Reprod. Fert. Suppl. 57, 151- 159

STRÖM, B., A. ROTA u. C. LINDE- FORSBERG (1997)
In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation.
Theriogenology 48, 247- 256

SUAREZ, S. S., KATZ, D.F., OWEN D., ANDREW, J. u. R.L. POWELL (1991)
Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm.
Biol. Reprod. 44, 375-381

SUWA, Y. et al. (2009)
Individual fertility differences in the frozen-thawed spermatozoa among semen donors in the Labrador Retriever
Reprod. Med. Biol. 8, 125- 129

SZÁSZ, F., F. P. CHENG, A. MARKS, B. COLENBRANDER u. L. SOLTI (1997)
Induction of acrosome reaction in dog sperm by calcium ionophor.
Acta Vet. Hung. 45, 177- 187

THOMAS, P. G. A., R. LARSEN u. C. HAHN (1993)
A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen.
Theriogenology 40, 1199- 1205

TISCHLEDER, A. (2008)
Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials und der Apoptoserate peripherer mononukleärer Blutzellen HIV-positiver, bisher nicht antiretroviral behandelter Patienten.
München, Ludwig- Maximilian Univ., Diss.

TROIANO, L., A. GRANATA, A. COSSARIZZA, G. KALASHNIKOVA, R. BIANCHI, G. PINI, F. TROPEA, C. CARANI u. C. FRANCESCHI (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

VARELA JUNIOR, A. S., C. CORCINI, R. ULGUIM, M.V.F. ALVARENGA, I. BIANCHI, M. CORREA, T. LUCIA Jr. u. J. DESCHAMPS (2009)
Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen.
Anim. Reprod. Sci. 115, 323- 327

VERSTEGEN, J., M. IGUER- OUADA u. K. ONCLIN (2002)
Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice.
Theriogenology 57, 149- 179

VOLPE, S., R. LEOCI, G. AIUDI u. G.M. LACALANDRA (2009)
Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa.
Reprod. Dom. Anim. 44, 275- 278

WABERSKI, D., A. PETROUNKINA, K.F. WEITZE u. E. TÖPFER-PETERSEN (1999)
In-vitro- Beurteilung von Sperma zur Vorhersage der Fertilität.
Tierärztl. Prax. 27, 1-7

WATSON, P.F. (1995)
Recent developments and concepts in the cryoconservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function.
Reprod. Fertil. Dev. 7, 871-891

WATSON, P.F. (2000)
The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.
Anim. Reprod. Sci. 60-61, 481-492

WEISS, S, F. JANETT, D. BURGER, M. HÄSSIG u. R. THUN (2004)
Einfluss der Zentrifugationsmethode auf die Qualität und Kryokonservierung von Hengstsamen.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 6, 285- 293

WEITZE, K. F. (2001)
Assistierte Techniken
In: BUSCH, W. u. A. HOLZMANN (Hrsg.): Andrologie-Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren.
Verlag Schattauer, Stuttgart, S. 511- 517

WELSCH, U. (2010)
Männliche Geschlechtsorgane.
In: WELSCH, U u. T. DELLER (Hrsg.): Lehrbuch Histologie
Urban und Fischer Verlag, München, Elsevier GmbH, S. 406- 421

WILHELM, K. M., J. K. GRAHAM, E. L. SQUIRES (1996)
Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation and zona- free hamster oocyte penetration.
Theriogenology 46, 559- 578

WITTE, T. S. u. S. SCHÄFER-SOMI (2007)
Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa.
Anim. Reprod. Sci. 102, 181- 193

WOODALL P.F. u. I. P. JOHNSTONE (1988)
Dimensions and allometry of testes, epididymidis and spermatozoa in the domestic dog (Canis familiaris).
J. Reprod. Fert. 82, 603- 609

YANAGIMACHI R. (1994)
Mammalian fertilization. In: KNOBIL E. u. J.D. NEILD (Hrsg.)
The physiology of reproduction.
Raven Press, New York, S. 189- 317

ZIEGLER, R. (1991)
Computervideomikrographische Beurteilung von Hengstsperma vor und nach der Tiefgefrierkonservierung mit eidotterhaltigem Verdünner.
München, Ludwig- Maximilian Univ., Diss.

9 Anhang

9.1 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen 18x 18 mm: Fa. IDL, Nidderau

2%iger- Eosin-Farbstoff (mit Eosin-Dinatriumsalz, E6003): Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim

FITC- PNA (Fluoreszin- Peanut Agglutinin), CA 94010: Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA

Formolzitratlösung (mit Formaldehyd, 37%): Fa. Roth, Karlsruhe

Farbstoff Hoechst 342: Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim

Messkammern, grün (2x 12 µm): Fa. Leja, GN Nieuw- Vennep, Niederlande

Objektträger, 76x 26 mm, geputzt: Fa. IDL, Nidderau

PI (Propidiumjodid) P4170: Fa. Sigma- Aldrich, Steinheim

Pipettenspitzen, weiß (10 µl), gelb (100 µl) und blau (1000 µl): Fa. Eppendorf, Hamburg

Tulpengläser 8 ml, skaliert: Fa. LAT- Labor- und Analysentechnik, Garbsen

Zentrifugationsröhrchen 15 ml, 120 x17 mm mit Spitzboden: Fa. Sarstedt, Nümbrecht

9.2 Einstellungen CASA

Minitüb, SpermVision®-System, inkl. Software.

Kamera: TM- 6760CL (Fa. Jai, Yokohama, Japan)
Tubus: U-TVO. 63XC (Fa. Olympus, Hamburg)
Mikroskop: CX31 (Fa. Olympus, Hamburg)
Objektiv: 20x 0,50NH Ph1 (Fa. Olympus, Hamburg)

Pixel to µm-ratio: 273- 200
Probenschichtdicke: 12 µm
Spermienerkennung: 20- 100µm²
Punkte der Spermienerkennung: 11
Zählkriterien: 10 Felder oder 2000 Zellen

Framerate: 60 Bilder/Sek.

Level 1 Einstellung		**Level 2 Einstellung**	
Immotil (maroon)	AOC < 7.0	Hyperaktiv (aqua)	VCL>118 u. ALH>6.5 u. LIN<0.5
Lokal (gelb)	DSL < 8.0	Linear (blau)	STR>0.9 u. LIN>0.5
Progressiv (lime)	restliche	Nicht-linear (grün)	LIN<=0.5 u. STR<=0.9
		Kurvolinear (rot)	DAP/Radius>=3 u. LIN <0.5
		Nicht-Spermium/User-Class1 (schwarz)	AOC >12

Tab.5: Parameter zu Einteilung der Messereignisse nach BOYERS et al. (1989).

DCL (Distance Curved Line, µm)	Kurvolineare Distanz
DAP (Distance of Average Path, µm)	Mittlere Bahndistanz
DSL (Distance straight line, µm)	Lineare Distanz
VCL (Velocity Curved Line, µm/sec)	Kurvolineare Geschwindigkeit
VAP (Velocity Average Path, µm/sec)	Mittlere Bahngeschwindigkeit
VSL (Velocity Straight Line, µm/sec)	Lineare Geschwindigkeit
ALH (Amplitude of Lateral Head displacement, µm)	Amplitude des Kopfausschlages
BCF (Beat Cross Frequency, Hz)	Frequenz, mit der der Spermienkopf die Mitte des Pfades kreuzt
STR (Straightness, VSL/VAP, %)	Linearität der gemittelten Bahn
WOB (Wobble, VAP/VCL, %)	Abweichung der tatsächlichen Bahn von der gemittelten Bahn
LIN (Linearity, VSL/VCL, %)	Linearität der tatsächlichen Bahn
AOC (Average Orientation Change, Grad°)	Durchschnittlicher Richtungswechsel des Kopfes

9.3 Rezepte

Tris-Stammlösung:

Tris C4H11NO3	30,28 g
D-Fructose	12,5 g
Citronensäure H_2O	17,8 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

pH-Wert: 6,8; Osmolalität: 324 mOsm., steril filtriert. Portionierung und Lagerung bei -20 °C für spätere Verwendung.

Tris-Eidotter Verdünner:

80 ml Tris- Stammlösung
20 ml reiner Eidotter (absolut eiweißfrei)

Gut schwenken und durch einen Faltenfilter filtrieren.

6 % Glycerol zugeben bei der Spermaverabeitung zur Samentiefgefrierung

9.4 Ergebnistabellen

9.4.1 Studienabschnitt I - Vorversuch 1 zur Zentrifugation

Tab.6: Volumen des Überstandes, Spermienzahl im Überstand nach Zentrifugation mit 300, 700 und 1400 x g für 5 oder 10 Min. Mikroskopisch bestimmter Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien und Anteil an Spermien mit geschädigtem Akrosom im aufgetauten Sperma nach Zentrifugation mit 300, 700, oder 1400 x g für 5 oder 10 Min.) unter Anwendung eines Tris-Eidotter und eines LDL Verdünners. .

Zentrifugation		Ver-dünner	Volumen Überstand (ml)	Spermien-zahl Über-stand (x 10^6)	Vorwärts-bewegliche Spermien (mikr.)(%)	Geschädigte Akrosome (mikr.) (%)
300 x g	5 Min	Tris- Ei	1,6	33,1	60	39,5
		LDL	1,6	12,9	30	39,5
	10 Min	Tris-Ei	1,7	11,9	40	68,0
		LDL	1,7	13,3	20	51,0
700 x g	5 Min	Tris- Ei	1,8	4,2	60	45,0
		LDL	1,8	3,3	35	43,0
	10 Min	Tris- Ei	1,8	3,3	65	52,5
		LDL	1,8	5,5	30	66,0
1400 x g	5 Min	Tris-Ei	1,8	2,1	70	47,5
		LDL	1,7	3,2	35	49,0
	10 Min	Tris-Ei	1,7	0,9	70	45,5
		LDL	1,6	0,3	30	50,0

Tab. 7: Anteile insgesamt motiler (GMot.) und progressiv motiler (Mot.) Spermien sowie Spermiengeschwindigkeiten VAP und VCL und Linearität (LIN) im aufgetauten Sperma nach Zentrifugation mit 300 x g, 700 x g oder 1400 x g für 5 oder 10 Min. unter Anwendung eines Tris-Eidotter und eines LDL Verdünners.

Zentrifugation		Ver-dünner	Motile Spermien CASA (GMot.) (%)	Progressiv motile Spermien CASA (PMot.) (%)	VAP (µm/sec)	VCL (µm/sec)	LIN (%)
300 x g	5 Min	Tris- Ei	16,2	8,5	57,3	76,6	0,65
		LDL	17,6	10,4	62,5	100,3	0,53
	10 Min	Tris-Ei	15,6	7,6	57,8	77,2	0,66
		LDL	10,6	3,4	56,5	83,4	0,58
700 x g	5 Min	Tris- Ei	23,4	16,6	55,5	77,9	0,61
		LDL	20,7	11,3	59,6	95,4	0,51
	10 Min	Tris- Ei	35,9	27,0	69,5	91,7	0,68
		LDL	16,7	7,8	54,3	82,7	0,54
1400 x g	5 Min	Tris-Ei	41,8	32,4	67,1	88,1	0,67
		LDL	21,8	11,7	62,0	93,8	0,57
	10 Min	Tris-Ei	30,5	22,2	61,3	78,5	0,69
		LDL	17,6	8,8	59,7	95,9	0,52

Tab. 8: Spermienmembranstatus (Q1: plasmamembrandefekte Spermien, Q2: akrosom- und plasmamembrandefekte Spermien, Q3: akrosom- und plasmamembranintakte Spermien, Q4: akrosommembrandefekte Spermien) und Mitochondrienmembranpotential (MMP) im aufgetauten Sperma nach Zentrifugation mit 300 x g, 700 x g oder 1400 x g für 5 oder 10 Min. unter Anwendung eines Tris-Eidotter und eines LDL Verdünners.

Zentrifugation		Ver-dünner	Q1 (%)	Q2 (%)	Q3 (%)	Q4 (%)	MMP (%) Q2
300 x g	5 Min	Tris- Ei	19,9	29,8	49,2	1,1	86,5
		LDL	34,0	26,3	39,2	0,5	85,9
	10 Min	Tris-Ei	26,5	52,3	18,7	2,4	57,3
		LDL	40,2	38,1	21,4	0,4	49,6
700 x g	5 Min	Tris- Ei	20,5	34,4	43,6	1,6	84,6
		LDL	32,5	28,3	38,5	0,7	89,1
	10 Min	Tris- Ei	18,6	43,1	35,3	3,0	85,0
		LDL	18,5	38,8	39,7	3,0	85,7
1400 x g	5 Min	Tris-Ei	12,1	33,1	49,0	5,7	82,3
		LDL	37,3	29,7	32,4	0,6	84,3
	10 Min	Tris-Ei	19,6	31,4	48,1	0,9	78,6
		LDL	31,2	27,9	40,6	0,4	75,5

Tab.9: Zahl der Spermien im Überstand nach Zentrifugation, Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien im Phasenkontrastmikroskop, Anteile insgesamt motiler (GMot.) und progressiv motiler (Mot.) Spermien sowie Anteile der Spermien mit Akrosomschäden im aufgetauten Sperma nach Zentrifugation mit 300 x g, 700 x g oder 1400 x g ohne Berücksichtigung der Zentrifugationszeit und angewendeten Verdünner. Mittelwerte, Standardabweichung und Minimum-Maximum.

Beschleunigung		Spermien-zahl im Überstand (x 10^6)	Vorwärts-bewegliche Spermien (mikr.) (%)	Motile Spermien CASA (GMot.)(%)	Progressiv motile Spermien CASA (PMot.) (%)	geschädigte Akrosome (mikr.)(%)
300 x g n=4	$\bar{x}$	17,8	37,5	15,0	7,5	49,5
	±SD	10,2	17,1	3,1	2,9	13,5
	min-max	11,8- 33,1	20- 60	10,6- 17,6	3,4- 10,4	39,5- 68
700 x g n=4	$\bar{x}$	4,1	47,5	24,2	15,7	51,6
	±SD	1,0	17,6	8,3	8,4	10,4
	min-max	3,3- 5,5	30- 65	16,7- 35,9	7,8- 27,0	43- 66
1400 x g n=4	$\bar{x}$	1,6	51,3	27,9	18,8	48,0
	±SD	1,3	21,8	10,7	10,8	2,0
	min-max	0,3- 3,2	30- 70	17,6- 41,8	8,8- 32,4	45,5- 50

Tab. 10: Spermienmembranstatus (Q1: plasmamembrandefekte Spermien, Q2: akrosom- und plasmamembrandefekte Spermien, Q3: akrosom- und plasmamembranintakte Spermien, Q4: akrosommembrandefekte Spermien) und Mitochondrienmembranpotential (MMP) im aufgetauten Sperma nach Zentrifugation mit 300 x g, 700 x g oder 1400 x g ohne Berücksichtigung der Zentrifugationszeit und angewendeten Verdünner. Mittelwerte, Standardabweichung und Minimum-Maximum.

Beschleunigung		Q1 (%)	Q2 (%)	Q3 (%)	Q4 (%)	MMP (%) Q2
300 x g n=4	$\bar{x}$	30,2	36,6	32,1	1,1	69,8
	±SD	8,8	11,6	14,6	0,94	19,2
	min-max	19,9- 40,2	26,3- 52,3	18,7- 49,2	0,36- 2,43	49,6- 86,5
700 x g n=4	$\bar{x}$	22,5	36,2	39,3	2,07	86,1
	±SD	6,7	6,3	3,4	1,13	2,0
	min-max	18,5- 32,5	28,3- 43,1	35,3- 43,6	0,72- 2,03	84,6- 89,1
1400 x g n=4	$\bar{x}$	25,1	30,5	42,6	1,9	80,2
	±SD	11,3	2,3	7,7	2,53	3,9
	min-max	12,1- 37,3	27,9- 33,1	32,4- 49,0	0,37- 5,69	75,5- 84,3

Tab.11: Zahl der Spermien im Überstand nach Zentrifugation, Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien im Phasenkontrastmikroskop, Anteile insgesamt motiler (GMot.) und progressiv motiler (Mot.) Spermien sowie Anteile der Spermien mit Akrosomschäden im aufgetauten Sperma nach Zentrifugation mit Zentrifugationsdauer von 5 und 10 Min., ohne Berücksichtigung der Beschleunigungszahl (g) und der angewendeten Verdünner. Ergebnisse nach Zentrifugation und Auftauen. Mittelwerte, Standardabweichung und Minimum-Maximum.

Zentrifugations-dauer		Spermien-zahl im Überstand (x 10^6)	Vorwärts-bewegliche Spermien (mikr.) (%)	Motile Spermien CASA (GMot.)(%)	Progressiv motile Spermien CASA (PMot.) (%)	Geschädigte Akrosom (mikr.)(%)
5 Min n=6	$\bar{x}$	9,8	48,3	23,6	15,2	43,9
	±SD	12,1	16,9	9,3	8,9	4,0
	min-max	2,1-33,1	30- 70	16,2- 41,8	8,5- 32,4	35,5- 49,0
10 Min n=6	$\bar{x}$	5,9	42,5	21,2	12,8	55,5
	±SD	5,5	20,4	9,8	5,9	9,2
	min-max	0,3- 13,3	20- 70	10,6- 35,9	3,4- 27,0	45,5- 68,0

Tab.12: Spermienmembranstatus (Q1: plasmamembrandefekte Spermien, Q2: akrosom- und plasmamembrandefekte Spermien, Q3: akrosom- und plasmamembranintakte Spermien, Q4: akrosommembrandefekte Spermien) und Mitochondrienmembranpotential (MMP) im aufgetauten Sperma nach Zentrifugation mit einer Zentrifugationsdauer von 5 und 10 Min., ohne Berücksichtigung der Beschleunigungszahl (g) und angewendeten Verdünner. Mittelwerte, Standardabweichung und Minimum-Maximum.

Zentrifugations-dauer		Q1 (%)	Q2 (%)	Q3 (%)	Q4 (%)	MMP (%) Q2
5 Min n=6	$\bar{x}$	26,0	30,3	42,0	1,70	85,5
	±SD	9,9	3,0	6,6	1,99	2,3
	min-max	12,1- 37,3	26,3- 34,4	32,4- 49,2	0,5- 5,7	82,3- 89,1
10 Min n=6	$\bar{x}$	25,8	38,6	34,0	1,68	72,0
	±SD	8,7	8,7	11,6	1,27	15,0
	min-max	18,5- 40,2	27,9- 52,3	18,7- 48,1	0,4- 3,0	49,6- 85,7

9.4.2. Studienabschnitt I - Vorversuch 2: Vergleich zentrifugiert - nicht zentrifugiert

Tab.13: Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im Phasenkontrastmikroskop, Anteile insgesamt motiler (GMot.) und progressiv motiler (Mot.) Spermien sowie Spermiengeschwindigkeiten VAP und VCL und Linearität (LIN) und Spermien mit Akrosomschäden im aufgetauten Sperma bei zentrifugierten und nicht-zentrifugierten Split-Sample Proben, ohne Berücksichtigung der verwendeten Verdünner. Mittelwerte, Standardabweichung und Minimum-Maximum.

		Vorwärts-be-wegliche Spermien (mikr. %)	Motile Spermien (GMot.%)	Pro-gressiv motile Spermien (PMot.) (%)	VAP (µm/sec)	VCL (µm/sec)	LIN (%)	Ge-schädigte Akrosome (mikr.%)
zentrifugiert n=2	$\bar{x}$	47,5	25,2	17,1	65,9	96,3	0,61	43,0
	±SD	24,7	8,5	9,2	6,9	4,0	0,11	5,0
	min-max	30- 65	19,2-21,3	10,6-23,6	61,0-70,8	93,5-99,2	0,53-0,69	39,5- 46,5
nicht zentrifugiert n=2	$\bar{x}$	50,0	21,3	13,5	57,6	86,4	0,57	44,8
	±SD	14,1	9,9	8,8	3,1	2,4	0,02	5,8
	min-max	40- 60	14,3-28,3	7,3- 19,7	55,5-59,8	84,7-88,1	0,56-0,58	41,0- 48,5

Tab.14: Spermienmembranstatus (Q1: plasmamembrandefekte Spermien, Q2: akrosom- und plasmamembrandefekte Spermien, Q3: akrosom- und plasmamembranintakte Spermien, Q4: akrosommembrandefekte Spermien) und Mitochondrienmembranpotential (MMP) im aufgetauten Sperma bei zentrifugierten und nicht-zentrifugierten Split-Sample Proben, ohne Berücksichtigung der verwendeten Verdünner. Mittelwerte, Standardabweichung und Minimum-Maximum.

		Q1 (%)	Q2 (%)	Q3 (%)	Q4 (%)	MMP (%) Q2
zentrifugiert n=2	$\bar{x}$	28,4	22,9	47,8	1,01	66,1
	±SD	1,3	3,5	3,1	0,83	11,9
	min-max	27,5- 29,3	20,4- 25,4	45,5- 50,0	0,42- 1,60	57,7- 74,5
nicht zentrifugiert n=2	$\bar{x}$	26,4	33,6	38,1	1,89	68,5
	±SD	1,6	4,2	0,9	1,77	9,2
	min-max	25,3- 27,5	30,6-36,6	37,5- 38,1	0,64- 3,14	62,0- 75,0

9.4.3 Studienabschnitt I - Vorversuch 3: Vergleich der Spermienkonzentration nach Resuspension

Tab.15: Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im Phasenkontrastmikroskop, Anteile insgesamt motiler (GMot.) und progressiv motiler (Mot.) Spermien sowie Spermiengeschwindigkeiten VAP und VCL und Linearität (LIN) und Spermien mit Akrosomschäden im aufgetauten Spermabei Konzentration von 100 x 10^6 /ml (50 x10^6/Paillette) und 200 x 10^6/ml (100 x 10^6/Paillette). Ohne Berücksichtigung der verwendeten Verdünner. Mittelwerte, Standardabweichung und Minimum-Maximum.

Konzentration		Vorwärts-bewegliche Spermien (mikr.) (%)	Motile Spermien CASA (GMot.)(%)	Progressiv motile Spermien CASA (PMot.) (%)	VAP (µm/sec)	VCL (µm/sec)	LIN (%)	Geschädigte Akrosome (mikr.)(%)
100 x10^6 n=2	$\bar{x}$	47,5	25,2	17,1	65,9	96,3	0,61	43,0
	±SD	24,8	8,5	9,2	6,9	4,0	0,11	5,0
	min-max	30- 65	19,2- 31,3	10,6- 23,6	61,0-70,8	93,5-99,2	0,53-0,69	39,5- 46,5
200 x10^6 n=2	$\bar{x}$	25,0	12,9	5,2	49,4	74,8	0,56	48,8
	±SD	7,1	2,2	1,1	2,5	4,1	0,01	11,0
	min-max	20- 30	11,4- 14,5	4,4- 5,9	47,6-51,2	71,9-77,7	0,55-0,56	41- 56,5

Tab.16: Spermienmembranstatus (Q1: plasmamembrandefekte Spermien, Q2: akrosom- und plasmamembrandefekte Spermien, Q3: akrosom- und plasmamembranintakte Spermien, Q4: akrosommembrandefekte Spermien) und Mitochondrienmembranpotential (MMP) im aufgetauten Sperma bei bei Konzentration von 100 x 10^6 /ml (50 x10^6/Paillette) und 200 x 10^6/ml (100 x 10^6/Paillette). Ohne Berücksichtigung der verwendeten Verdünner. Mittelwerte, Standardabweichung und Minimum-Maximum.

Konzentration		Q1 (%)	Q2 (%)	Q3 (%)	Q4 (%)	MMP (%) Q2
100 x10^6 n=2	$\bar{x}$	28,4	22,9	47,8	1,01	66,1
	±SD	1,3	3,5	3,1	0,83	11,9
	min-max	27,5- 29,3	20,4- 25,4	45,6- 50,0	0,42- 1,6	57,7- 74,5
200 x10^6 n=2	$\bar{x}$	20,1	29,2	49,7	0,98	62,5
	±SD	5,4	1,9	7,2	0,07	12,4
	min-max	16,3- 23,9	27,9- 30,5	44,7- 54,8	0,93- 1,03	53,7- 71,2

9.4.4 Studienabschnitt II: Verdünnervergleich an 27 Rüdenejakulaten

Tab.17: Alter, Ejakulatvolumen, Spermiengesamtzahl, Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien imPhasenkontrastmikroskop, Anteil an Spermien mit geschädigter Plasmamembran (EOS, Eosingefärbt), Anteil an Spermien mit morphologischen Abweichungen (MAS) und Spermien mit verändertem Akrosom im Nativejakulat von 27 Rüden.

Rüde Nr.	Alter (Mon)	Volumen (ml)	Spermien-gesamt-zahl ($x10^6$)	Vorwärts-beweglicher Spermien (%)	EOS (%)	MAS (%)	Veränderte Akrosome (%)
1	31	14,7	935,2	90,0	9,0	9,0	2,5
2	82	14,6	1536,1	90,0	9,0	9,5	0,5
3	51	16,7	474,7	90,0	3,0	19,5	7,0
4	95	21,4	1208,6	80,0	7,0	15,5	1,5
5	32	29,0	1649,5	90,0	5,0	13,5	6,0
6	73	26,2	1414,8	90,0	8,0	11,0	3,0
7	17	7,9	1456,3	80,0	10,0	22,5	9,0
8	69	82,5	1312,8	90,0	8,0	51,0	3,5
9	30	26,4	2018,0	80,0	12,0	22,0	2,5
10	35	18,7	1304,5	85,0	10,0	16,5	2,0
11	49	52,7	1891,4	75,0	12,0	52,5	7,0
12	44	16,4	506,2	90,0	5,0	15,5	4,0
13	55	25,6	1722,7	85,0	5,0	19,5	3,5
14	57	18,2	653,4	90,0	3,0	11,0	1,0
15	33	43,4	900,3	80,0	16,0	46,5	6,5
16	28	18,0	1645,3	90,0	6,0	14,0	4,5
17	26	3,2	1429,7	75,0	11,0	18,0	4,5
18	34	28,6	1101,1	85,0	11,0	8,5	1,0
19	60	14,7	1055,0	75,0	14,0	15,0	3,5
20	114	29,0	474,4	80,0	13,0	77,5	15,5
21	33	20,1	521,7	90,0	7,0	7,0	1,0
22	48	78,1	1265,0	85,0	9,0	20,0	4,5
23	70	19,1	1399,8	90,0	6,0	8,5	0,0
24	14	15,1	1333,3	70,0	17,0	56,5	15,0
25	52	45,7	2048,5	60,0	17,0	37,5	6,5
26	41	14,7	1151,7	85,0	10,0	26,0	4,5
27	56	13,0	923,9	85,0	14,0	64,5	5,5

Tab.18: Anteile insgesamt motiler (GMot.) und progressiv motiler (PMot.) Spermien und Spermienmembranstatus (Q1: plasmamembrandefekte Spermien, Q2: akrosom- und plasmamembrandefekte Spermien, Q3: akrosom- und plasmamembranintakte Spermien, Q4: akrosommembrandefekte Spermien) sowie Mitochondrienmembranpotential (MMP)Ergebnisse der Untersuchungen des frisch verdünnten Samens von 27 Rüden unter Verwendung zweier Verdünner (Tris-Eidotter (1) und LDL (2)).

Rüde-Nr.	Ver-dünner	GMot. %	PMot %	Q1	Q2	Q3	Q4	MMP % Q2
1	1	92,2	90,0	11,8	2,0	85,1	1,1	50,2
	2	85,7	83,5	18,1	4,9	76,8	0,3	51,8
2	1	95,7	93,4	5,8	2,0	90,8	1,4	58,1
	2	94,5	93,5	8,0	1,9	88,8	1,3	51,8
3	1	89,5	84,6	8,8	2,9	87,6	0,7	50,3
	2	90,7	88,6	15,3	0,0	84,7	0,0	57,7
4	1	92,0	89,2	10,3	4,0	85,2	0,5	73,4
	2	88,6	85,7	17,2	4,8	77,4	0,6	69,4
5	1	88,7	86,4	11,8	3,6	84,4	0,2	80,0
	2	94,2	92,4	8,6	2,3	88,8	0,2	70,0
6	1	88,3	85,2	21,0	4,8	73,1	1,1	95,7
	2	92,7	90,7	12,3	4,2	83,3	0,2	97,0
7	1	86,3	82,7	4,4	4,4	88,3	3,0	85,9
	2	83,7	80,8	20,4	4,6	74,4	0,7	97,4
8	1	84,0	79,6	14,3	7,5	76,6	1,7	92,9
	2	80,2	76,9	16,8	6,1	76,0	1,2	93,4
9	1	82,8	78,5	6,8	10,0	80,0	3,2	90,4
	2	74,0	70,6	5,2	5,9	87,7	1,2	96,5
10	1	85,7	82,5	12,8	5,0	80,7	1,5	89,2
	2	91,5	88,4	11,9	4,2	83,4	0,6	95,3
11	1	73,3	67,8	7,3	18,8	40,0	34,0	86,0
	2	58,6	53,6	5,2	13,4	47,4	34,0	79,9
12	1	91,7	89,5	16,1	5,4	77,7	0,8	91,0
	2	90,6	88,1	22,9	10,3	65,2	1,7	81,1
13	1	62,0	58,3	20,5	5,5	73,4	0,7	85,6
	2	88,1	85,7	6,5	4,5	88,3	0,6	92,8
14	1	91,3	89,3	49,2	10,1	40,3	0,5	95,1
	2	93,0	90,8	42,8	4,0	53,0	0,2	96,3
15	1	69,7	61,8	9,7	6,1	83,4	0,8	88,7
	2	69,7	63,9	6,4	8,7	83,8	1,1	87,5

16	1	84,0	81,7	47,4	7,1	44,4	1,1	82,5
	2	87,4	83,9	13,0	6,6	79,4	1,1	80,9
17	1	83,4	80,0	10,4	8,0	80,1	1,5	85,3
	2	84,3	80,6	11,7	8,8	78,5	1,0	79,9
18	1	91,9	89,8	43,5	3,6	52,4	0,5	73,5
	2	91,0	88,5	7,6	1,8	90,5	0,1	87,0
19	1	89,9	86,1	10,0	3,8	85,5	0,7	88,2
	2	87,6	83,6	14,1	3,7	82,0	0,3	92,5
20	1	90,5	87,4	16,3	4,1	78,7	1,0	94,0
	2	81,5	77,8	16,7	3,4	79,4	0,5	96,3
21	1	91,3	88,9	12,9	2,1	84,7	0,3	86,3
	2	95,0	92,6	5,4	1,8	92,6	0,3	90,2
22	1	90,3	87,4	32,5	8,0	58,4	1,1	86,6
	2	90,0	86,8	7,1	4,3	88,0	0,7	93,2
23	1	92,6	89,6	7,1	2,1	90,1	0,6	83,4
	2	92,2	90,1	7,8	2,1	89,9	0,2	82,2
24	1	75,6	68,8	19,3	6,0	74,5	0,2	85,5
	2	71,1	64,8	18,4	5,3	76,1	0,2	84,2
25	1	63,2	54,8	38,6	10,2	50,3	0,9	78,2
	2	51,8	45,1	23,1	0,6	70,8	0,4	77,1
26	1	80,2	76,2	9,1	8,5	80,4	2,0	73,5
	2	85,6	81,7	18,6	14,9	65,1	1,4	87,2
27	1	73,0	66,8	17,6	9,2	72,7	0,5	58,1
	2	66,6	60,6	31,6	13,6	54,1	0,6	80,2

Tab. 19: Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im Phasenkontrastmikroskop, Anteile insgesamt motiler (GMot.) und progressiv motiler (Mot.) Spermien sowie Spermiengeschwindigkeiten VAP und VCL und Linearität (LIN) und Spermien mit Akrosomschäden im aufgetauten Sperma von 27 Rüden, verdünnt mit Tris-Eidotter Verdünner (1) oder LDL- Verdünner (2).

Rüde-Nr.	Ver-dünner	Vorwärts-bewegliche Spermien %	GMot. %	PMot. %	VAP	VCL	LIN	Geschädigte Akrosome
1	1	80	45,6	34,5	77,3	100,5	0,7	48,5
	2	55	32,3	23,6	81,0	110,7	0,7	22,5
2	1	60	17,0	7,6	57,0	78,6	0,6	45,5
	2	40	11,3	3,6	47,7	74,0	0,5	26,5
3	1	70	24,0	14,2	67,4	91,2	0,7	27,0
	2	60	25,6	16,7	68,9	102,5	0,6	29,5
4	1	65	30,9	21,2	66,5	96,4	0,6	35,5
	2	30	15,7	7,1	54,5	91,4	0,5	37,0
5	1	75	32,2	21,5	52,8	71,8	0,6	39,5
	2	70	51,1	44,3	82,4	114,7	0,6	35,0
6	1	60	8,2	1,3	38,9	58,5	0,6	48,5
	2	5	8,6	1,6	49,7	72,5	0,5	68,0
7	1	65	33,9	25,6	80,1	101,1	0,7	60,0
	2	45	34,7	25,8	68,7	105,6	0,5	57,5
8	1	80	63,7	54,8	80,1	101,8	0,9	59,0
	2	75	30,3	21,2	73,9	90,7	0,8	55,5
9	1	60	27,4	16,5	65,6	94,8	0,6	52,0
	2	20	15,8	6,6	41,9	67,0	0,5	93,0
10	1	65	30,7	22,6	74,9	105,7	0,6	61,5
	2	35	41,4	31,2	68,9	109,7	0,5	48,0
11	1	60	16,0	9,9	60,3	78,3	0,7	33,5
	2	30	22,4	14,6	55,9	85,2	0,5	14,5
12	1	65	11,9	6,0	63,4	88,0	0,7	51,0
	2	20	18,6	10,0	51,5	91,7	0,4	32,0
13	1	70	49,1	41,9	65,2	88,9	0,7	49,0
	2	50	39,1	29,2	54,6	82,9	0,6	29,5
14	1	65	13,8	5,9	49,9	74,3	0,6	34,5
	2	40	16,9	9,9	56,8	85,1	0,6	40,0
15	1	40	13,1	3,8	45,3	70,9	0,5	42,0

	2	30	17,3	11,4	60,3	93,4	0,6	20,0
16	1	70	46,5	39,5	64,0	85,6	0,7	25,5
	2	65	44,9	37,7	66,0	103,7	0,5	23,0
17	1	70	28,5	21,2	62,0	83,0	0,7	42,0
	2	40	20,4	14,0	54,9	93,3	0,5	26,5
18	1	70	57,4	48,0	74,5	98,3	0,7	29,0
	2	60	58,9	50,0	67,4	110,5	0,5	21,0
19	1	70	29,8	21,3	56,1	81,1	0,6	57,5
	2	70	52,4	44,4	70,5	104,8	0,6	29,5
20	1	60	17,9	10,0	39,1	63,7	0,5	57,5
	2	60	28,2	20,4	68,6	89,5	0,7	41,5
21	1	70	25,8	20,1	66,8	90,9	0,7	32,5
	2	50	56,9	49,2	72,7	104,9	0,6	22,0
22	1	60	17,1	9,6	55,6	76,1	0,6	62,0
	2	50	42,8	37,7	73,4	110,3	0,6	34,0
23	1	60	20,1	10,5	60,3	88,3	0,6	33,0
	2	30	22,3	12,0	51,7	80,2	0,5	24,5
24	1	65	18,2	9,1	54,3	96,7	0,5	62,5
	2	45	22,5	13,9	57,4	97,1	0,5	67,0
25	1	35	9,3	5,0	52,4	71,3	0,6	37,5
	2	20	16,7	11,2	51,9	80,5	0,5	37,5
26	1	70	16,6	10,6	68,7	91,6	0,7	42,5
	2	40	33,7	25,2	54,1	83,2	0,5	24,5
27	1	70	16,1	10,0	59,0	90,4	0,6	82,0
	2	40	21,5	15,7	63,5	111,2	0,5	54,5

Tab.20: Spermienmembranstatus (Q1: plasmamembrandefekte Spermien, Q2: akrosom- und plasmamembrandefekte Spermien, Q3: akrosom- und plasmamembranintakte Spermien, Q4: akrosommembrandefekte Spermien) sowie Mitochondrienmembranpotential (MMP) im aufgetauten Sperma von 27 Rüden. Verdünnt mit Tris- Eidotter Verdünner (1) oder LDL- Verdünner (2).

Rüde-Nr.	Ver-dünner	Q1	Q2	Q3	. Q4	MMP % Q2
1	1	7,6	33,0	57,1	2,3	82,3
	2	15,3	19,2	65,1	0,5	84,1
2	1	29,0	32,7	37,4	0,9	78,9
	2	21,1	15,2	63,1	0,6	74,5
3	1	6,4	27,5	54,4	11,6	56,9
	2	40,2	23,2	35,8	0,8	67,0
4	1	27,0	37,2	32,9	2,8	65,1
	2	32,2	18,7	48,5	0,6	57,0
5	1	12,8	30,7	54,5	1,8	71,9
	2	20,9	21,4	57,3	0,3	89,9
6	1	10,6	49,0	38,2	2,2	48,6
	2	7,8	50,0	40,9	1,4	45,9
7	1	13,8	37,0	48,2	1,0	53,1
	2	31,9	26,8	40,8	0,5	79,1
8	1	15,9	52,0	30,5	1,6	54,6
	2	22,5	33,1	42,2	2,2	71,3
9	1	10,5	41,2	44,8	3,5	77,8
	2	13,7	21,7	62,9	1,7	50,2
10	1	10,5	41,2	44,8	3,5	77,8
	2	13,7	21,7	62,9	1,7	50,2
11	1	3,4	35,2	25,6	35,9	88,7
	2	6,0	32,9	31,9	29,3	80,4
12	1	11,4	55,3	32,0	1,3	65,4
	2	21,9	25,1	52,8	0,3	87,1
13	1	11,7	74,7	12,8	0,8	81,0
	2	54,6	19,9	25,4	19,9	91,2
14	1	13,6	41,8	43,0	1,7	81,4
	2	38,4	37,1	23,5	1,0	65,0
15	1	34,5	34,2	27,0	4,3	63,5
	2	44,2	22,8	32,7	0,3	90,2
16	1	6,3	13,7	79,3	0,8	69,3
	2	11,1	9,4	78,6	0,9	62,5

17	1	29,4	46,5	23,1	1,0	62,0
	2	37,1	21,4	41,1	0,4	79,2
18	1	13,4	21,2	64,7	0,8	74,8
	2	21,7	15,5	62,4	0,3	75,0
19	1	14,3	59,4	24,4	1,9	75,6
	2	40,5	27,3	31,8	0,5	84,6
20	1	29,2	36,5	33,7	0,6	75,1
	2	44,0	17,8	37,7	0,4	46,5
21	1	2,3	3,2	94,2	0,3	67,8
	2	11,9	11,1	76,9	0,1	61,0
22	1	17,0	28,2	52,3	2,5	68,3
	2	31,8	28,8	38,8	0,6	65,8
23	1	5,5	25,3	68,0	1,2	73,6
	2	16,5	14,3	69,1	0,1	81,6
24	1	25,8	44,6	29,3	0,4	87,0
	2	35,9	40,1	23,8	0,3	81,1
25	1	26,5	48,1	25,0	0,4	75,9
	2	41,7	29,6	28,6	0,1	76,5
26	1	9,4	72,1	17,8	0,7	81,6
	2	13,3	61,9	22,4	2,4	80,6
27	1	26,1	54,2	19,7	0,1	73,2
	2	42,8	39,6	17,6	0,0	78,8

Danksagung:

An Erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Günzel- Apel bedanken. Für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas, die freundliche und herzliche Aufnahme am Institut für Reproduktionsmedizin und die stete Unterstützung in allen Bereichen, sowohl wissenschaftlich, als auch persönlich.

Herrn Dr. Beyerbach danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung und die Einweisung in die Welt der Statistik.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Dr. Karola Wolf! Meine liebe Karo, ich denke gerne an unsere gemeinsame Repro-Zeit und die vielen „typischen“ Erlebnisse, die man nirgendwo sonst hätte sammeln können. Ich danke dir für die große Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit und die lehrreiche Zeit unter deinen Fittichen.

Auch an meine Mit-Doktoranden der Hundeabteilung Franzi Schirmer und Franzi Werhahn-Beining geht ein großes Dankeschön. Ich habe immer gerne mit euch zusammen gearbeitet, Kaffee getrunken und gequatscht. Haltet die Ohren steif, auch ihr habt es bald geschafft.

In besonderer Weise muss hier die wunderbare Erika Schröder erwähnt werden, ohne die diese Studie nicht so hätte entstehen können. Vielen Dank für die Hilfe und die immer lieben Worte der Unterstützung. Ich denke gerne an unsere ausgeklügelte Teamarbeit zurück und vermisse schon fast unsere gemeinsame Zeit im Labor.

Ebenso allen anderen Mitarbeitern der Repro gilt mein Dank. Insbesondere Xuyen, Benita und Anne aus der Schweineabteilung für ihre Hilfe und Einführung bei CASA und Flow. Ohne euch hätte ich wahrscheinlich relativ schnell diese Arbeit aufgeben müssen. Auch Herrn Kirchner von Minitüb und Dr. Heiko Henning gilt mein Dank für eine sehr hilfreiche und informative Einführung in die Arbeit mit dem CASA SpermVision und die vielen Hilfestellungen bei kleinen Notfällen.

Desweiteren müssen hier all die netten Züchter, Züchter-Bekannten und Rüdenbesitzer genannt werden die mit ihren Rüden, auch wenn diese eigentlich nicht zum Zuchteinsatz genutzt werden, für diese Studie zu uns gekommen sind. Da möchte ich mich besonders bei der lieben Frau Ebeling und dem Kollegen Dr. Otzen bedanken, die immer noch mal den ein oder anderen Bekannten von sich für meine Studie begeistern konnten.

Meinen Mädels möchte ich danken für die unterstützenden Worte, ob persönlich oder telefonisch, die Weinabende und die tollen Stunden voller Freundschaft. Ganz besonders zu einer Zeit, die sich mit dieser Doktorarbeitszeit teilweise überschnitten hat, war ich unglaublich froh euch alle an meiner Seite zu wissen. Danke an Vani, mein Herz, Britta, Lara, Hanna, AC und Nora. Auch meiner allerliebsten Janina in Dortmund gilt mein Dank...jetzt habe ich endlich wieder mehr Zeit!

Zu guter Letzt ein großes Danke an meine Familie! Ohne meine Eltern hätte diese Arbeit so nicht entstehen können. Was sich schon allein aus reproduktionsbiologischer Sicht logisch erschließt. Ihr gebt mir immer Rückhalt und Unterstützung in jeder Lebenssituation! Ich danke euch dafür, dass ihr mir dieses Studium und auch diese Doktorarbeit ermöglicht habt. Ich kann nicht ausdrücken, wie froh ich bin euch zu haben, das gilt auch für meine kleine Schwester Maren, die mich immer mit ihrer positiven, lustigen Art aufzumuntern weiß. Es tut mir Leid, wenn ihr durch meine gesundheitlichen Entgleisungen so viele Sorgen hattet. Ich liebe euch und danke euch für Alles!