

**Einfluss der Handhabung auf die Variabilität in der Qualität  
kryokonservierten Spermas beim Bullen**

**INAUGURAL – DISSERTATION**

Zur Erlangung des Grades einer  
**Doktorin der Veterinärmedizin**  
**- Doctor medicinae veterinariae -**  
**( Dr. med. vet. )**

vorgelegt von  
**Duygu Calisici, geb. Karul**  
aus Ankara  
Hannover 2011

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Heinrich Bollwein  
Klinik für Rinder

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Bollwein

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Sieme

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2011

*Meinen Eltern, Opa und Omu*

*in Liebe und Dankbarkeit gewidmet*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>2. Literaturübersicht</b>	<b>8</b>
2.1 Spermaschädigungen bei der Verdünnung	8
2.2 Spermaschädigungen bei der Abkühlung	9
2.3 Spermaschädigungen beim Einfrieren	10
2.3.1 Einfluss auf die Plasmamembran	11
2.3.2 Einfluss auf das Akrosom	12
2.3.3 Einfluss auf den Zellkern	13
2.4 Schädigungen beim Auftauen	13
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
3.1 Bullen	15
3.2 Samengewinnung und Kryokonservierung	15
3.2.1 Besamungsstation der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover	15
3.2.2 Besamungsstation der Rinderzucht Schleswig-Holstein e.G. (RSH)	16
3.2.3 Besamungsstation des Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch (BVN)	16
3.3 Analyse der Spermaqualität	17
3.3.1 Durchflusszytometer	17
3.3.2 FITC-PNA/ PI-Färbung	17
3.3.3 Spermienchromatinstruktur-Assay (SCSA)	19
3.4 Temperaturmessungen	21
3.5 Versuchsablauf	22

<u>3.5.1 Einfluss des Zeitpunkts der Verdünnung und der Lagerung bis zur</u>	
<u>Abkühlung</u>	<u>22</u>
<u>3.5.2 Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit</u>	<u>23</u>
<u>3.5.3 Einfluss der Lokalisation der Pailletten im Einfriergerät</u>	<u>23</u>
<u>3.5.4 Einfluss der Anzahl der eingefrorenen Pailletten</u>	<u>25</u>
<u>3.5.5 Einfluss unterschiedlicher Auftaubedingungen</u>	<u>25</u>
<u>3.5.6 Einfluss der Entleerungsmethode der Pailletten</u>	<u>26</u>
<u>3.6 Statistische Auswertung</u>	<u>26</u>
<b><u>4 Ergebnisse</u></b>	<b><u>27</u></b>
<u>4.1 Einfluss des Zeitpunkts der Verdünnung und der Lagerung bis zur Abkühlung</u>	<u>27</u>
<u>4.2 Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit</u>	<u>28</u>
<u>4.3 Einfluss der Lokalisation der Pailletten im Einfriergerät</u>	<u>29</u>
<u>4.4 Einfluss der Anzahl der eingefrorenen Pailletten</u>	<u>32</u>
<u>4.5 Einfluss der Auftaubedingungen auf die Qualität kryokonservierten Spermas</u>	<u>32</u>
<u>4.6 Einfluss der Entleerungsmethode der Pailletten</u>	<u>34</u>
<b><u>5 Diskussion</u></b>	<b><u>35</u></b>
<u>5.1 Einfluss des Zeitpunkts der Verdünnung und der Lagerung bis zur Abkühlung</u>	<u>35</u>
<u>5.2 Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit</u>	<u>35</u>
<u>5.3 Einfluss der Lokalisation der Pailletten im Einfriergerät während der</u>	
<u>Kryokonservierung</u>	<u>36</u>
<u>5.4 Einfluss der Anzahl der eingefrorenen Pailletten</u>	<u>37</u>
<u>5.5 Einfluss der Auftaugeschwindigkeit auf die Spermaqualität</u>	<u>38</u>
<u>5.6 Einfluss der Entleerungsmethode der Pailletten auf die Spermaqualität</u>	<u>39</u>
<u>5.7 Schlussfolgerung</u>	<u>39</u>

<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>40</b>
<b>7. Summary</b>	<b>43</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>50</b>
9.1 Medien	50
9.2 Chemikalien	51
9.3 Fluochrome	52
9.4 Herstellung der Spermisuspensionen in Abhängigkeit von der Verdünnung	54
9.5 Geräte und Materialien	54

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C = Grad Celsius

Abb. = Abbildung

AO = Akridinorange

AR = Akrosomenreaktion

AS = Akrosomale Schädigung

Best.Nr. = Bestellnummer

BP = Band Pass Filter

bzw. = beziehungsweise

cm = Zentimeter

DFI = DNA-Fragmentationsindex

%DFI = prozentuale Anteil der DFI

DNA = Desoxiribonukleinsäure

et al. = et alii/aliae

Fa. = Firma

FITC = Fluoreszin-Isothiocyanat

FITC-PNA = Fluoreszein-Isothiocyanat - Peanut Agglutinin

FL = Fluoreszenzkanal

g = Gramm

h = Stunde

HG = Hohe Geschwindigkeit

l = Liter

LP = Long Pass Filter

M = Molar

max = Maximalwert



mg = Milligramm

min = Minimalwert

min = Minute

Mio = Million

ml = Milliliter

NG = Niedrige Geschwindigkeit

pH = potentia Hydrogenii

PI = Propidiumiodid

PMI = Plasmamembranintegrität

RiKli = Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

RSH = Rinderzucht Schleswig-Holstein e.G.

SCSA™ = Spermienchromatinstruktur Assay

SD = Standardabweichung

Tab. = Tabelle

VK = Variationskoeffizient

z. B. = zum Beispiel

µg = Mikrogramm

µl = Mikroliter



## **1. EINLEITUNG**

In der Rinderzucht hat die künstliche Besamung seit der Einführung der Kryokonservierung eine enorme Bedeutung bekommen. Sie ist seit Jahrzehnten die am häufigsten eingesetzte Biotechnologie und vorwiegend für den hohen Zuchtfortschritt beim Milchrind verantwortlich (Vishwanath und Shannon 2000).

Um befriedigende Trächtigkeitsraten zu erzielen, ist eine gute Qualität des eingesetzten Spermas eine unabdingbare Voraussetzung (Kastelic und Thundathil 2008). In Studien zur Kontrolle der Qualität des kryokonservierten Spermas auf Besamungsstationen hat sich jedoch gezeigt, dass es diesbezüglich hohe Variabilitäten gibt. Die Spermaqualität differierte nicht nur zwischen den Bullen und zwischen den Ejakulaten innerhalb der Bullen (Köß und Bollwein 2008, Swanson 1940), sondern überraschenderweise auch zwischen den Pailletten derselben Ejakulate (Bollwein et al. 2005). Bislang sind aber keine Studien aus der Literatur bekannt, bei denen die möglichen Ursachen für die Variabilität zwischen den Pailletten derselben Ejakulate untersucht wurden.

Es kann grundsätzlich bei allen im Rahmen der Kryokonservierung ablaufenden Prozesse, wie der Verdünnung, der Abkühlung (Watson 2000), dem Einfrieren (Parks und Graham 1992) sowie dem Auftauen (Salomon und Maxwell 1995) zur Schädigung der Spermien kommen.

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob die Variabilität in der Qualität kryokonservierten Spermas auf verfahrenstechnische Aspekte unmittelbar nach der Samengewinnung und -verdünnung, während des Abkühlens, des Einfrierens und Auftauens sowie des Entleerens der Pailletten zurückzuführen ist.

## **2. LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Spermaschädigung bei der Verdünnung**

Die intrauterine Applikation des Spermas ermöglicht eine starke Verdünnung der Ejakulate ohne negative Auswirkungen auf die Fertilität (Vishwanath und Shannon 2000). Die heute übliche Inseminationsdosis bei Bullensperma beträgt 60 bis 80 Millionen Spermien pro Milliliter (15 bis 20 Millionen Spermien pro Paillette) (Garner et al. 1997, Vishwanath und Shannon 2000). Eine Verdünnung der Spermien mit physiologischen und isotonischen Salzlösungen steigert die Motilität und verlängert die Lebensdauer der Spermien (Maxwell und Johnson 1999, Weitze 2001). Werden die Spermien allerdings zu stark verdünnt, gehen die Motilität, die metabolische Aktivität und somit das Fertilitätspotential verloren; der so genannte „Verdünnungseffekt“ setzt ein (Mann 1964). Hervorgerufen wird dieser Effekt offenbar durch den Verlust protektiver, im Seminalplasma enthaltener Substanzen (Harrison et al. 1982).

Wichtig für die Verträglichkeit des Verdünners sind dessen pH-Wert und die Pufferkapazität, die eine pH-Wertverschiebung, z.B. durch Stoffwechselprodukte der Spermien ausgelöst, verhindern sollen (Salamon und Maxwell 2000). Daneben muss ein geeignetes Verdünnermedium Schutz gegen schädliche Auswirkungen des Kälteschocks bieten, sowie Nährstoffe für Spermien und keimhemmende Substanzen bzw. Antibiotika enthalten (Mytzka 1988, Vishwanath und Shannon 2000).

Häufig werden lipoproteinhaltige Bestandteile oder auch Eigelb oder Magermilch den Verdünnern zugesetzt (Vishwanath und Shannon 2000). Die darin enthaltene Low Density Lipoprotein Fraktion (LDF) ist vermutlich für den Schutz der Spermienmembran vor Kälteschock verantwortlich (Bergeron et al. 2004). Es kommt wahrscheinlich zu einer schützenden Verbindung zwischen LDF und der Spermienmembran (Bergeron et al. 2004, Weitze 2001).

Der Zusatz tierischer Produkte zu Spermienverdünnern, wie z.B. Eigelb, ist aber wegen möglicher Variabilitäten in der Zusammensetzung schwierig zu standardisieren (Schlösser et al. 1995). Auch eine mikrobielle Kontamination der tierischen Bestandteile stellt ein Risiko für die Qualität eines Verdünnermediums dar (Bousseau et al. 1998). Als Alternative zu den tierischen Verdünnerzusätzen wurde daher in den letzten Jahren pflanzliches Sojabohnen-Lecithin anstelle des Eidotters verwendet. Einigen Studien zufolge scheint es im Vergleich zu Eidotter einen gleichwertigen kryoprotektiven Effekt zu haben (Gil et al. 2000, Herold et al. 2004).

## **2.2 Spermaschädigungen bei der Abkühlung**

Die höchsten Überlebensraten bei der Kryokonservierung von Spermien werden durch langsames Abkühlen (1-5°C/ Minute) von Körper- bzw. Raumtemperatur auf 4°C erreicht (Woods et al. 2004). Eine solche langsame Abkühlung reduziert die metabolische Zellaktivität und erhöht die Lebensdauer der Spermien (Mazur 1984). Eine schnellere Abkühlung zwischen 30 und 0 °C führt zu Zellschädigungen der Spermien, zum so genannten „Kälteschock“ (Kumar et al. 2003, Watson 2000, Woelders und Malva 1998).

Während einer schnellen Abkühlung zwischen 10 °C und 0 °C ist die Lebensfähigkeit von Bullenspermien beeinträchtigt (Watson 1995). Während der Abkühlung geht die Membran vom flüssigkristallinen in den Gelzustand über (Holt 2000). Die Veränderung von Lipid- und Proteinanordnung in der Plasmamembran bei Temperaturschwankungen, ausgelöst durch Kühlung, kann zu Kälteschäden führen (Hammerstedt et al. 1990, Loomis und Graham 2008). Die Plasmamembran setzt sich zusammen aus unterschiedlichen Lipiden, die bei verschiedenen Temperaturen an einigen Membranregionen in den kristallinen Zustand übergehen, während sich andere noch im flüssigen Zustand befinden. In den flüssigen Membranregionen beginnt die Konzentrierung der Proteine (Robertson und Watson 1986). Diese Prozesse bewirken den Verlust metabolischer Funktionen.

### **2.3 Spermaschädigungen beim Einfrieren**

Die Hauptgründe für Schäden während des Einfrierprozesses sind thermisch-, mechanisch-, chemisch- und osmotisch bedingte Störungen der Membranen. Sinkt die Temperatur unter 0 °C, kommt es zur Bildung von Eiskernen und zur Kristallisation (Abb. 2.1). Fällt die Temperatur zu schnell ab, gefriert intrazelluläres Wasser zu Eis bevor es die Zelle verlassen kann. Die sich bildenden Eiskristalle können die Zelle schädigen (Hammerstedt et al. 1990, Loomis und Graham 2008). Eiskristalle erzeugen einen unregulierten mechanischen Tod der Zelle (Martin et al. 2004). Verläuft die Abkühlung langsam genug, verliert die Zelle ausreichend Wasser um die intrazellulär gelösten Substanzen zu konzentrieren und eine Unterkühlung zu vermeiden. Die Zelle dehydriert und friert intrazellulär nicht (Abb. 2.1). Erfolgt die Abkühlung jedoch zu langsam, erfährt sie einen starken Volumenschwund und ist längerfristig hochkonzentrierten Elektrolytlösungen ausgesetzt bevor sie eine eutektische Temperatur erreicht und sich die gelösten Substanzen verfestigen und erstarren (Gao und Critser 2000). Volumenschwund und das längerfristige Ausgesetztsein von hochkonzentrierten Elektrolyten kann Zellschädigungen auslösen. Lovelock (1957) vermutet, dass die erhöhten Konzentrationen gelöster Stoffe und die Zelldehydration schädliche Effekte auf die Lipid-Proteinkomplexe der Zellmembranen haben und Lipid- und Phospholipidverluste zunehmen. Die Zelle ist daher vermehrt permeabel für Elektrolyte, schwillt an oder reißt sogar (Gao und Critser 2000).

Eine hohe Gefriereschwindigkeit (30°C bis 50°C/ Minute) und deren sorgfältige Kontrolle zwischen -5°C und -50°C sind daher für die erfolgreiche Kryokonservierung der Spermien von Nutztieren zur Erhöhung des Anteils überlebender Spermien und zur Verbesserung der Funktionen der Spermien erforderlich (Kumar et al. 2003, Robbins et al. 1976).

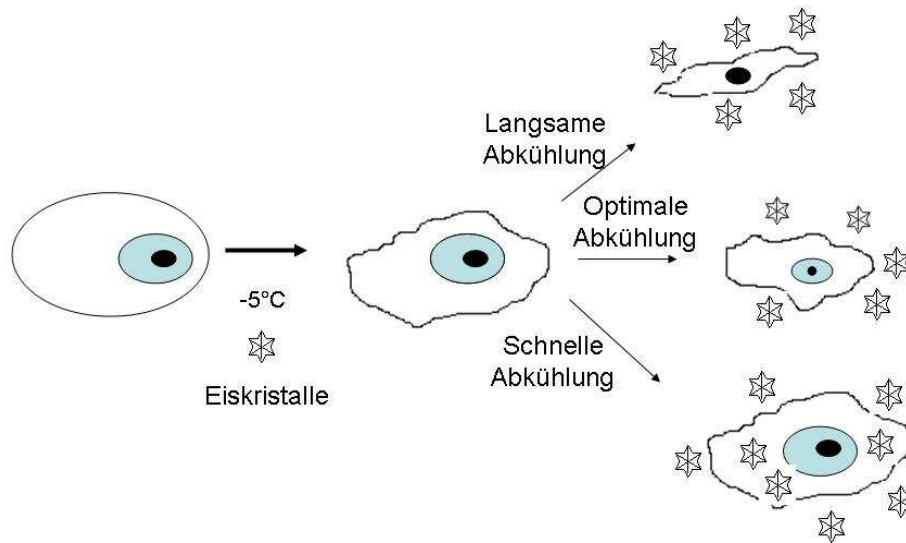


Abb. 2.1 : Schematische Darstellung des Ablaufs physikalischer Vorgänge während des Einfrierprozesses (Gao und Critser 2000)

### **2.3.1 Einfluss auf die Plasmamembran**

Der Aufbau dieser Membran zeigt das typische Bauprinzip von Biomembranen mit Lipiddoppelschicht, eingelagerten Cholesterinmolekülen, globulären Proteinen und anderen integralen und assoziierten Makromolekülen (Singer und Nicolson 1972). Die Plasmamembran der Spermien unterscheidet sich hinsichtlich der Verteilung von Lipiden und Proteinen zwischen den peri- und postakrosomalen Bereichen des Spermienkopfes bzw. zwischen Mittelstück und Hauptstück und dem Schwanz (Parks und Graham 1992). Phospholipide machen 65-70% der Gesamtmenge der Lipiddoppelschicht aus. Sie beinhalten einen großen Anteil langkettiger ungesättigter Fettsäuren, die vermutlich für eine hohe Fluidität und Instabilität der Plasmamembran verantwortlich sind. In Modellsystemen, die aus einfachen Lipiden oder einfach kombinierten Phospholipiden bestanden, kam es während des Phasenübergangs durch Temperaturabnahme von der flüssig-kristallinen zur Gelphase zum

Verlust gelöster Stoffe über die ganze Membran hinweg (Drobnis et al. 1993). Schnelles Kühlen rief Lipidverluste, sowie eine Lipid-Proteinumverteilung innerhalb der Spermienmembran hervor (Loomis und Graham 2008). Der Verlust war minimal, wenn sich die Membranlipide in der Gelphase oder in der flüssig-kristallinen Phase befanden (Holt 2000). Allerdings ist die Permeabilität der Doppelschicht erhöht, wenn die Lipidmoleküle während des Phasenübergangs neu organisiert werden (Drobnis et al. 1993). Dieses Phänomen ist auch charakteristisch für ein kapazitiertes Spermium (Drobnis et al. 1993). Die Lebenserwartung der Zelle ist durch eine erhöhte Permeabilität und Instabilität der Membran herabgesetzt (Drobnis et al. 1993).

### **2.3.2 Einfluss auf das Akrosom**

Das Akrosom ist die Kopfkappe des Spermiums und bedeckt den Spermienkopf apikal. Das Akrosom enthält lytische Enzyme wie Akrosin, Esterasen, Hyaluronidasen und saure Proteinase, die zur Proteolyse der Zona pellucida der weiblichen Eizellen führen und somit die Penetration des Spermiums in die Eizelle ermöglichen (Eddy und O'Brien 1994). Das Akrosom besteht aus einer inneren und einer äußeren Membran. Schnelles Abkühlen der Spermien resultiert in strukturellen Veränderungen die sie von Spermien mit normalem Akrosom unterscheiden. Einem Kälteschock ausgesetztes Bullensperma zeigt häufig faden- und /oder tropfenartige Strukturen am Kopf (Bamba und Cran 1988). Des Weiteren ist die Anfälligkeit der äußeren Akrosommembran gegenüber diesen Stressoren eindeutig höher als die der Plasmamembran (Bamba und Cran 1988).



### **2.3.3 Einfluss auf den Zellkern**

Innerhalb des Spermienkopfes liegt der Zellkern, der einen haploiden Chromosomensatz besitzt (Sinowatz 2001). Das lamellenartig gepackte Chromatin des Spermiums weist im Unterschied zu den somatischen Zellen einen höheren Kondensationsgrad auf (Golan et al. 1997). Während der Spermiogenese und dem Transport der Spermien vom Hoden in den Nebenhoden verändert das Spermienchromatin mehrfach seine Struktur, bis es einen vorerst endgültigen Zustand erreicht (Meistrich et al. 1976). In vielen Studien wurden Zusammenhänge zwischen der Chromatinstruktur und der Fertilität der Spermien nachgewiesen (Bochenek et al. 2001, Evenson et al. 1994, Silva und Gadella 2006, Ward und Coffey 1991).

Einfrierverfahren haben, unabhängig von der angewandten Methode, offensichtlich einen Einfluss auf die DNA-Integrität. Auswirkungen des Einfrierens sind Chromatinschäden, die zu einer DNA-Fragmentierung führen (Petyim und Choavaratana 2006). Der mittels Spermienchromatinstruktur-Assay bestimmte Anteil an Spermien mit fragmentierter DNA (DFI %) steigt während der Kryokonservierung an (Waterhouse et al. 2010). Dagegen haben Martin et al. (2004) nach der Kryokonservierung mittels TUNEL- Assay keinen Anstieg des Anteils von DNA-fragmentierten Zellen beobachtet.

### **2.4 Schädigungen beim Auftauen**

Die Pailletten mit einem Volumen von 0.25 ml werden gewöhnlich bei 37°C für 30 Sekunden aufgetaut. Auch das Auftauen von Bullensperma führt zu einer Erniedrigung des prozentualen Anteils lebender Spermien. Dieser Prozess ist genauso wichtig wie die Einfrierphase, da die Spermien beim Auftauen ein zweites Mal die besonders kritische Temperaturzone von -15° C bis -60° C durchlaufen (Salomon und Maxwell 1995). Es wurde festgestellt, dass mit einer höheren Auftaugeschwindigkeit (bei 70°C für 5 Sekunden) bessere Ergebnisse hinsichtlich der Motilität- und Akrosomintegrität der Spermien erzielt werden (Holt 2000, Salomon und

Maxwell 1995). Untersuchungen der Spermienmorphologie ergaben, dass sowohl beim Bullen (Nur et al. 2003, Wiggin und Almquist 1975) als auch beim Hund (Nothling und Shuttleworth 2005) ein Auftauen im Wasserbad mit Temperaturen von 70 °C bzw. 75 °C für 5 Sekunden zu einem geringeren Anteil akrosomgeschädigter Spermien führt. Auch die Motilität der Spermien bei Bulle (Nur et al. 2003, Rodriguez et al. 1975, Wiggin und Almquist 1975), Hund (Nothling und Shuttleworth 2005), Schafbock (Soderquist et al. 1997) und Büffel (Ahmad 1984) war bei solchen Auftaubedingungen höher als beim Auftauen im Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C für 30 Sekunden.

Es gibt Hinweise darauf, dass gefrorene Zellen beim Erwärmen auf Grund einer Rekristallisation geschädigt werden. Ein Hinweis für dieses Phänomen ist die Tatsache, dass ein Anteil schnell gekühlter Zellen, in denen sich intrazellulär Eis gebildet hat, durch schnelles Aufwärmen „gerettet“ werden können. Dadurch wird die Zeit, in der es zu einer Rekristallisation kommen kann, verkürzt (Watson 1995).

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Bullen**

Für die vorliegende Dissertation wurden insgesamt 24 Ejakulate von 6 Bullen der Rinderklinik Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (RiKli), 176 Ejakulate von 15 Bullen der Rinderzucht Schleswig-Holstein in Schönböken (RSH) und 83 Ejakulate von 21 Bullen der Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch (BVN) analysiert. Von diesen Tieren gehörten 11 Bullen der Rasse Holstein Frisian, 8 Bullen der Rasse Red Holstein Frisian, 2 Bullen der Rasse Angler und 21 Bullen der Rasse Fleckvieh an. Die Tiere zeigten ein ungestörtes Allgemeinbefinden und wiesen keine Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Sexualfunktion oder eine Erkrankung der Geschlechtsorgane auf.

#### **3.2 Samengewinnung und Kryokonservierung**

Die Samengewinnung und –kryokonservierung wurde an den Besamungsstationen der RiKli, des RSH und des BVN durchgeführt.

Für die vorliegende Arbeit wurde nur solche Ejakulate verwendet, bei denen das Volumen mindestens 2 ml betrug, die Spermakonzentration über 0,4 Millionen/  $\mu\text{l}$  lag und mindestens 70% vorwärtsbewegliche Spermien enthalten waren.

##### **3.2.1 Besamungsstation der Klinik für Rinder der Stiftung Tierärztliche Hochschule**

###### **Hannover**

An der RiKli wurde der Samen mit einer künstlichen Vagina, Modell Hannover (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland), gewonnen. Nach den konventionellen spermatologischen Untersuchungen (Motilität-, Dichte- und Volumenbestimmung) wurde das Ejakulat durch eine 1-Schritt-Verdünnung mit Andromed®-Verdüner (auf 32°C vorgewärmt; Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) auf  $60 \times 10^6$  Spermien/ ml verdünnt. Das verdünnte Sperma wurde

anschließend bei Raumtemperatur in 0,25 ml Pailletten (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) abgefüllt. Danach wurden die Pailletten innerhalb von 3 Stunden auf 4 °C in einem Kühlschrank abgekühlt. Anschließend wurde das Sperma mit einem Einfriergerät der Firma SY-LAB (IceCube 14S, Neupurkersdorf / Österreich) eingefroren. Die Temperatur wurde zunächst mit einer Geschwindigkeit von 3 °C/min. auf -7 °C und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 60 °C/min. auf -120°C erniedrigt. Danach wurde die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von 10,8 °C/min. weiter auf -150 °C abgesenkt und anschließend die Pailletten in flüssigen Stickstoff (-196 °C) umgelagert.

### **3.2.2 Besamungsstation der Rinderzucht Schleswig-Holstein e.G. (RSH)**

Die Samengewinnung erfolgte an der RSH mit einer künstlichen Vagina, Modell Hannover (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland). Nach konventionellen spermatologischen Untersuchungen (Motilität, Dichte, Volumen) wurde das Ejakulat mit Andromed® (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) auf  $60 \times 10^6$  Spermien/ ml verdünnt und anschließend bei Raumtemperatur in 0,25 ml Pailletten (Fa. IMV L'Aigle, Frankreich) abgefüllt. Danach wurden die Pailletten in einem Kühlschrank innerhalb von 3 Stunden auf 4°C abgekühlt und dann bei dieser Temperatur über 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Sperma mit einem Einfriergerät der Firma IMV (Typ Digitcool 5300, Fa. IMV L'Aigle, Frankreich) eingefroren. Die Temperatur wurde zunächst mit einer Geschwindigkeit von 4,7 °C/min. auf -10 °C und anschließend mit einer Geschwindigkeit von 29 °C/min. auf -68 °C erniedrigt. Danach wurde die Temperatur mit einer Geschwindigkeit von 10 °C/min. weiter auf -140 °C abgesenkt. Anschließend wurden die Pailletten in flüssigen Stickstoff (-196 °C) umgelagert.

### **3.2.3 Besamungsstation des Besamungsvereins Neustadt a.d. Aisch (BVN)**

Beim BVN erfolgte die Spermagewinnung mit einer künstlichen Vagina, Modell Neustadt Aisch (Fa. Medvet, Laatzen, Deutschland). Nach konventionellen spermatologischen

Untersuchungen (Motilität, Dichte, Volumen) wurde das Ejakulat mit Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) auf  $60 \times 10^6$  Spermien/ ml verdünnt. Anschließend wurde das verdünnte Sperma in einem Kühlkabinett (Ref.: 14335/0400, Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) zunächst in braunen Flaschen innerhalb von 3,5 Stunden auf 4 °C abgekühlt und anschließend in 0,25 ml Pailletten (Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) abgefüllt. Das Einfrieren erfolgte mit einem Einfriergerät (MT Standard, NIFA Technologies BV, Leeuwarden, Niederlande). Innerhalb von 8 Minuten wurde die Temperatur der Pailletten in dem Gerät auf -95 °C abgesenkt und danach in flüssigen Stickstoff (-196°C) umgelagert.

### **3.3 Analyse der Spermaqualität**

#### **3.3.1 Durchflusszytometer**

Die Messungen wurden mit einem Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter vom Typ XL/MCL durchgeführt, die Auswertungen erfolgte mit der Software Expo 32 ADC XL 4 Color™ und mit dem Programm Expo 32 ADC Analysis™ (Firma Beckman Coulter, Fullerton, Californien, USA). Das Durchflusszytometer war mit einem luftgekühlten Argonionenlaser der Wellenlänge 488 nm ausgestattet. Für die Messungen wurden der Filter FL1 (BP 530/30 nm) für die Grünfluoreszenz und der Filter FL3 (LP 650 nm) für die Rotfluoreszenz eingesetzt.

#### **3.3.2 FITC-PNA/ PI-Färbung**

Das kryokonservierte Sperma wurde nach dem Auftauen mit Hilfe des FITC-PNA/PI Assays (Ashworth et al. 1995) hinsichtlich der prozentualen Anteile an plasmamembranintakten (PMI) und akrosomgeschädigten (AS) Spermien untersucht. Für die Messungen wurden die Proben mit Tyrode-Medium (s. Anhang 9.1.1) auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Spermien/ml verdünnt. Zu 492 µl der Spermisuspension wurden 5 µl Fluoreszein-Isothiocyanat-Peanut Agglutinin (FITC-PNA; 100 µg/ml) und 3 µl Propidiumiodid (PI; 2,99 mM)

gegeben und das entstehende Gemisch 5 Sekunden mit Hilfe eines Vortexers (Typ Lab Dancer Orbital Shaker, Fa. IKA®, Staufen, Deutschland) geschüttelt. Die Proben wurden anschließend in einem Wärmeblock bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben erneut mit einem Vortexer kurz gemischt. Nach der FITC-PNA/PI-Färbung waren bei einer Dot plot Darstellung vier Spermienpopulationen zu erkennen (Abb. 3.1).

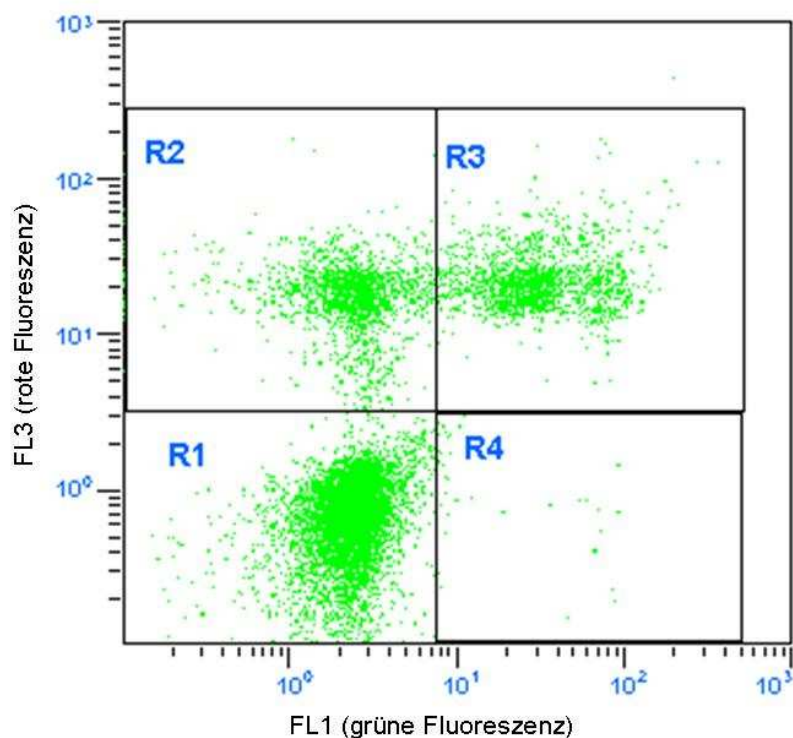


Abb. 3.1: Dot plot-Darstellung mit unterschiedlichen Spermienpopulationen (R) nach FITC-PNA/PI-Färbung. R1: plasmamembran- und akrosomintakte Spermien, R2: plasmamembrangeschädigte und akrosomintakte Spermien, R3: plasmamembran- und akrosomgeschädigte Spermien, R4: plasmamembranintakte und akrosomgeschädigte Spermien

Die Induktion der Akrosomreaktion wurde mit Hilfe des Kalziumionophors A23187 (s. Anhang 9.2.1) durchgeführt. Dazu wurden 488,5 µl der Spermisuspension mit 3,5 µl Kalziumionophor (5µM) angesetzt und 2 Stunden und 45 Minuten im CO<sub>2</sub>-Schrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit FITC-PNA/PI gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen (Abb. 3.1).

Es wurden von jedem Ejakulat jeweils 4 oder 5 Pailletten mittels des FITC-PNA/PI Assays untersucht, um die Variabilitäten der PMI-(0 R1 + R4) und AS-(= R2 + R3) Werte innerhalb der Ejakulate zu bestimmen. Pro Analyse wurden 10.000 Spermien durchflusszytometrisch untersucht.

### **3.3.3 Spermienchromatinstruktur-Assay (SCSA)**

Die DNA-Fragmentation wurde mit Hilfe des Spermienchromatinstruktur-Assays (SCSA) durchgeführt. Dazu wurden die Spermaproben direkt nach dem Auftauen und nach dreistündiger Inkubation bei 37°C mittels SCSA-Färbung gefärbt. Mit diesem Farbstoff kann zwischen einsträngiger, rotfluoreszierender und doppelsträngiger, grünfluoreszierender DNA unterschieden werden.

Für die SCSA-Färbung wurden die Proben mittels TNE Puffer (s. Anhang 9.1.2) auf  $2 \times 10^6$  Spermien/ml verdünnt. Von dieser Spermasuspension wurden 200 µl in ein Flowröhrchen pipettiert und mit 400 µl Säuredetergenz (s. Anhang 9.2.2) für 30 Sekunden mit Hilfe des Vortexers vermischt. Danach wurden 1,2 ml Akridinorange-Lösung (s. Anhang 9.3.3) dazugegeben und bei Raumtemperatur für 3 Minuten inkubiert, bevor die Proben durchflusszytometrisch analysiert wurden. Für die Messungen wurde der Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt. Nach jeder zehnten Probe wurde

mit Hilfe von Referenzproben, die von einem Ejakulat eines klinikeigenen Kontrollbullens stammten, das Gerät neu kalibriert. Dazu wurde die mittlere Grünfluoreszenzintensität auf 500 und die mittlere Rotfluoreszenzintensität auf 130 Kanäle eingestellt.

Jede Spermaprobe wurde zweimal analysiert und die sich daraus ergebenden Mittelwerte für die weiteren Auswertungen herangezogen. Pro Analyse wurden 5.000 Spermien durchflusszytometrisch untersucht.

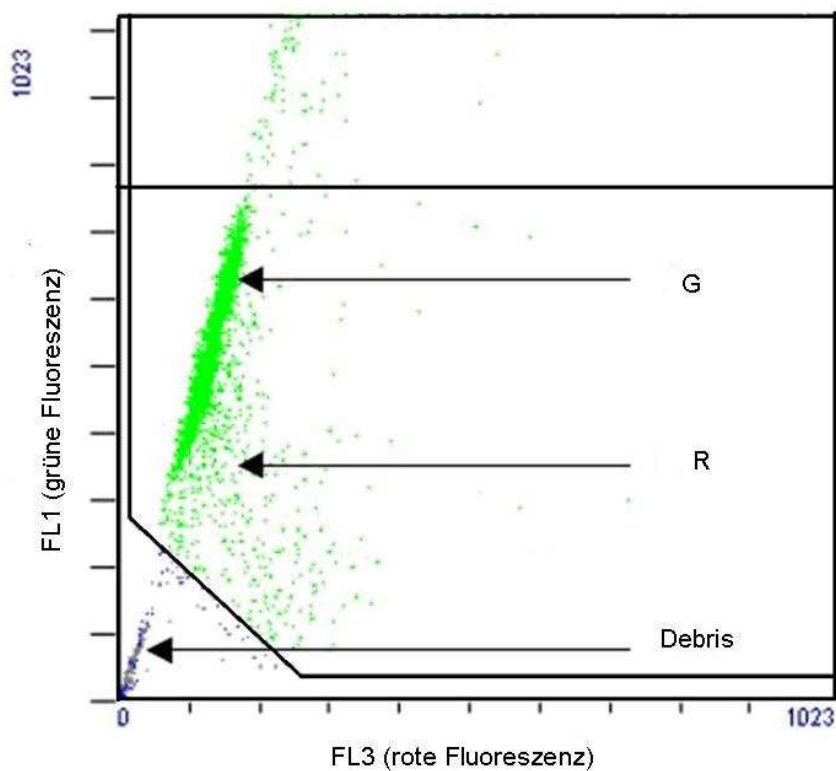


Abb. 3.2: Dot plot-Darstellung nach Durchführung des Spermienchromatinstruktur-Assays (SCSA). G: Spermien mit doppelsträngiger DNA (hohe grüne Fluoreszenz), R: Spermien mit vermehrt einzelsträngiger DNA (hohe rote Fluoreszenz).

Mit Hilfe einer computergestützten Auswertung der Punktwolkendiagramme wurde die in die Auswertung eingehende Spermienpopulation gegenüber Debris abgegrenzt (Abb. 3.2). Anschließend wurde für jedes einzelne Spermium der DNA-Fragmentationsindex (DFI), der



als Quotient aus Rotfluoreszenz und Gesamtfluoreszenz (Rot- und Grünfluoreszenz) definiert ist, bestimmt (Evenson und Jost 2000). In einem Verteilungshistogramm wurden alle DFI-Werte einer Spermaprobe in Abhängigkeit von ihrer Höhe dargestellt (Abb. 3.3) und zwischen Spermien mit niedrigen und hohen DFI- Werten (%DFI) unterschieden.

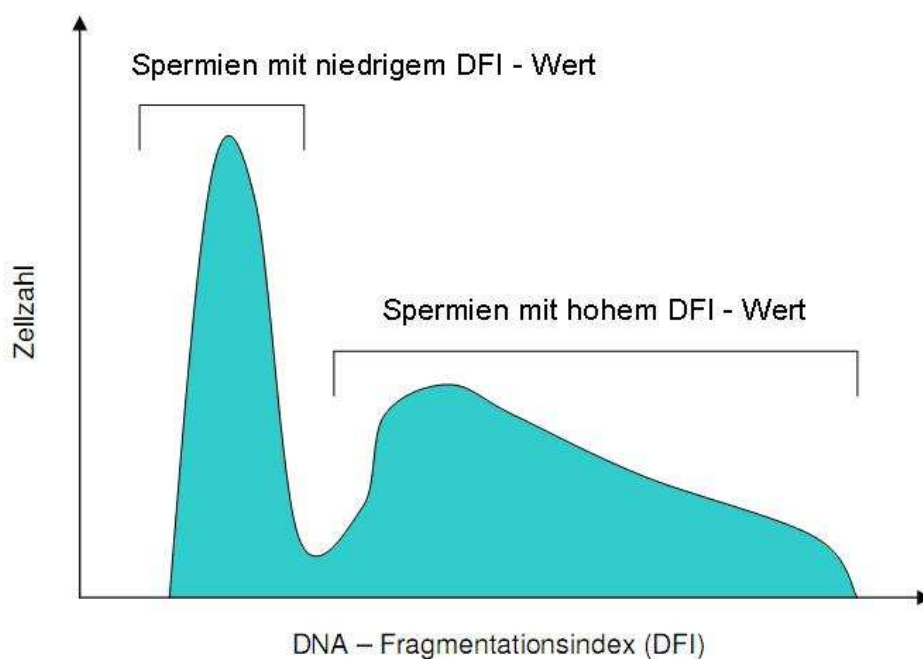


Abb. 3.3: Häufigkeitsverteilung der DFI-Werte einer Spermaprobe mit einer Population mit niedrigen DFI- und einer Population mit hohen DFI-Werten (modifiziert nach EVENSON et al. (2002)).

### **3.4 Temperaturmessungen**

Die Temperaturen während des Abkühl- und Einfrierprozesses wurden mit Temperaturführlern (Typ GTF 101 Pt 100, Fa. Greisinger Electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland), einem 12-Kanal-Temperaturschreiber (Typ ADAM- 4015, ADAM-4520 RS-232 to RS- 422/

RS-485 ISOLATED CONVERTER, Fa. Advantech Co., Düsseldorf, Deutschland) und einer Messwerterfassungssoftware (DASY Lab 9.0, measX GmbH & Co. KG, Mönchengladbach, Deutschland) bestimmt (Abb. 3.4). Die Temperaturfühler wurden neben und in den Pailletten (Abb. 3.4) platziert bevor diese abgekühlt wurden. Die Temperaturwerte wurden damit einmal pro Sekunde erfasst.



Abb. 3.4: 12 Kanal-Temperaturschreiber mit Notebook (links) und Temperaturfühlern, die neben und in der Paillette positioniert waren (rechts).

### **3.5 Versuchsablauf**

#### **3.5.1 Einfluss des Zeitpunkts der Verdünnung und der Lagerung bis zur Abkühlung**

Bei diesem Versuch wurden jeweils fünf Pailletten von jeweils sechs Ejakulaten von drei Bullen an der RiKli untersucht. Die Samengewinnung erfolgte zweimal wöchentlich im Abstand von jeweils 2 bzw. 3 Tagen. Nach der Samengewinnung und -beurteilung wurden die Ejakulate in drei Aliquots gesplittet. Die Proben des ersten Aliquots wurden unmittelbar nach der Beurteilung verdünnt und in Pailletten abgefüllt (0V). Die Proben des zweiten Aliquots wurden ebenfalls unmittelbar nach der Beurteilung verdünnt, dann aber 30 Minuten

bei Raumtemperatur (22°C) gelagert bevor sie in Pailletten abgefüllt wurden (Gruppe 0V30RT). Die Proben des dritten Aliquots wurden unmittelbar nach der Samengewinnung 30 Minuten in einem 32 °C warmen Wasserbad inkubiert, danach verdünnt und in Pailletten abgefüllt (Gruppe 30WTV). Alle Pailletten wurden unmittelbar nach dem Abfüllen in einem Kühlschrank innerhalb von 3 Stunden auf 4°C abgekühlt.

### **3.5.2 Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit**

Für den Versuch standen je 10 Pailletten von 76 Ejakulaten von 10 Bullen (von 6 Bullen je 8 Ejakulate und von 4 Bullen je 7 Ejakulate) der Besamungsstation RSH zur Verfügung. Die Samengewinnung erfolgte zweimal wöchentlich im Abstand von jeweils 2 bzw. 3 Tagen. Die Proben wurden jeweils in zwei Aliquots aufgeteilt. Die Pailletten des ersten Aliquots wurden in einem Karton im Kühlschrank über 3 Stunden auf 4°C abgekühlt. Die Pailletten des zweiten Aliquots wurden nach dem auf der Besamungsstation üblichen Verfahren auf Metallrampen („Einfrierrampen für 175 Pailletten“, Fa. Minitüb, Tiefenbach, Deutschland) ohne Karton gelagert und zunächst für 1,5 Stunden auf 7 bis 10 °C und anschließend ebenfalls für 1,5 Stunden auf 4°C abgekühlt. Während der Abkühlung auf 4°C und der Kryokonservierung wurde der Temperaturverlauf mit einem 12-Kanal-Temperaturschreiber gemessen und protokolliert.

### **3.5.3 Einfluss der Lokalisation der Pailletten im Einfriergerät**

Um den Einfluss der Lokalisation der Pailletten im Einfriergerät (Typ Digitcool 5300, Fa. IMV L'Aigle, Frankreich) zu beurteilen, wurden diese während des Einfriervorgangs an verschiedenen Orten im Einfriergerät (obere (O) und untere (U) Rampen, jeweils vorne (V),

mittig (M) und hinten (H)) positioniert und die Temperaturen während des Einfriervorgangs und während der Umlagerung der Pailletten vom Einfriergerät in den flüssigen Stickstoffstank gemessen. Dieser Versuch wurde an fünf unterschiedlichen Tagen wiederholt. Gleichzeitig wurde die Dauer der einzelnen Prozesse protokolliert. Da an den Orten HU, HO und VO ein deutlicher Temperaturanstieg zu verzeichnen war, fand ein weiterer Versuch statt, bei dem die Pailletten nur an den als kritisch zu bewertenden Orten (HU, HO und VO) gelagert wurden (Abb. 3.5).

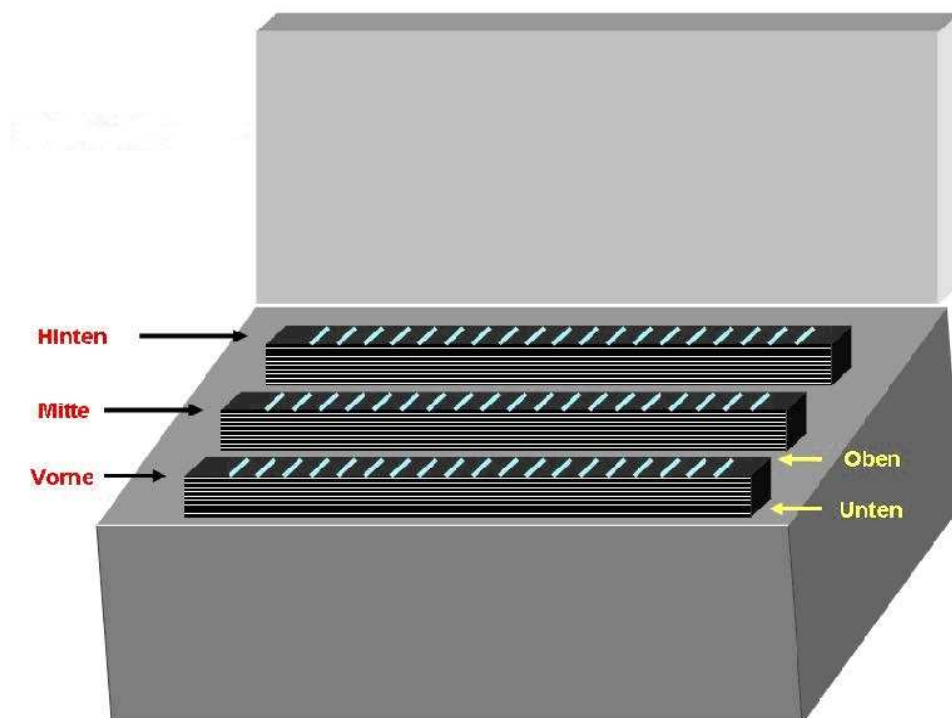


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Einfriergerätes mit den Rampen und den darauf an unterschiedlichen Orten lokalisierten Pailletten.

Für diesen Teilversuch wurden insgesamt 24 Ejakulate von fünf Bullen (von 4 Bullen je 5 Ejakulate und von 1 Bullen je 4 Ejakulate) der Besamungsstation der RSH verwendet. Es wurden 15 Pailletten pro Ejakulat nach dreistündiger Abkühlung auf 4°C eingefroren (s.

3.2.2) und in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$  aufbewahrt. Je fünf Pailletten wurden im Einfriergerät an den drei Orten VO, HO und HU platziert.

Um eine zu starke Erwärmung der Proben während der Umlagerung der Pailletten vom Einfriergerät in den Container mit flüssigem Stickstoff zu vermeiden, wurde in einem zweiten Durchgang mit einem Polystyroldeckel (Styropor®) die Öffnung des Einfriergerätes während dieses Prozesses abgedeckt. Während der Entnahme der Proben wurde der Deckel nur an dem jeweiligen Bearbeitungsort entfernt; an den anderen Stellen blieb die Öffnung des Gerätes abgedeckt. An den drei verschiedenen Lagerungsorten befanden sich insgesamt sechs Temperaturfühler, die in Pailletten gesteckt waren und sechs weitere Temperaturfühler, die neben den Pailletten lagen, d.h. es befanden sich vier Temperaturfühler an je einem Lagerungsort.

### **3.5.4 Einfluss der Anzahl der eingefrorenen Pailletten**

Um den Einfluss der Anzahl der eingefrorenen Pailletten auf die Spermaqualität zu testen, wurden bei der Durchführung des unter 3.5.2 beschriebenen Experiments jeweils 5 Pailletten, die vom technischen Personal der Besamungsstation (TPB) eingefroren worden waren, willkürlich für den Versuch ausgewählt und die Mittelwerte und die Variabilitäten von PMI und AS der von TPB und von mir (Duygu Calisici = DC) konservierten Pailletten verglichen. Die Pailletten wurden für das Experiment 3.5.2 separat nach dem TPB eingefroren. Das Gerät war dabei nicht voll. Führte das TPB die Kryononservierung durch, war das Gerät immer voll.

### **3.5.5 Einfluss unterschiedlicher Auftaubedingungen**

Die Studie wurde an 83 Ejakulaten von 21 Fleckvieh Bullen (von 20 Bullen jeweils vier Ejakulate und von einem Bullen drei Ejakulate) des BVN durchgeführt. Von jedem Ejakulat

wurden 10 Pailletten verwendet; fünf Pailletten wurden bei 37°C für 30 Sekunden (Normale Geschwindigkeit = NG) und fünf Pailletten bei 70 °C für 5 Sekunden (Hohe Geschwindigkeit = HG) aufgetaut. Jeweils vier Pailletten pro Gruppe wurden unmittelbar (0h) und drei Stunden (3h) nach dem Auftauen hinsichtlich der PMI- und AS-Werte untersucht; außerdem wurden die AR-Werte bestimmt. Zusätzlich wurden an je einer Paillette die %DFI-Werte unmittelbar (0h) und drei Stunden (3h) nach dem Auftauen ermittelt.

### **3.5.6 Einfluss der Entleerungsmethode der Pailletten**

Für den Versuch standen jeweils fünf Pailletten von jeweils sechs Ejakulaten von drei Bullen, d.h. insgesamt 90 Pailletten zur Verfügung. Die kryokonservierten Proben wurden nach dem Auftauen bei 37°C für 30 Sekunden einmal durch Ausdrücken des Spermas mit Hilfe einer Besamungspistole (BP) und einmal durch Aufschneiden an beiden Seiten (ASB) entleert und die PMI- und AS-Werte analysiert.

### **3.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mit den Programmen StatView Version 5.0 (SAS Institute Inc., USA) und Sigma Stat (Fa. Systat Software Inc., San Jose, Californien, USA). Nach Prüfung der Ergebnisse auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) kam neben der deskriptiven Statistik (Mittelwert und Standardabweichung:  $\bar{X} \pm SD$ ) die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und der Fisher's PLSD-Test zur Anwendung, um zu überprüfen, ob innerhalb bzw. zwischen den Untersuchungsgruppen Unterschiede bestanden. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurden als signifikant gewertet.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Einfluss des Zeitpunkts der Verdünnung und der Lagerung bis zur Abkühlung

Die Mittelwerte und die Variabilitäten der PMI- und AS-Werte waren unabhängig ( $P > 0.05$ ) von den Zeitpunkten der Verdünnung des Samens und des Abfüllens in die Pailletten (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Einfluss des Zeitpunkts der Verdünnung des Samens und der Lagerung bis zur Abkühlung auf die Plasmamembranintegrität (PMI) und akrosomale Schädigung (AS). Gruppe 0V: sofort verdünnt und in Pailletten abgefüllt, Gruppe 0V30RT: sofort verdünnt, danach 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann in Pailletten abgefüllt, Gruppe 30WTV: Nativsamen 30 Minuten bei 32 °C im Wasserbad inkubiert, danach verdünnt und in Pailletten abgefüllt. Die eingefrorenen Pailletten wurden bei 37°C für 30 Sekunden aufgetaut und untersucht. Es wurde von 3 Bullen 6 Ejakulate und pro Ejakulate 5 Pailletten untersucht.

<b>Parameter</b>	<b>Gruppe</b>	<b><math>\bar{X} \pm SD</math></b>	<b>VK <math>\pm</math> SD</b>
<b>PMI (%)</b>	0V	59,0 $\pm$ 11,6	7,3 $\pm$ 6,7
	0V30RT	60,4 $\pm$ 11,7	5,8 $\pm$ 6,1
	30WTV	58,9 $\pm$ 6,6	7,4 $\pm$ 6,1
<b>AS (%)</b>	0V	13,0 $\pm$ 3,8	10,1 $\pm$ 5,2
	0V30RT	12,8 $\pm$ 4,0	6,6 $\pm$ 4,3
	30WTV	14,9 $\pm$ 3,3	15,2 $\pm$ 18,9

## 4.2 Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit

Die Geschwindigkeit der Abkühlung von Raumtemperatur auf 4° betrug auf der Rampe 3,3°C/min. und im Karton 2,3°C/min (Abb. 4.1). Die Proben wurden nach dreistündiger Lagerung eingefroren und in Stickstoff umgelagert.

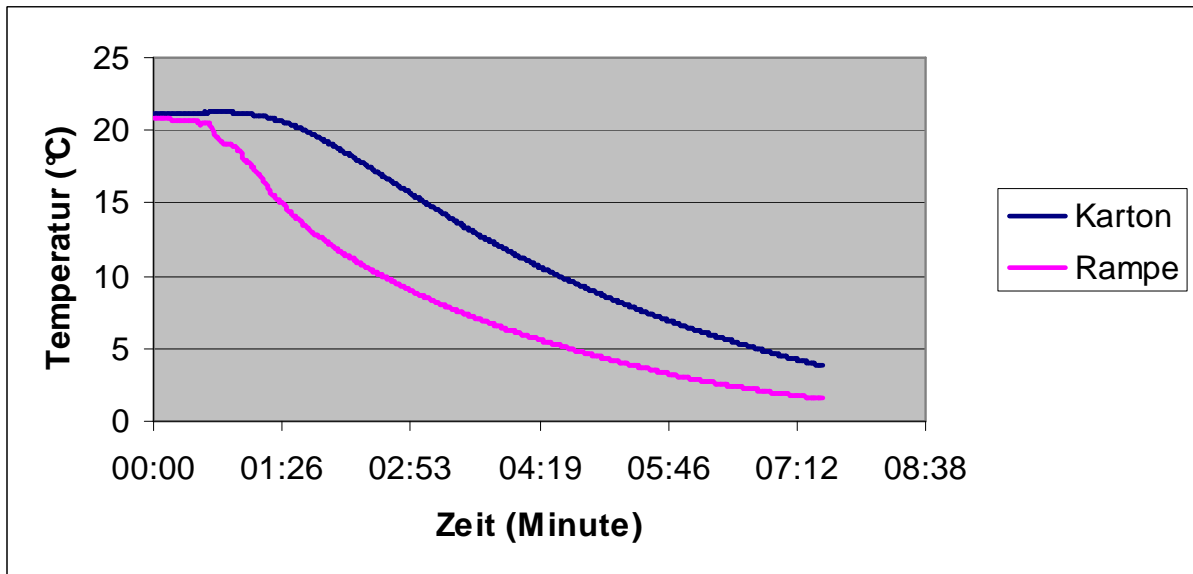


Abb. 4.1: Abkühlgeschwindigkeit des in Pailletten gelagerten Spermas bei Lagerung auf der Rampe und im Karton.

Zwischen den offen auf der Rampe und den im geschlossenen Karton abgekühlten Spermproben bestanden keine Unterschiede ( $P > 0.05$ ) in den PMI- und AS-Werten, weder hinsichtlich der Mittel- noch bezüglich der VK-Werte (Tab. 4.2).



Tab. 4.2: Einfluss der Art der Abkühlung auf die Plasmamembranintegrität (PMI) und die akrosomale Schädigung (AS) vor (v) und nach (n) der Kryokonservierung (Kryo). DV: direkt nach dem Verdünnen, K: im Karton gelagert; R: auf der Rampe gelagert. Es wurden von 10 Bullen insgesamt 76 Ejakulate und pro Ejakulat 5 Pailletten untersucht.

Parameter	Zeitpunkt der Untersuchung	Lagerung	$\bar{X} \pm SD$	VK $\pm$ SD
PMI (%)	vKryo	DV	82,2 $\pm$ 5,9	1,4 $\pm$ 0,8
	vKryo	K	81,8 $\pm$ 5,4	1,4 $\pm$ 1,1
	vKryo	R	82,0 $\pm$ 5,7	1,3 $\pm$ 0,7
	nKryo	K	54,2 $\pm$ 9,7	5,8 $\pm$ 3,0
	nKryo	R	55,2 $\pm$ 9,7	5,4 $\pm$ 3,1
AS (%)	vKryo	DV	5,7 $\pm$ 2,8	8,0 $\pm$ 4,7
	vKryo	K	7,0 $\pm$ 3,4	5,9 $\pm$ 3,4
	vKryo	R	7,5 $\pm$ 3,4	6,8 $\pm$ 3,7
	nKryo	K	17,4 $\pm$ 6,3	9,6 $\pm$ 5,9
	nKryo	R	17,6 $\pm$ 6,8	10,8 $\pm$ 6,1

#### **4.3 Einfluss der Lokalisation der Pailletten im Einfriergerät**

Die Zeit für die Umlagerung der Pailletten aus dem Einfriergerät in den flüssigen Stickstoff dauerte bei den Versuchen ohne Abdeckung (Tab. 4.3) minimal 14,4 Sekunden und maximal 530,4 Sekunden (HU) und war abhängig von der Lokalisation. Bei den Versuchen mit Abdeckung (Tab. 4.4) wurden für die Umlagerung der Spermein zwischen 19,6 und 561,3 Sekunden benötigt

Tab. 4.3: Dauer der Umlagerung und Temperatur zum Zeitpunkt der Entnahme der Pailletten in Abhängigkeit von der Lokalisation der Rampen im Einfriergerät (VO: vorne-oben, VU: vorne-unten, MO: mitte-oben, MU: mitte-unten, HO: hinten-oben, HU: hinten-unten). Die Temperaturen wurden fünfmal gemessen und der Mittelwert errechnet.

Lokalisation	Dauer (Sekunden) $\bar{X} \pm SD$	Temperatur (°C) $\bar{X} \pm SD$
VO	14,4±7,5	-136,8±1,4
VU	178,6±32,2	-135,5±2,7
MO	189±34,7	-101,2±7,9
MU	358,4±52,6	-129,2±4,7
HO	364,4±51,5	-80,1±7,0
HU	530,4±56,4	-122,4±3,6

Tab. 4.4: Dauer der Umlagerung und Temperatur während der Entnahme der Pailletten bei abgedeckten bzw. bei nicht abgedeckten Proben in Abhängigkeit von der Lokalisation der Rampen im Einfriergerät. (VO: vorne-oben, HO: hinten-oben, HU: hinten-unten, o: ohne Abdeckung, m: mit Abdeckung). Die Temperatur wurde viermal gemessen und der Mittelwert errechnet.

Lokalisation	Abdeckung	Dauer (Sekunden) $\bar{X} \pm SD$	Temperatur (°C) $\bar{X} \pm SD$
VO	M	19,6±3,0	-130,7±1,0
	O	27,0±9,9	-128,1±3,8
HO	M	380,2±5,9	-79,3±2,3
	O	375,0±7,8	-75,7±1,8
HU	M	561,3±9,5	-104,4±4,6
	O	557,0±10,1	-100,7±2,1

Die Lokalisation der Spermien im Einfriergerät hatte keine Auswirkungen ( $P > 0.05$ ) auf die PMI- und AS-Werte (Tab. 4.5). Auch die Abdeckung der Öffnung des Einfriergerätes während der Umlagerung wirkte sich nicht ( $P > 0.05$ ) auf die Spermaqualitätsparameter aus.

Tab. 4.5: Einfluss der Lokalisation der Pailletten im Einfriergerät auf die Plasmamembranintegrität (PMI) und die akrosomale Schädigung (AS). VO: Im Einfriergerät vorne-oben, HU: Im Einfriergerät hinten-unten, O: Ohne Abdeckung, M: Mit Abdeckung. Es wurde von 5 Bullen insgesamt 24 Ejakulate und pro Ejakulat 5 Pailletten untersucht.

Parameter	Lagerungs ort	Abdeckung	$\bar{X} \pm SD$	VK $\pm$ SD
PMI (%)	VO	O	50,9 $\pm$ 9,0	6,7 $\pm$ 8,3
	HU	O	51,3 $\pm$ 9,5	6,0 $\pm$ 3,6
	HO	O	50,4 $\pm$ 10,2	6,7 $\pm$ 4,6
	VO	M	49,6 $\pm$ 8,7	5,4 $\pm$ 3,1
	HU	M	50,2 $\pm$ 9,1	5,1 $\pm$ 2,8
	HO	M	51,8 $\pm$ 8,8	4,9 $\pm$ 2,4
AS (%)	VO	O	18,1 $\pm$ 7,2	11,2 $\pm$ 9,1
	HU	O	17,9 $\pm$ 7,1	7,3 $\pm$ 4,2
	HO	O	18,3 $\pm$ 7,4	9,6 $\pm$ 5,1
	VO	M	17,7 $\pm$ 6,6	7,0 $\pm$ 3,3
	HU	M	18,2 $\pm$ 6,1	8,2 $\pm$ 4,1
	HO	M	17,7 $\pm$ 6,5	7,0 $\pm$ 3,5

#### **4.4 Einfluss der Anzahl der eingefrorenen Pailletten**

Bei den von DC eingefrorenen Proben waren die PMI-Werte um 5,3% höher ( $P < 0.05$ ) und die VK-Werte von PMI um 2,3% niedriger ( $P < 0.05$ ) als bei den von TPB eingefrorenen Proben (Tab. 4.6). Die AS-Werte und die VK-Werte von AS unterschieden sich nicht in Abhängigkeit von der Anzahl der eingefrorenen Pailletten. ( $P > 0.05$ ).

Tab. 4.6: Einfluss der Anzahl der eingefrorenen Pailletten auf die Plasmamembranintegrität (PMI) und die akrosomale Schädigung (AS) nach der Kryokonservierung. DC: von DC auf der Rampe gekühlte Proben nach der Kryokonservierung. TPB: Vom technischen Personal der Besamungsstation eingefrorene Proben. a, b : Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte des entsprechenden Parameters unterscheiden sich ( $p \leq 0,01$ ).

<b>Parameter</b>	<b>Person</b>	<b><math>\bar{X} \pm SD</math></b>	<b>VK <math>\pm</math> SD</b>
<b>PMI (%)</b>	DC	$55,2 \pm 9,7^a$	$5,4 \pm 3,1^a$
	TPB	$49,2 \pm 9,0^b$	$7,7 \pm 6,1^b$
<b>AS (%)</b>	DC	$17,6 \pm 6,8$	$10,8 \pm 6,1$
	TPB	$19,1 \pm 6,8$	$9,3 \pm 6,3$

#### **4.5 Einfluss der Auftaubedingungen auf die Qualität kryokonservierten Spermas**

Die PMI-Werte waren bei HG um 3,9% (0h) bzw. 3,1% (3h) höher ( $P < 0.0001$ ) als bei NG und die VK-Werte um 3,4% (0h;  $P < 0.005$ ) bzw. 3,1% (3h;  $P < 0.01$ ) niedriger als bei NG (Tab.4.7).

Tab. 4.7: Einfluss der Auftaugeschwindigkeit auf die Plasmamembranintegrität (PMI), die akrosomale Schädigung (AS), die Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion (AR) und die DFI-Werte unmittelbar (0h) und drei Stunden (3h) nach dem Auftauen bei hohen (HG: 70 °C für 5 Sekunden) und normalen (NG: 37°C für 30 Sekunden) Temperaturen. Es sind die Mittelwerte, Variationskoeffizienten und Standardabweichungen von 83 Ejakulaten von 21 Bullen dargestellt. a,b,c,d = Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Spalte des entsprechenden Parameters unterscheiden sich (a,b:  $p \leq 0.01$ , c,d:  $p < 0.005$ ).

Parameter	Auftaitemperatur		$\bar{X} \pm SD$	VK $\pm$ SD
PMI 0h (%)	NG		46,8 $\pm$ 10,1 <sup>a</sup>	13,1 $\pm$ 10,2 <sup>c</sup>
	HG		50,9 $\pm$ 9,8 <sup>b</sup>	8,9 $\pm$ 7,3 <sup>d</sup>
PMI 3h (%)	NG		42,1 $\pm$ 9,8 <sup>a</sup>	13,5 $\pm$ 10,9 <sup>a</sup>
	HG		45,5 $\pm$ 9,8 <sup>b</sup>	10,4 $\pm$ 9,3 <sup>b</sup>
AS 0h (%)	NG		20,3 $\pm$ 5,9 <sup>a</sup>	9,9 $\pm$ 10,0
	HG		17,9 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>	7,8 $\pm$ 6,7
AR 3h (%)	NG		54,8 $\pm$ 7,6	7,8 $\pm$ 4,6
	HG		55,4 $\pm$ 7,7	9,2 $\pm$ 5,1
DFI 0h (%)	NG		2,6 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	
	HG		1,8 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	
DFI 3h (%)	NG		4,9 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	
	HG		3,2 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>	

Nach HG waren die AS-Werte um 2,4% (0h;  $P < 0.01$ ) bzw. 3,6% (3h;  $P < 0.0001$ ) niedriger als nach NG. Die VK-Werte von AS 0h und 3h unterschieden sich nicht ( $P > 0,05$ ) in Abhängigkeit von der Auftaugeschwindigkeit. Die Auftaugeschwindigkeit hatte auch keine Auswirkungen ( $P > 0,05$ ) auf die Mittel- und VK-Werte von AR-Werte. Die DFI-Mittelwerte waren nach HG um 0,8% (0h;  $P < 0.0001$ ) bzw. 1,7% (3h;  $P < 0.0001$ ) niedriger als bei NG.

#### **4.6 Einfluss der Entleerungsmethode der Pailletten**

Die Entleerungsmethode der Pailletten nach dem Auftauen hatte keine Effekte ( $P > 0.05$ ) auf die Mittelwerte und die Variabilität von PMI und AS (Tab. 4.8). Es wurde von 3 Bullen insgesamt 18 Ejakulate und pro Ejakulat 5 Pailletten untersucht.

Tab. 4.8: Einfluss der Entleerungsmethode (P: Besamungspistole, S: Aufschneiden an beiden Seiten) auf die Plasmamembranintegrität (PMI) und die akrosomale Schädigung (AS). Es sind jeweils die Mittelwerte ( $\bar{X}$ ) und Variationskoeffizienten (VK) mit den dazugehörigen Standardabweichungen (SD) dargestellt.

<b>Parameter</b>	<b>Methode</b>	<b><math>\bar{X} \pm SD</math></b>	<b>VK <math>\pm</math> SD</b>
<b>PMI (%)</b>	P	43,1 $\pm$ 14,2	8,6 $\pm$ 4,4
	S	43,5 $\pm$ 12,6	8,5 $\pm$ 4,1
<b>AS (%)</b>	P	26,8 $\pm$ 12,6	6,7 $\pm$ 3,5
	S	27,5 $\pm$ 12,5	7,8 $\pm$ 3,8

## **5 DISKUSSION**

### **5.1 Einfluss des Zeitpunkts der Verdünnung und der Lagerung bis zur Abkühlung**

Da bei Voruntersuchungen die Beobachtung gemacht wurde, dass auf Besamungsstationen die Zeit vor der Verdünnung des Nativspermas im Wasserbad bei 32°C zwischen vier und sechsundzwanzig Minuten betrug und das verdünnte Sperma bis zum Abfüllen in Pailletten zwischen neun und vierundzwanzig Minuten bei Raumtemperatur gelagert, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Zeitpunkte der Verdünnung bzw. der Abfüllung auf die Spermaqualität bzw. Variabilität innerhalb der Pailletten des gleichen Ejakulates untersucht. Weder der Zeitpunkt des Verdünnens noch des Abfüllens in Pailletten hatte Auswirkungen auf die Spermaqualität und die Variabilität der Spermaqualität. Auch Sehner (2005) berichtete, dass nach Aufbewahrung des unverdünnten Spermas bei 32°C über 0 und 10 Minuten vor der Verdünnung keine Unterschiede in der Motilität und Plasmamembranintegrität der Spermien zu beobachten waren.

### **5.2 Einfluss der Abkühlgeschwindigkeit**

Um die Abkühlgeschwindigkeit und ihre Auswirkung auf die Spermaqualität zu beurteilen, wurden bei der vorliegenden Arbeit Proben vergleichend auf der Einfrierrampe und in einem Karton gekühlt, bevor sie anschließend im Rahmen des Versuches auf der Rampe eingefroren wurden. Die Abkühlung der im Karton gekühlten Proben erfolgte um 1,0°C/ Minute langsamer. Es konnte aber kein Unterschied zwischen den PMI- und AS-Werten der Spermien auf der Einfrierrampe und im Karton nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ähneln denen anderer Arbeiten beim Bullen. Januskauskas et al. (1999) kühlten Bullenspermien auf 4°C bei einer Geschwindigkeit von 4,2 °C/ Minute bzw. 0,1°C/ Minute und fanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Motilität, Plasmamembranintegrität und akrosomalen Schädigung. Dhami et al. (1992) fanden dagegen heraus, dass sich

schnelles Abkühlen nachteilig auf die Beweglichkeit und Überlebensrate nach dem Auftauen der Bullenspermien auswirkte. Dazu legten sie bei Raumtemperatur abgefüllte Pailletten in 10 °C kaltes Wasser und kühlten diese anschließend für 10 oder 30 Minuten auf 5°C. Da die Abkühlgeschwindigkeit in der Studie von Dhimi et al. (1992) deutlich schneller war als in der eigenen Arbeit und in derjenigen von Januskasukas et al (1999), könnten so die differierenden Ergebnisse zustande gekommen sein.

### **5.3 Einfluss der Lokalisation der Pailletten im Einfriergerät während der Kryokonservierung**

Es wurde festgestellt, dass das Umpacken der Pailletten nach der Kryokonservierung relativ lange dauerte und sich die Temperatur an einigen Orten im Einfriergerät erhöhte. Um zu überprüfen, ob diese Temperaturerhöhung einen Einfluss auf die Spermaqualitätsparameter hatte, wurden die Pailletten im Einfriergerät an verschiedenen Orten eingefroren. Ferner wurden in einem weiteren Versuch die Temperaturschwankungen durch teilweises Abdecken der Geräteöffnung mit einem Styropor®-Deckel während der Umlagerung der Pailletten reduziert. Es wurden jedoch keine Unterschiede in der Spermaqualität in Abhängigkeit vom Lagerungsort im Einfriergerät gefunden, weder bei komplett geöffnetem noch teilweise abgedecktem Einfriergerät während der Umlagerung der Spermien.

Eine ähnliche Studie bezüglich der Auswirkung der Lagerung der Spermapailletten an unterschiedlichen Orten im Einfriergerät wurde von Hagen (2009) mit Hengstsperma durchgeführt. In der genannten Arbeit wurde festgestellt, dass die im unteren Bereich des Einfriergerätes eingefrorenen Proben 2% mehr plasmamembranintakte Spermien aufwiesen. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant. Nach Parks und Graham (1992) gibt es tierartlich bedingte Unterschiede in der Kälteschockanfälligkeit der Spermien. Diese könnten auf die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der Plasmamembran bei den verschiedenen Spezies zurückzuführen sein. Die Widerstandsfähigkeit gegenüber Kälteschock ist bei Tierarten, deren



Spermienmembran durch ein hohes Sterol-Phospholipidverhältnis und hohe Sättigung von an Phospholipid gebundenen Acyl-Resten gekennzeichnet war, größer (Leite et al. 2010). Da Bullenspermien ein höheres Sterol-Phospholipidverhältnis aufweisen als Hengstspermien, könnte die dadurch bedingte erhöhte Kälteschockresistenz für die differierenden Ergebnisse zwischen der eigenen Studie und derjenigen von Hagen (2009) verantwortlich sein.

#### **5.4 Einfluss der Anzahl der eingefrorenen Pailletten**

Bei der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die vom technischen Laborpersonal der Besamungsstation (TPB) eingefrorenen Proben 2,3% weniger PMI Spermien im Vergleich zu von Duygu Calisici (DC) eingefrorenen Proben hatten, obwohl DC und das TPB die gleichen Einfrierprotokolle benutzten und vor und nach der Kryokonservierung nahezu die gleichen Bedingungen vorlagen. Ein Unterschied zwischen den von DC und TPB eingefrorenen Proben bestand darin, dass DC nur jeweils einige Pailletten einfrore, während das TPB das Einfriergerät vollständig mit Pailletten befüllte. Für die beobachteten Differenzen in der Spermaqualität könnte folglich die unterschiedliche Verteilung des Stickstoffdampfes im Einfriergerät als Erklärung dienen. Bei dem automatischen Einfriersystem wird bei der Stickstoffzuleitung der zerstäubte Stickstoff durch einen Turboventilator in der Kammer verteilt. Es könnte sein, dass sich der Stickstoffdampf in einem voll gelagerten Einfriergerät nicht gleichmäßig verteilen konnte. Dies könnte zu einem ungleichmäßigen Temperaturabfall im Einfriergerät und damit in den an unterschiedlichen Lokalisationen gelagerten Pailletten geführt haben.

Ferner benutzten DC und TPB dasselbe Einfriergerät nacheinander; die von DC eingefrorenen Proben wurden jeweils während des dritten oder vierten Einfriervorgangs eingefroren, während die Routineproben, vom TPB jeweils während der ersten beiden Einfriervorgänge kryokonserviert wurden. Folglich war bei den von DC behandelten Pailletten die Äquilibrationdauer um bis zu 4 Stunden länger. Leite et al. (2010) fanden heraus, dass bei

einer 4-stündigen Äquilibrierungszeit die Spermaproben höhere PMI- und Motilitätswerte aufwiesen als die Proben, die nur 0 bzw. 2 Stunden äquilibriert worden waren. Dieses Phänomen könnte ebenfalls die höheren PMI-Werte der von DC eingefrorenen Proben erklären.

### **5.5 Einfluss der Auftaugeschwindigkeit auf die Spermaqualität**

Bei der schnelleren Auftaugeschwindigkeit erhöhte sich der Anteil der PMI-Spermien, wohingegen sich der Anteil an AS-Spermien und die Variabilität innerhalb der Pailletten reduzierte. In der Literatur finden sich zur Fragestellung des Effekts der Auftaugeschwindigkeit auf die Spermaqualität unterschiedliche Ergebnisse. Wiggin und Almquist (1975) und Nur (2003) beobachteten beim Bullen (Nur et al. 2003, Rodriguez et al. 1975, Wiggin und Almquist 1975), Nöthling und Shuttleworth (2005) beim Hund einen geringeren Anteil akrosomengeschädigter Spermien bei einer Auftautemperatur von 70 °C bzw. 75 °C und einer Auftauzeit von 5 Sekunden im Vergleich zu Auftautemperaturen von 37°C bzw. 50°C und einer Auftauzeit von 30 bzw. 15 Sekunden. Auch die Motilität der Spermien war bei Bullen, Büffeln (Ahmad 1984), Schafböcken (Soderquist et al. 1997) und Rüden (Nothling und Shuttleworth 2005) beim schnellerem Auftauen erhöht. Eine mögliche Erklärung für diese positiven Effekte könnte die Vermeidung einer Rekristallisation von intrazellulärem Eis während des schnellen Auftauens sein (Mazur 1977). Werden Spermien zu langsam aufgetaut, sind sie zudem längere Zeit einer erhöhten Konzentration gelöster Stoffe und Kryoprotektiva ausgesetzt, was sich ebenfalls negativ auf die Zelle auswirkt (Robbins et al. 1976). Ferner ist bei einem langsamen Auftauprozess die Herstellung des Gleichgewichts der Elektrolyte zwischen intra- und extrazellulärem Milieu verlangsamt (Salomon und Maxwell 1995).

Im Gegensatz zu der eigenen und den oben zitierten Studien wurden in anderen Arbeiten mit unterschiedlichen Auftaugeschwindigkeiten von Spermien bei Bullen (Muino et al. 2008),

Schafböcken (Nordstoga et al. 2009, Paulenz et al. 2007, Paulenz et al. 2004), Hengsten (Borg et al. 1997) und Hirschen (Soler et al. 2003) keine Auswirkungen auf die Motilität, Morphologie, Plasmamembranintegrität und Fertilität beobachtet.

Diese differierenden Resultate könnten damit zusammenhängen, dass die optimale Auftaugeschwindigkeit auch vom Einfrierprozess abhängt und in den oben genannten Studien unterschiedliche Einfrierprozesse verwendet wurden. Ferner gibt es, wie unter 5.4 erwähnt, tierartliche Unterschiede in der Kälteempfindlichkeit der Spermien (Parks und Graham 1992).

### **5.6 Einfluss der Entleerungsmethode der Pailletten auf die Spermaqualität**

Während der künstlichen Besamung werden die Pailletten mit einer Besamungspistole entleert. Da bei Routinelaboruntersuchungen die Pailletten mit einer Besamungspistole bzw. durch Aufschneiden an beiden Seiten entleert werden, wurden in der vorliegenden Arbeit die Pailletten mit beiden Methoden entleert, um zu überprüfen, ob diese zu einem Unterschied in der Spermaqualität führen. Bisher wurde keine Arbeit über den Einfluss der Entleerungsmethode der Pailletten auf die Spermaqualität publiziert. Bei der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss der Entleerungsmethode auf die Spermaqualität bzw. Variabilität innerhalb der Pailletten des gleichen Ejakulates gefunden werden.

### **5.7 Schlussfolgerung**

In der vorliegenden Arbeit hat sich gezeigt, dass die Spermaqualität und dessen Variabilität vom Handling während des Einfriervorgangs und von der Geschwindigkeit des Auftauens beeinflusst wird. Da die Spermaqualität zwischen den Pailletten desselben Ejakulates aber in den vorliegenden Versuchen auch trotz Optimierung dieser Prozesse noch deutlich variierte, ist in weiteren Studien abzuklären, welche anderen Faktoren diese Variabilität verursachen.

## **6 ZUSAMMENFASSUNG**

Duygu Calisici (2011)

Einfluss der Handhabung auf die Variabilität in der Qualität kryokonservierten Spermas beim Bullen

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob und inwieweit die Variabilität in der Qualität kryokonservierten Spermas auf verfahrenstechnische Aspekte unmittelbar nach der Samengewinnung und -verdünnung, während des Abkühlens, des Einfrierens und Auftauens sowie des Entleerens der Pailletten zurückzuführen ist.

Dazu wurden sechs verschiedene Versuchsansätze durchgeführt, in denen die Spermaqualität durchflusszytometrisch anhand der Anteile plasmamembranintakter (PMI) sowie akrosomal geschädigter (AS) Spermien nach FITC-PNA/PI-Färbung erfasst wurde. Die Variabilität der Spermaqualität innerhalb derselben Ejakulate wurde mit Hilfe der Variationskoeffizienten (VK), die anhand von Einzelbestimmungen der PMI- und AS-Werte an je 5 Pailletten erhoben wurden, quantifiziert.

Im ersten Versuch wurden die Auswirkungen des Zeitpunkts der Verdünnung und der Lagerung bis zur Abkühlung an sechs Ejakulaten untersucht. Die Ejakulate wurden hierzu in drei Aliquots gesplittet. Die Proben des ersten Aliquots wurden unmittelbar nach der Beurteilung verdünnt und in Pailletten abgefüllt. Die Proben des zweiten Aliquots wurden ebenfalls unmittelbar nach der Beurteilung verdünnt, dann aber 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert, bevor sie in Pailletten abgefüllt wurden. Die Proben des dritten Aliquots wurden unmittelbar nach der Samengewinnung 30 Minuten in einem 32 °C warmen Wasserbad inkubiert, danach verdünnt und in Pailletten abgefüllt. Die Zeitintervalle zwischen Spermagewinnung, Verdünnung und Abfüllung des Samens in die Pailletten hatten keinen Effekt ( $P > 0.05$ ) auf die Mittel- und VK-Werte von PMI und AS.

Im zweiten Versuch wurden die Auswirkungen der Abkühlungsgeschwindigkeit untersucht. Für diese Studie wurden 76 Ejakulate von 10 Bullen aufbereitet, welche in zwei Aliquots aufgeteilt waren. Die Pailletten des ersten Aliquots wurden in einem Karton und die des zweiten Aliquots auf Metallrampen auf 4°C abgekühlt. Die Abkühlgeschwindigkeiten betragen im Karton 2,3°C/min und auf der Rampe 3,3°C/min. Zwischen den offen auf der Rampe und den im geschlossenen Karton abgekühlten Spermaproben bestanden keine Unterschiede ( $P > 0.05$ ) in den Mittel- und VK-Werten von PMI und AS.

Im dritten Versuch wurden die Auswirkungen der Zahl der während eines Einfriervorganges eingefrorenen Pailletten untersucht. Bei den Spermaproben, bei denen nur 60 Pailletten pro Einfrierprozess eingefroren wurden, waren die PMI-Mittelwerte höher ( $P < 0.05$ ) und die VK-Werte von PMI niedriger ( $P < 0.05$ ) als bei den Proben, bei denen gleichzeitig über 5000 Pailletten kryokonserviert worden waren. Die Mittel- und die VK-Werte von AS unterschieden sich nicht ( $P > 0.05$ ) in Abhängigkeit von der Zahl der eingefrorenen Pailletten.

Im vierten Versuch wurden die Auswirkungen der Lokalisation der Pailletten im Einfriergerät während der Kryokonservierung und einer teilweise Abdeckung der Öffnung des Einfriergerätes während der Umlagerung bestimmt. Dafür wurden 24 Ejakulate von 5 Bullen, welche im Einfriergerät an drei verschiedenen Orten (vorne oben = VO, hinten oben = HO und hinten unten = HU) platziert wurden, untersucht. Weder die Lokalisation der Spermien im Einfriergerät noch eine teilweise Abdeckung der Öffnung des Einfriergerätes wirkten sich auf die Mittel- und VK-Werte von PMI und AS aus ( $P > 0.05$ ).

Im fünften Versuch wurden die Auswirkungen der Auftaugeschwindigkeit untersucht. Hierfür wurden 83 Ejakulate von 21 Bullen verwendet. Die Proben wurden bei 37°C für 30 Sekunden (NG) bzw. bei 70°C für 5 Sekunden (HG) aufgetaut. Die PMI-Werte waren bei HG höher ( $P < 0.0001$ ) als bei NG und die VK-Werte niedriger ( $P < 0.01$ ) als bei NG. Die AS-Werte waren nach HG niedriger ( $P < 0.01$ ) als nach NG und die VK-Werte von AS höher ( $P < 0,05$ ) als nach NG.

Im sechsten Versuch wurden die Auswirkungen der Entleerungsmethode der Pailletten untersucht. Für den Versuch standen 18 Ejakulate zur Verfügung. Die Proben wurden durch Ausdrücken des Spermas mit Hilfe einer Besamungspistole (BP) bzw. durch Aufschneiden an beiden Enden der Pailletten (ASB) entleert. Die Entleerungsmethode hatte keine Effekte ( $P > 0.05$ ) auf die Mittel- und die VK-Werte von PMI und AS.

Zusammenfassend zeigt die Studie, dass eine hohe Zahl der während eines Prozesses eingefrorenen Pailletten sich negativ auf die Qualität sowie die Variabilität in der Qualität kryokonservierten Spermas auswirkt. Durch kurzes Auftauen bei hohen Temperaturen kann die Qualität verbessert und die Variabilität in der Qualität des Spermas reduziert werden.

## **7. SUMMARY**

Duygu Calisici (2011)

Effect of handling on the variability in quality of cryopreserved bovine sperm

The objective of this study was to evaluate the influence of process technology on the variability in quality of cryopreserved bovine sperm. The effects of time from semen collection to dilution, velocities of cooling, freezing and thawing as well as the method of emptying straws were analysed.

For the study six experiments were performed. Plasma membrane integrity (PMI) and acrosomal damage (AD) were evaluated by flow cytometry using the FITC-PNA/PI assay. Variability of sperm quality within the same ejaculate was examined by estimation of coefficient of variation (CV) from results of 5 straws in each batch.

In the first experiment in six ejaculates the effect of time of dilution and storage until cooling was analysed. The ejaculates were split into three aliquots: samples of the first aliquot were diluted and filled in straws immediately after assessment. Samples of the second aliquot were also diluted immediately after assessment but then stored for 30 minutes at room temperature before filling in straws. Samples of the third aliquot were stored immediately after semen collection for 30 minutes in a water bath with a temperature of 32°C before dilution and filling in straws. The time interval between semen collection, dilution and filling did not effect ( $P>0.05$ ) means and CV of PMI and AD.

In the second experiment the effects of cooling rate were analysed. Seventy-six ejaculates of 10 bulls were prepared and divided into two aliquots. The straws of the first aliquot were cooled to 4°C in a cardboard box and the straws of the second aliquot were cooled on commercial metal ramps. The cooling rates were 2.3°C/ min in the cardboard box and 3.3°C/

min. on the ramp. There were no differences ( $P > 0.05$ ) in means and CV of PMI and AD between semen samples cooled in the cardboard box and on the ramp, respectively.

In the third experiment the effect of the amount of straws in the freezer on semen quality was analysed. The freezing of a small amount of straws (60 straws) led to higher PMI values ( $P < 0.05$ ) and a lower CV of PMI ( $P < 0.05$ ) compared to the processing of more than 5000 straws at the same time. In contrast, there was no effect ( $P > 0.05$ ) on the number of frozen straws on means and CV of AD.

In the fourth experiment the effects of localisation of straws in the freezer and the effects of partially covering the aperture of the freezer during removal of straws were analysed. Twenty-four ejaculates of 5 bulls were localised at three different places in the freezer (front top = VO, rear upper = HU and rear lower = HO). Neither localisation of straws in the freezer, nor a partially covering of the aperture affected means and CV of PMI and AD ( $P > 0.05$ ).

In the fifth experiment the effect of thawing velocity on semen quality was analysed. Cryopreserved sperm samples (83 ejaculates of 21 bulls) were either thawed in a water bath with a temperature of 37 °C for 30 s (low temperature: LT) or with a temperature of 70 °C for 5 s (high temperature: HT). PMI values were higher after HT ( $P < 0.0001$ ) than after LT, but CVs were lower after HT ( $P < 0.01$ ) than after LT. In contrast, means of AD were lower after HT ( $P < 0.01$ ) and CVs of AD were higher after HT ( $P < 0.05$ ).

In the sixth experiment the effect of the emptying method of straws was examined. Eighteen ejaculates were used for this experiment. Five straws per ejaculate were emptied by insemination pistol (BP) or alternatively by cutting straws at both ends (ASB). The method of emptying showed no effect ( $P > 0.05$ ) on means and CVs of PMI and AD.

In summary, the study shows that a large amount of straws during the freezing process has a negative impact on quality and variability in quality of cryopreserved bovine sperm. On the other hand, short time thawing at high temperatures improves sperm quality and reduces the variability of semen quality.



## **8. LITERATURVERZEICHNIS**

- Ahmad K. Effect of thaw rates on survival of buffalo spermatozoa frozen straws. *J Dairy Sci.* 1984 Jul;67(7):1535-8.
- Ashworth PJ, Harrison RA, Miller NG, Plummer JM, Watson PF. Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectin binding in boar and ram sperm populations. *Mol Reprod Dev.* 1995 Feb;40(2):164-76.
- Bamba K, Cran DG. Effect of rapid warming of bull and rabbit semen. *J Reprod Fertil.* 1988 Mar;82(2):501-7.
- Bergeron A, Crete MH, Brindle Y, Manjunath P. 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.* 2004 Mar;70(3):708-17.
- Bochenek M, Smorag Z, Pilch J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology.* 2001 Sep 1;56(4):557-67.
- Bollwein H, Fuchs I, Weber F, Stolla R. Standardization of the quality of cryopreserved bovine semen samples using flow cytometry. 38 Jahrestagung für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung und 30 Veterinär- Humanmedizinischen Gemeinschaftstagung; Zürich, Schweiz 2005.
- Borg K, Colenbrander B, Fazeli A, Parlevliet J, Malmgren L. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology.* 1997 Sep;48(4):531-6.
- Bousseau S, Brillard JP, Marguant-Le Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology.* 1998 Oct 1;50(5):699-706.
- Dhami AJ, Sahni KL, Mohan G. Effect of various cooling rates (from 30 degrees C to 5 degrees C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos Taurus* and *Bos Bubalis* semen. *Theriogenology.* 1992 Sep;38(3):565-74.
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool.* 1993 Mar 15;265(4):432-7.
- Eddy EM, O'Brien DA. The spermatozoon (Chapter 2). In: KNOBIL EuJDN, editor. *The Physiology of Reproduction.* Raven Press Ltd. 1,1994. p. 29-77.
- Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci.* 2000;22(2-3):169-89.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.* 2002 Jan-Feb;23(1):25-43.

- Evenson DP, Thompson L, Jost L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*. 1994 Feb 2;41(3):637-51.
- Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Har J*. 2000;41(4):187-96.
- Garner DL, Thomas CA, Allen CH. Effect of semen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. *J Androl*. 1997 May-Jun;18(3):324-31.
- Gil J, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*. 2000 Jul 1;54(1):93-108.
- Golan R, Shochat L, Weissenberg R, Soffer Y, Marcus Z, Oschry Y, Lewin LM. Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using acridine orange staining. *Mol Hum Reprod*. 1997 Jan;3(1):47-54.
- Hagen C. Effekte der Aufbereitungstechnik und multipler Einfrier- und Auftauzyklen auf Vitalitätseigenschaften und Chromatinstruktur equiner Spermatozoen [Diss.]. Hannover: tierärztl. Hochsch.; 2009.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*. 1990 Jan-Feb;11(1):73-88.
- Harrison RA, Dott HM, Foster GC. Bovine serum albumin, sperm motility, and the "dilution effect". *J Exp Zool*. 1982 Jul 20;222(1):81-8.
- Herold FC, Aurich JE, Gerber D. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed and with Triladyl but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology*. 2004 Feb;61(4):715-24.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. 2000 Aug 18;62(1-3):3-22.
- Januskauskas A, Gil J, Soderquist L, Haard MG, Haard MC, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*. 1999 Sep;52(4):641-58.
- Kastelic JP, Thundathil JC. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim*. 2008 Jul;43 Suppl 2:368-73.
- Köß C, Bollwein H. Variability in plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and acrosomal status before and after cryopreservation of bull sperm. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 2008;121(1/2):73-7.
- Kumar S, Millar JD, Watson PF. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*. 2003 Jun;46(3):246-53.
- Leite TG, do Vale Filho VR, de Arruda RP, de Andrade AF, Emerick LL, Zaffalon FG, Martins JA, de Andrade VJ. Effects of extender and equilibration time on post-thaw

- motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim Reprod Sci.* 2010 Jul;120(1-4):31-8.
- Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci.* 2008 Apr;105(1-2):119-28.
- Lovelock JE. The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957 Dec 17;147(929):427-33.
- Mann T. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract.* London: Methuen and Co.; 1964.
- Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod.* 2004 Jul;71(1):28-37.
- Maxwell WM, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology.* 1999 Dec;52(8):1353-62.
- Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology.* 1977 Jun;14(3):251-72.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.* 1984 Sep;247(3 Pt 1):C125-42.
- Meistrich ML, Reid BO, Barcellona WJ. Changes sperm culei during sperimogenesis and epidymal maturation. *Exp Cell Res.* 1976 Apr;99(1):72-8.
- Muino R, Rivera MM, Rigau T, Rodriguez-Gil JE, Pena AI. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Anim Reprod Sci.* 2008 Dec;109(1-4):50-64.
- Mytzka C. Vergleichende Untersuchungen von Verdünnern zur Spermakonservierung bei Bulle, Schafbock und Ziegenbock unter besonderer Berücksichtigung von pH-Wert und Osmolalität [Vet. Med. Diss.]. München 1988.
- Nordstoga AB, Soderquist L, Adnoy T, Paulenz H. Effect of different packages and freezing/thawing protocols on fertility of ram semen. *Reprod Domest Anim.* 2009 Jun;44(3):527-31.
- Nothling JO, Shuttleworth R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology.* 2005 Mar 15;63(5):1469-80.
- Nur Z, Dogan I, Soylyu MK, Ak K. Effect of different thawing procedures on the quality of bull semen. *Revue Méd Vét.* 2003;154(7):487-90.
- Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 1992 Aug;38(2):209-22.
- Paulenz H, Adnoy T, Soderquist L. Comparison of fertility results after vaginal insemination using different thawing procedures and packages for frozen ram semen. *Acta Vet Scand.* 2007;49:26.

- Paulenz H, Soderquist L, Adnoy T, Nordstoga A, Gulbrandsen B, Berg KA. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. *Theriogenology*. 2004 Jun;61(9):1719-27.
- Petyim S, Choavaratana R. Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. *J Med Assoc Thai*. 2006 Mar;89(3):306-13.
- Robbins RK, Saacke RG, Chandler PT. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. *J Anim Sci*. 1976 Jan;42(1):145-54.
- Robertson L, Watson PF. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J Reprod Fertil*. 1986 May;77(1):177-85.
- Rodriguez OL, Berndtson WE, Ennen BD, Pickett BW. Effect of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *J Anim Sci*. 1975 Jul;41(1):129-36.
- Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 2000 Aug 18;62(1-3):77-111.
- Salomon S, Maxwell WMC, editors. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination 1995: *Animal Reproduction Science*
- Schlösser FM, Hinsch E, Böhm J, Schill WB, Hinsch KD. Untersuchungen an einem eidotterfreien Verdünnungsmedium für die Tiefgefrierkonservierung von Bullensperma. *Tierärztliche Praxis*. 1995;23:363-6.
- Sehner R. Untersuchungen zum Einsatz modifizierter Medien und Bedingungen bei der Konservierung von Bullensperma. München: Ludwig Maximilians Universität München; 2005.
- Silva PF, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 2006 Mar 15;65(5):958-78.
- Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972 Feb 18;175(23):720-31.
- Sinowatz F. Morphologie und Histologie der männlichen Geschlechtsorgane. In: Holzman WBUA, editor. *Veterinärmedizinische Andrologie*. Verlag Schattauer, Stuttgart, New York 2001. p. 1-22.
- Soderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H. Assessment of ram sperm membrane integrity following different thawing procedures. *Theriogenology*. 1997 Nov;48(7):1115-25.
- Soler AJ, Garcia AJ, Fernandez-Santos MR, Estes MC, Garde JJ. Effects of thawing procedure on postthawed in vitro viability and in vivo fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196 degrees C. *J Androl*. 2003 Sep-Oct;24(5):746-56.
- Swanson EW, H. A. Herman. Variations in Bull Semen and Their Relation to Fertility. *Missouri College of Agriculture Journal*. 1940;69.

- Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci.* 2000 Aug 18;62(1-3):23-53.
- Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod.* 1991 Apr;44(4):569-74.
- Waterhouse KE, Gjeldnes A, Tverdal A, De Angelis PM, Farstad W, Haard M, Kommisrud E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. *Anim Reprod Sci.* 2010 Jan;117(1-2):34-42.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(4):871-91.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000 Jul 2;60-61:481-92.
- Weitze KF. Prinzipien der Verdünnung und Konservierung. In: Busch W, Holzmann A, editors. *Veterinärmedizinische Andrologie.* Stuttgart, New York: Schattauer Verlag; 2001. p. 511-3.
- Wiggin HB, Almquist JO. Effect of glycerol equilibration time and thawing rate upon acrosomal maintenance and motility of bull spermatozoa frozen in plastic straws. *J Anim Sci.* 1975 Feb;40(2):302-5.
- Woelders H, Malva AP. How Important is the Cooling Rate in Cryopreservation of (Bull) Semen, and what is its Relation to Thawing Rate and Glycerol Concentration. *Reprod Dom Anim.* 1998;33:299-305.
- Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology.* 2004 Apr;48(2):146-56.

## **9. ANHANG**

### **9.1 Medien**

#### **9.1.1 Tyrode Medium**

(in Anlehnung an ASHWORTH et al. 1995)

- NaCl	5,844 g pro 1000 ml
- KCl	0,231 g pro 1000 ml
- CaCl <sub>2</sub>	0,294 g pro 1000 ml
- MgCl <sub>2</sub>	0,081 g pro 1000 ml
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,061 g pro 1000 ml
- Na-Pyruvat	0,110 g pro 1000 ml
- Na-Laktat Syrup	4,04 ml
- Hepes	2,383 g pro 1000 ml
- Penicillin K	0,050 g pro 1000 ml
- PVP	0,500 g pro 1000 ml
- PVA	0,500 g pro 1000 ml
- NaHCO <sub>3</sub>	2,100 g pro 1000 ml

Der pH-Wert war stets auf 7,4 und die Osmolarität auf 320 mOsm eingestellt.

Das Tyrode-Medium wurde bei allen Färbungen exklusive dem Spermachromatinstruktur-Assay (SCSA™) zur Verdünnung des Spermas eingesetzt.

### 9.1.2 TNE Puffer

TNE-Puffer 10x, pH 7,4

- Tris-HCl                                      0,01 M, 9,48 g pro 600 ml (Trizma Base, Fa. Sigma-Aldrich, München, Deutschland, T-1503)
- NaCl    0,15 M, 52,6 g pro 600 ml
- EDTA    1 mM, 2,23 g pro 600 ml (Sigma-Aldrich, München, Deutschland, EDS 100 g)
- mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt

TNE-Puffer 1x, pH 7,4

- Aqua bidest                                    90 ml
- TNE-Puffer 10x                                10 ml

Um die Konzentration des Spermias für die Spermachromatinstrukturanalyse (SCSA™) auf  $2 \times 10^6$ / ml einzustellen, wurde TNE-Puffer 1x verwendet.

## 9.2 Chemikalien

9.2.1 Calcium-Ionophor A23187

- 0,715 mM
- Bezug: Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Best. Nr. C 7522

### 9.2.2 Säuredetergenz-Lösung (pH 1,2)

- Aqua bidest 300 ml
- NaCl 0,15 M, 4,39g pro 500 ml (Sigma-Aldrich, München, Deutschland, Best. Nr. S-7653)
- 0,1% Triton-X 0,5 ml pro 500 ml (Sigma-Aldrich, München, Deutschland, Best. Nr. X-100)
- HCl 2,0 N, 20 ml pro 500 ml
- Aqua bidest. ad 500 ml
- mit 5N HCl auf pH 1,2 eingestellt
- Lagerung bei 4°C

## 9.3 Fluochrome

### 9.3.1 FITC-PNA

- 100 µg pro ml Aqua dest.
- Bezug: Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Best. Nr. L 7381

### 9.3.2. Propidiumiodid (PI)95 – 98 %

- 2,99 mM
- Bezug: Sigma-Aldrich, München
- Best. Nr. P 4170



### 9.3.3 Akridinorange

#### 0,1 M Citric acid Puffer

- Citric acid monohydrate 21,01 g pro 1000 ml (Sigma-Aldrich, München, Deutschland, Best. Nr. C-1909)
- Aqua bidest. ad 1000 ml
- Lagerung bei 4°C

#### 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer

- Sodium phosphate dibasic 28,4 g pro 1000 ml (Sigma-Aldrich, München, Deutschland, Best. Nr. S-7907)
- Aqua bidest. ad 1000 ml
- Lagerung bei 4°C

#### Färbepuffer pH 6,0

- Citric acid-Puffer 0,1 M, 370 ml
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer 0,2 M, 630 ml
- EDTA 1 mM; 372 mg
- NaCl 0,15 M, 8,77 g
- mit konzentrierter NaOH auf pH 6,0 eingestellt
- Lagerung bei 4°C

#### Acridine Orange (AO)-Stammlösung (1 mg/ml)

- AO 10 mg pro 10 ml (Polysciences, Eppelheim, Deutschland, 04539)
- Aqua bidest 10 ml
- Lagerung bei 4°C

#### Acridin Orange – Gebrauchslösung

- Färbepuffer 100 ml, pH 6
- AO-Stammlösung 600 µl
- Lagerung bei 4° C, während der Färbung auf Eis gelagert

#### **9.4 Herstellung der Spermisuspensionen in Abhängigkeit von der Verdünnung**

Für die Beurteilung der Plasmamembranintegrität und des positiven akrosomalen Status sowie der Induzierbarkeit der Akrosomenreaktion wurde mittels Tyrode-Medium eine verdünnte Spermisuspension einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Spermien/ml hergestellt. Abhängig von der Spermienkonzentration der Paillette wurde folgende Menge verwendet:

Bei  $60 \times 10^6$  Spermien/ml: 41,2 µl Sperma und 458 µl Tyrode – Puffer

Für den SCSA™ wurde die Ausgangskonzentration mit Hilfe eines eisgekühlten TNE-Puffers auf  $2 \times 10^6$  Spermien/ml verdünnt. Abhängig von der Spermienkonzentration der Paillette wurde folgende Menge verwendet:

Bei  $60 \times 10^6$  Spermien/ml: 6,7 µl Sperma und 193,3 µl TNE – Puffer

#### **9.5 Geräte und Materialien**

- stumpfe Pinzette
- Schere
- Eppendorff-Gefäße 1,5 ml (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Wasserbad mit Temperaturregelung (Fa. Lauda, Lauda – Königshofen, Deutschland)

- Thermometer
- Stoppuhr
- Heizblock (Fa. Kleinfeld, Gehrden, Deutschland)
- Eppendorff-Pipetten (1000  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 5  $\mu$ l)
- Pipettenspitzen weiss (10 $\mu$ l) gelb (100  $\mu$ l) und blau (1000  $\mu$ l) (Fa. Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland)
- Zentrifuge (Typ Biofuge Fresco, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Flow-Röhrchen (Fa. Beckman Coulter, Fullerton, Californien, USA)
- Styroporgefäß
- Vortexer (Typ Lab Dancer Orbital Shaker, Fa. IKA®, Staufen, Deutschland)

## **DANKSAGUNGEN**

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Heinrich Bollwein für die Überlassung des Themas und die persönliche Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Erwin Hasenpusch und der Rinderzucht Schleswig-Holstein eG danke ich für die Bereitstellung der Materialien.

Vielen Dank dem Besamungsverein Neustadt a.d. Aisch für die Überlassung der Spermaproben.

Als nächstes möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Bullenstation in Schönböken bedanken. Namentlich erwähnen möchte ich Madlen Sauer, Gudrun Schuchnelski, und Wiebke Timm. Ich war sehr gerne bei Euch, es war eine schöne Zeit.

Danke Evrim, dass es dich in meinem Leben gab. Ich vermisse dich sehr...

Vielen Dank an Burcu Cinar, Dr. Mahnaz Ekhlesi-Hundrieser und Christel Hettel für die nette Freundschaft an der Rinderklinik.

Einen großen Dank an Sarah Esser für das Korrekturlesen und die grenzenlose Unterstützung und Motivation bei der Anfertigung der Dissertation.

Ich danke ganz herzlich meinen Eltern Olcay und Mesut Karul. Ihr standet während einer besonders schweren Zeit unerschütterlich an meiner Seite. Ohne Euch wäre diese Arbeit nie zustande gekommen. (Sevgili annem ve babam, herzaman yanimda oldugunuz ve bana sonsuz

desteklerinizi esirgemediginiz icin can- 1 gönülden tesekkür ederim. Sizin destekleriniz olmadan bu calismayi bitirmem mümkün olmazdi.)

Vielen Dank lieber Opa, dass du immer für mich da warst und bist, immer an mich geglaubt hast und mich immer unterstützt hast. (Benim canim dedem, her zaman yanimda oldugun, bana inandigin ve destek verdigin icin cok tesekkür ederim.)

Meine lieben Tanten Tülay Karabagli, Nilgün Edar und Sevgi Hamarat; ich danke Euch allen, dass ihr immer für mich da wart. (Sevgili teyzelerim Tülay Karabagli, Nilgün Edar ve Sevgi Hamarat her zaman yanimda oldugunuz icin tesekkür ederim.)

Und als letztes möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner kleinen Familie bedanken. Dir Oguz danke ich für Deine unendliche Hilfe, grenzenlose Motivation und Dein liebevolles Verständnis. Gut zu wissen, dass Du immer für mich da bist.

Mein kleiner liebbling Cem, danke dass Du mein Leben versüßt hast. Durch Dich und Dein zauberhaftes Lächeln scheint die Sonne an jedem Tag.