

Aus dem Institut für Tierzucht Mariensee  
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig

**Anpassung der Konservierungsprozesse für Hengstsperma an die  
Beltsville Sperm Sexing Technology**

INAUGURAL-DISSERTATION  
Zur Erlangung des Grades eines  
DOKTORS DER VETERINÄRMEDIZIN  
-Doctor medicinae veterinariae-  
(Dr.med.vet.)

Vorgelegt von  
Peter Heer  
(Lennestadt)

Hannover 2007

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. med.vet. D. Rath

1. Gutachter: Prof. Dr. med.vet. D. Rath
  2. Gutachter: Prof. Dr. med.vet. B. Meinecke
- Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2007

Diese Arbeit ist Teil der Kooperationsprojekte des Virtuellen Zentrums für Reproduktionsmedizin Niedersachsen an der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

**Meiner Familie**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>3</b>
2.1	Geschlechtsspezifische Selektion .....	3
2.1.1	Geschichtlicher Verlauf.....	3
2.1.2	Techniken zur selektiven Anreicherung von X- und Y-Chromosomen tragenden Spermien.....	4
2.1.3	Durchflusszytometrische Spermisortierung.....	9
2.1.3.1	Entwicklung.....	9
2.1.3.2	Kommerzialisierung von geschlechtsspezifisch sortiertem Sperma.....	14
2.1.3.3	Einsatz von geschlechtsspezifisch sortiertem Sperma in der Pferdezucht.....	15
2.1.3.4	Funktionsprinzip des Spermiasorters / Ablauf des Sortiervorgangs.....	16
2.1.3.5	Auffangmedien .....	19
2.1.3.6	Auswirkungen des Sortiervorganges auf die Spermaqualität.....	20
2.2	Kryokonservierung von Hengstsperma.....	24
2.2.1	Geschichtlicher Verlauf.....	25
2.2.2	Tiefgefrierverdünner für geschlechtsspezifisch sortiertes Hengstsperma.....	25
2.2.2.1	Bestandteile eines Tiefgefrierverdünners.....	25
2.2.2.1.1	Antioxidantien (AO).....	27
2.2.3	Selektive Separationsverfahren zur Erzielung qualitativ hochwertiger Spermienpopulationen.....	28
2.2.4	Temperaturverlauf während des Einfriervorgangs .....	31
2.3	Beurteilung qualitätsrelevanter Parameter von Hengstsperma.....	34
2.3.1	Motilität.....	35
2.3.2	Flowzytometrische Untersuchungen.....	36
2.3.2.1	Plasmamembranintegrität.....	36
2.3.2.1.1	Techniken zur Bestimmung der Plasmamembranintegrität.....	37
2.3.2.2	Akrosomenintegrität.....	38
2.3.2.2.1	Techniken zur Bestimmung der Akrosomenintegrität .....	38
2.3.2.3	Mitochondrienmembranpotential.....	39
2.3.2.3.1	Techniken zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials.....	39
2.3.2.4	DNA-Integrität.....	40
2.3.2.4.1	Techniken zur Bestimmung der DNA-Integrität.....	40
<b>3</b>	<b>Material &amp; Methoden .....</b>	<b>43</b>
3.1	Ejakulatgewinnung.....	43
3.2	Untersuchung des Nativspermas.....	43
3.3	Beurteilungsmethoden.....	44
3.3.1	Mikroskopische Untersuchung .....	44
3.3.1.1	Motilität .....	44
3.3.1.2	Morphologie .....	45

3.3.2	Flowzytometrische Untersuchungen.....	46
3.3.2.1	Bestimmung des akrosomalen Status & der Plasmamembranintegrität .....	47
3.3.2.2	Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials .....	49
3.3.2.3	Bestimmung der DNA-Integrität .....	50
3.4	Spermaaufbereitung .....	51
3.4.1	Aufbereitung der Kontrollproben .....	51
3.4.2	Aufbereitung der zu sortierenden Proben.....	52
3.4.3	Aufbereitung der Halteproben .....	55
3.4.4	Aufbereitung der Proben zur PureSperm <sup>®</sup> -Dichtegradientenzentrifugation .....	55
3.5	Durchflusszytometrische Sortierung.....	56
3.6	Tiefgefrierung.....	56
3.7	Versuche .....	57
3.7.1	1. Versuchsteil: Vergleich eines herkömmlichen Tiefgefrierverdünners und eines Tiefgefrierverdünners mit Zusatz von Antioxidantien (AO) auf sortiertes und kryokonserviertes Hengstsperma.....	57
3.7.2	2. Versuchsteil: Vergleich zweier Auffangmedien und zweier Temperaturverlaufskurven bei der Tiefgefrierung von sortiertem Hengstsperma ...	60
3.7.3	3. Versuchsteil: Untersuchung der qualitativen Selektion von Hengstspermien durch Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) über einem PureSperm <sup>®</sup> -KMT-Gradienten .	63
3.7.4	4. Versuchsteil: Vergleich zweier Zentrifugationmethoden zur Aufbereitung von Hengstspermien zur geschlechtsspezifischen Sortierung mit anschließender Kryokonservierung.....	64
3.8	Statistische Auswertung .....	67
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>69</b>
4.1	1. Versuchsteil .....	69
4.1.1	Morphologie .....	69
4.1.1.1	Morphologisch unveränderte Spermien .....	69
4.1.1.2	NAR-Spermien .....	71
4.1.2	Motilität .....	73
4.1.2.1	Zeitpunkt 2.....	73
4.1.2.2	Zeitpunkt 3.....	73
4.1.3	Vitalität & Akrosomenintegrität .....	79
4.1.3.1	PI positive Spermien .....	79
4.1.3.2	PI negative & FITC-PNA negative Spermien .....	80
4.1.3.3	PI negative & FITC-PNA positive Spermien.....	81
4.1.4	Mitochondrienmembranpotential.....	82
4.1.5	Spermienchromatinstruktur .....	84
4.1.5.1	DNA-Fragmentationsindex .....	84
4.2	2. Versuchsteil .....	86
4.2.1	Morphologie .....	86
4.2.1.1	Morphologisch unveränderte Spermien .....	86

4.2.1.2	NAR-Spermien .....	87
4.2.2	Motilität .....	89
4.2.2.1	Zeitpunkt 2.....	89
4.2.2.2	Zeitpunkt 3:.....	90
4.2.3	Spermienchromatinstruktur .....	96
4.2.3.1	DNA-Fragmentationsindex .....	96
4.3	3.Versuchsteil .....	99
4.3.1	Morphologie .....	99
4.3.1.1	Morphologisch unveränderte Spermien .....	99
4.3.1.2	NAR-Spermien .....	99
4.3.2	Motilität .....	100
4.3.3	Vitalität & Akrosomenintegrität .....	101
4.3.3.1	PI positive Spermien .....	101
4.3.3.2	PI negative & FITC-PNA negative Spermien .....	101
4.3.3.3	PI negative & FITC-PNA positive Spermien.....	102
4.3.4	Mitochondrienmembranpotential.....	102
4.4	4.Versuchsteil .....	103
4.4.1	Morphologie .....	103
4.4.1.1	Morphologisch unveränderte Spermien .....	103
4.4.1.2	NAR-Spermien .....	104
4.4.2	Motilität .....	105
4.4.3	Vitalität & Akrosomenintegrität .....	108
4.4.3.1	PI positive Spermien .....	108
4.4.3.2	PI negative & FITC-PNA negative Spermien .....	109
4.4.3.3	PI negative & FITC-PNA positive Spermien (Zp.3) .....	109
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>121</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>124</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>147</b>
9.1	Stallion Sheath Fluid .....	147
9.2	INRA 82 .....	148
9.3	Hancock-Lösung.....	148
9.4	Tyrode-Medium .....	149
9.5	KMT .....	150
<b>10</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>151</b>
<b>11</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>151</b>

## Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AO	Antioxidantien
Aqua bidest.	Aqua bidestilata: <lat.> doppelt destilliertes Wasser
BHT	Butylated Hydroxy Toluene: <engl.> Butyliertes Hydroxytoluen
BSA	Bovines Serumalbumin
BSST	Beltsville Sperm Sexing Technology
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CCCD	Centrifugal Countercurrent Distribution
CCD	Countercurrent Distribution
CTC	Chlortetracyclin
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
DFI	DNA-Fragmentationsindex
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation
d.h.	das heißt
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
et al.	et alii: <lat.> und andere
evtl.	eventuell
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
xg	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde



ICSI	Intracytoplasmatic Sperm Injection: <engl.> Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
i.d.R.	in der Regel
I.E.	Internationale Einheiten
IVF	In vitro Fertilisation
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin-iodid
KMT	Kenny's modified Tyrode
min.	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Mitochondrienmembranpotential
mod.	modifiziert
mW	Milliwatt
n	Anzahl, Gruppengröße
NaCl	Natriumchlorid
NAR	Normaler akrosomaler Rand
nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline: <engl.> phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction: <engl.> Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	Pondus Hydrogenii: <lat.> negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumjodid
PNA	Peanut Agglutinin
PS	PureSperm <sup>®</sup> (Fa. Nidacon, Göteborg, Schweden)
Psi	Pounds / square inch (Pfund / Zoll <sup>2</sup> )
ROS	Reactive Oxygen Species: <engl.> Reaktive Sauerstoffspezies
s.	siehe

SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay: <engl.> Spermienchromatinstruktur-Analyse
SD	standard deviation: <engl.> Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
Sort+AO	Probe die, je nach Versuchszeitpunkt, zur flowzytometrischen Sortierung vorgesehen war oder bereits sortiert wurde und mit Antioxidantien enthaltenden Verdünnermedien aufbereitet wurde
Sort-Kontrolle	wie „Sort+AO“; Aufbereitung jedoch mit Verdünnermedien ohne Antioxidantien
TGV+AO	Tiefgefrierprobe die mit Antioxidantien enthaltenden Verdünnermedien aufbereitet wurde und nicht flowzytometrisch sortiert wurde
TGV-Kontrolle	wie „TGV+AO“, Aufbereitung jedoch mit Verdünnermedien ohne Antioxidantien
Std.	Stunde, Stunden
Tab.	Tabelle
TG	Tiefgefrierung
TG-Verdünner	Tiefgefrierverdünner
UV	Ultraviolett
W	Watt
Wdh	Wiederholungen
$\bar{x}$	Mittelwert
z.B.	zum Beispiel
Zp.	Zeitpunkt
z.T.	zum Teil

# 1 Einleitung

Während des letzten Jahrzehnts ließ sich eine enorme Entwicklungssteigerung neuer reproduktiver Biotechnologien beobachten. Einige dieser Technologien sind bereits von der Zuchtindustrie aufgegriffen worden, während die Integration bei anderen Technologien langsamer verläuft und einige sich vermutlich nie etablieren werden. Wie schnell diese Biotechnologien von der Pferdezucht aufgenommen und benutzt werden, hängt vom Erfolg dergleichen, der Haltung von Züchtern und Tierärzten diesen gegenüber und dem Kosten-Nutzen-Verhältnis ab (SQUIRES 2005).

Aufgrund der wachsenden internationalen Bedeutung der großen Pferdezuchtverbände finden neue Reproduktionstechniken, vor allem im Warmblutbereich, immer wieder schnellen Anklang bei ambitionierten Züchtern und engagierten Tierärzten. So ist das Interesse an der Bestimmung des Geschlechts der Nachkommen beim Pferd aus mehreren Gründen besonders hoch. Zum einen ist der Ertrag an Nachkommen durch eine lange Generationsdauer und den Umstand, dass Pferde unipare Tiere sind, sehr begrenzt. Zum anderen kann sich aber auch der finanzielle Wert der Nachkommen je nach Geschlecht erheblich unterscheiden, so dass es für den betreffenden Züchter von großem Interesse ist, ob bei der Anpaarung ein Hengst- oder ein Stutfohlen fällt. In einigen Pferdewettkampfdisziplinen bevorzugen die Reiter eher männliche oder aber eher weibliche Tiere. So werden z.B. im Vielseitigkeitssport eher Wallache bevorzugt, während Poloreiter Stuten vorziehen (ALLEN 2005). Für den Zuchtfortschritt ist es außerdem sehr förderlich, wenn der sehr kleine Pool an international erfolgreichen Stuten Hengstfohlen produziert, da somit die Gene dieser Stuten wesentlich besser und vor allem schneller in der Population verbreitet werden können. Zuchtverbände, die entsprechende Methoden anerkennen, beschleunigen also damit ihren Zuchtfortschritt und sichern sich somit einen entscheidenden Vorsprung zu solchen, die diese Methoden ablehnen. Ihren Züchtern bieten sie dadurch auf Dauer einen Vorteil im internationalen Wettbewerb beim Absatz ihrer Zuchtprodukte.

Durch die Entwicklung von speziellen Besamungsverfahren für Stuten mit einer relativ geringen Spermienmenge, entstehen neue Möglichkeiten für das Management von Hengsten und deren Sperma (SQUIRES 2005).

Der unterschiedliche DNA-Gehalt von X- bzw. Y-Chromosom tragenden Spermatozoen ist der einzig etablierte Unterschied, der zur Trennung derselben genutzt werden kann (JOHNSON et al. 1987b). Die Beltsville Sperm Sexing Technology (BSST) ist derzeit die einzige verlässliche Methode zur Verschiebung des Geschlechterverhältnisses bei Nutztiernachkommen (JOHNSON et al. 1999; MAXWELL et al. 2004). Bis zu 40 000 Tiere verschiedener Säugetierspezies wurden in den letzten 20 Jahren nach künstlicher Besamung mit geschlechtsspezifisch sortiertem Sperma geboren (JOHNSON et al. 2005). Bislang ist jedoch nur beim Rind die BSST bis zur kommerziellen Anwendung weiterentwickelt worden (MAXWELL et al. 2004). Die praktische Anwendung von geschlechtsspezifisch sortiertem Sperma hängt vom Kosten-Nutzen-Verhältnis, Fruchtbarkeitsergebnissen, Effizienz und der Anwendungsfreundlichkeit ab (MAXWELL et al. 2004).

Da die Beltsville Sperm Sexing Technologie ein sehr aufwendiges und auch teures Verfahren darstellt, ist es oft schwierig Ovulationszeitpunkt der zu besamenden Stute mit einem Sortiertermin zu koordinieren. Erschwerend kommt hinzu, dass sich der ausgewählte Hengst, die zu besamende Stute und der entsprechende Sorter i.d.R. nicht am gleichen Ort befinden und, dass der Sortierprozess für eine Besamungsdosis auch mit modernen Sortierern immer noch mehrere Stunden dauert. Folge dieser Umstände ist oft, dass zur Ovulation kein oder nicht ausreichend sortiertes Sperma zur Verfügung steht. Eine kommerzielle Nutzung von geschlechtsspezifisch sortiertem Hengstsperma lässt sich nicht etablieren, solange diese Probleme bestehen.

Wäre es möglich geschlechtsspezifisch sortiertes Hengstsperma in der Art einzufrieren, dass eine ausreichende Fruchtbarkeit erhalten bliebe, so würde man einer kommerziellen Nutzung einen großen Schritt näher kommen. In diesem Falle könnte die Besamung, vom Sorterstandort und dessen Verfügbarkeit unabhängig, direkt zum Ovulationszeitpunkt erfolgen. Somit wäre ein wesentlich breiterer Einsatz von geschlechtsspezifisch sortiertem Hengstsperma in der Pferdezucht möglich. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, bestehende Kryokonservierungsverfahren für Hengstsperma den Anforderungen geschlechtsspezifisch sortierter Proben anzupassen und die Auftauqualität auf das Niveau von nicht sortiertem Sperma anzuheben.

## 2 Literatur

### 2.1 Geschlechtsspezifische Selektion

#### 2.1.1 Geschichtlicher Verlauf

Eine erste Beschreibung von „Sperma“ und dessen Rolle für die Zeugung von Nachkommen erfolgte durch HIPPOKRATES (460 – 377 BC). Hippokrates glaubte, dass Sperma von beiden Geschlechtern produziert wird und dass „starkes Sperma“ zur Entwicklung eines männlichen Nachkommens und „schwaches Sperma“ zur Entwicklung eines weiblichen Nachkommens führen würde. Eine Identifikation der Spermien wurde erst durch die Erfindung des Mikroskops durch A. VAN LEEUWENHOEK (1632-1723) möglich. VAN LEEUWENHOEK beschrieb 1677 als erster Spermatozoen von Insekten und Menschen.

Eine mikroskopische Identifikation von Geschlechtschromosomen wurde zuerst 1910 von GUYER (1910) dokumentiert. Beim Säugetier bestimmt, im Gegensatz zum Vogel, das befruchtende Spermium das genetische Geschlecht der Nachkommen. Dieser Vorgang wird deshalb als sygame Geschlechtsbestimmung bezeichnet (SCHNORR 1996). Da Spermien einen haploiden Chromosomensatz besitzen, enthalten sie auch nur ein Geschlechtschromosom, also entweder ein X-Chromosom, auch als X-Gonosom (weiblich determinierend = Gynäkospermium) bezeichnet, oder ein Y-Chromosom bzw. Y-Gonosom (männlich determinierend = Androspermium) (SCHNORR 1996). Aufgrund dieser Erkenntnis wurde nach einer Möglichkeit zur Differenzierung zwischen X- und Y-Chromosom tragenden Spermien gesucht. Diverse Versuche wurden unternommen um morphologische, physikalische, physiologische, biochemische (THORMÄHLEN 1973; AMANN 1989) und immunologische (AMANN 1989; BLECHER et al. 1999) Unterschiede zur Differenzierung zu nutzen. Eine verlässliche und reproduzierbare Trennung zwischen den X- und Y-Chromosom tragenden Spermienpopulationen wurde jedoch erst durch die Entwicklung der „Beltsville Sperm Sexing Technology“ (BSST) ermöglicht (JOHNSON u. PINKEL 1986).

### 2.1.2 Techniken zur selektiven Anreicherung von X- und Y-Chromosomen tragenden Spermien

Der einzige nachgewiesene Unterschied zwischen X- und Y-Chromosomen tragenden Spermien ist ihr Gehalt an DNA in den Geschlechtschromosomen. Dieser Unterschied kann über flowzytometrische Analysen festgestellt werden (JOHNSON u. PINKEL 1986; JOHNSON et al. 1989).

Immer wieder wurden physikalische, biochemische und immunologische Verfahren zur Samenbehandlung vorgeschlagen, um das Geschlechterverhältnis der Nachkommen zu verschieben. Keines dieser Verfahren konnte jedoch bisher, aufgrund nachfolgender Fruchtbarkeit, den Beweis erbringen, dass das Verhältnis zwischen X- und Y-Chromosom tragenden Spermien verschoben wurde (JOHNSON et al. 1989).

ERICSSON et al. (1973) berichtet über eine Anreicherung von humanen Y-Chromosom tragenden Spermatozoen durch eine sogenannte „Gradient Swim-Down Procedure“. Bei diesem Verfahren wird davon ausgegangen, dass Y-Chromosom tragende Spermien eine größere, abwärtsgerichtete Schwimgeschwindigkeit besitzen. Die Spermien werden auf einen Dichtegradienten von humanem Serumalbumin gegeben und Y-Chromosom tragende Spermien sollen sich, durch die oben genannte Eigenschaft, schneller durch dieses Medium bewegen und demnach früher am Boden des Gradienten ansammeln. Mittels dieser Methode konnte der Anteil an männlichen Neugeborenen auf 72 bis 76% gesteigert werden (BEERNINK et al. 1993). Durch Einsatz von Clomiphencitrat zur Ovulationsinduktion erreichte der Anteil weiblicher Nachkommen lediglich einen maximalen Wert von 69% (BEERNINK et al. 1993). Die erhaltene Verschiebung des Geschlechterverhältnisses ist zwar laut Autor signifikant, jedoch stellt sie eine sehr unzuverlässige Methode dar, wenn man bedenkt, dass immer noch 31% der Nachkommen das nicht erwünschte Geschlecht haben. Diese Technik wurde ansonsten bisher nur beim Rind angewendet (BEAL et al. 1984), jedoch konnte bei dieser Spezies keine Trennung der X- und Y-Chromosom tragenden Spermienpopulationen erzielt werden.

HERRMANN et al.(1999) beobachteten eine nicht-mendelsche Vererbung des t-Haplotyps von Chromosom 17 männlicher Mäuse, bei welchen der t-Komplex als t-Haplotyp heterozygot vorliegt (Der t-Komplex existiert einmal als Wilotyp und einmal als t-Haplotyp). Durch Isolation von Teilen des t-Komplexes in der Form des t-Haplotyps konnten sechs

verschiedene Loci identifiziert werden, welche eine Rolle in der nicht-mendelschen Vererbung dieses t-Haplotyps spielen. Durch einen Teil dieser Loci wird eine Hemmung der progressiven Motilität aller Spermien hervorgerufen, also auch derjenigen Spermien die den t-Haplotyp nicht besitzen. Diese Loci werden als „Distorter-Loci“ bezeichnet, da sie eine progressive Motilität der Spermien verhindern. Durch den sogenannten „Responder-Loci“ können Spermien mit einem heterozygoten t-Haplotyp diesen Effekt jedoch zum Teil aufheben und haben somit einen Vorteil gegenüber den übrigen Spermien. Liegt der t-Komplex jedoch homozygot als t-Haplotyp vor, so ist der Distorter-Effekt für alle Spermien gleich hemmend, was wiederum zur Sterilität führt. HERRMANN et al. (1999) transferierten den für diese Proteinkinase codierenden DNA-Abschnitt auf das Y-Chromosom und konnten so eine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zugunsten männlicher Nachkommen erreichen.

VAN MUNSTER et al. (VAN MUNSTER et al. 1999a; 1999b) konnten mittels differentieller Interferenzkontrast (DIC)-Mikroskopie einen Unterschied im Volumen zwischen X- und Y-Chromosom tragenden Bullenspermien feststellen, welcher dem Unterschied im DNA-Gehalt entspricht, also etwa 3,8%. Sie stellten jedoch auch eine Variation des Volumens der Spermienköpfe in den X- bzw. Y-Subpopulationen von 6,1% fest. Durch Kombination von DIC-Mikroskopie mit einem Durchflusszytometer mit eingebautem Cell-Sorter konnten, bei entsprechend hoher Auflösung, X- und Y-Fractionen mit einer Reinheit von 60 bis 66% erreicht werden (VAN MUNSTER 2002). Die Sortiertrate war mit bis zu 300 Spermien/Sek. deutlich geringer als beim BSST-Verfahren (ca. 4000 Spermien/Sek.).

SEIDEL u. GARNER (2002) halten einen immunologischen Ansatz zur Trennung von X- und Y-Chromosom tragenden Spermien für sehr erstrebenswert, da so eine günstige und praktikable Anwendung möglich wäre. Es gab bereits eine Vielzahl immunologischer Ansätze (HOPPE u. KOO 1984; HOWES et al. 1997; BLECHER et al. 1999; HENDRIKSEN 1999). Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen das H-Y-Antigen versuchten HOPPE u. KOO (1984) eine Anreicherung an X-Chromosomen tragenden Spermien und somit eine Verschiebung des Nachkommengeschlechts zugunsten weiblicher Nachkommen zu erreichen. Es konnten zwar lebende Nachkommen gezeugt werden, jedoch zeigte sich keine Verschiebung des Geschlechterverhältnisses.

HOWES et al.(1997) konnten mittels einer speziellen Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zwar X-spezifische Proteine identifizieren, jedoch sind diese Proteine nicht an die äußere Zellmembran assoziiert und können deshalb nicht durch spezielle monoklonale Antikörper gebunden werden.

BLECHER et al. (1999) berichten über geschlechtschromosomspezifische Proteine in der Spermienmembran und die Möglichkeit durch diese eine Anreicherung an X- bzw. Y-Chromosom tragenden Spermien mittels Agglutination durch geschlechtschromosomspezifische Antikörper zu erreichen. Diesem Ansatz liegt die Theorie zugrunde, dass sowohl auf der Zellmembran von Spermien als auch auf der Zellmembran somatischer Zellen X- bzw. X-chromosomspezifische Proteine existieren, welche evolutionär zwischen verschiedenen Säugetierspezies stärker konserviert sind als nicht-gechlechtspezifische Proteine. Aufgrund dieser Theorie wurden Plasmamembranproteine boviner Fetalorgane (getrennt nach Geschlecht) und boviner Spermien gereinigt und anschließend zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Durch die Immunisierung weiblicher Kaninchen mit weiblichen, bovinen Fetalproteinen konnte ein Antiserum gegen ebendiese weiblichen, bovinen Fetalproteine gewonnen werden. Diese Antikörper wurden als  $\beta$ -Antikörper bzw. als „female rabbit anti-female bovine Antibodies“ bezeichnet. Gleiches passierte mit den männlichen Kaninchen, welche mit männlichen, bovinen Fetalproteinen immunisiert wurden. Die so gewonnenen Antikörper bezeichnete man entsprechend als  $\delta$ -Antikörper bzw. als „male rabbit anti-male bovine Antibodies“. Sowohl  $\beta$ - als auch  $\delta$ -Antikörper wurden mittels Affinitätschromatografie, neben anderen chromatographischen Verfahren, zur Anreicherung und Reinigung von geschlechtsspezifischen Proteinen aus bovinen Fetalproteinen benutzt. Die so gewonnenen, geschlechtsspezifischen Proteine wurden wiederum zur Immunisierung von Kaninchen verwendet, wobei spezifisch männliche Proteine zur Immunisierung weiblicher Kaninchen verwendet wurden und umgekehrt spezifisch weibliche Proteine zur Immunisierung männlicher Kaninchen. Erstere erzeugten  $\alpha$ -Antikörper, auch als „female rabbit anti-male bovine Antibodies“ bezeichnet und letztere sogenannte  $\gamma$ -Antikörper, auch als „male rabbit anti-female bovine Antibodies“ bezeichnet. Durch diese  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Antikörper konnten mittels Western-Blot Proteinbanden bei Spermienmembranproteinen dargestellt werden, die denen bei männlichen und weiblichen fetalen Membranproteinen entsprachen. Dies spricht laut BLECHER et al. (1999) dafür, dass geschlechtschromosomspezifische



Proteine auf der Zellmembran von Spermien vorhanden sind. In weiteren Versuchen an lebenden, bovinen Spermien berichten BLECHER et al. (1999) von einer Agglutination von etwa 50% der Spermien bei Einsatz von  $\gamma$ -Antikörpern. In konsekutiven IVF-Versuchen mit diesem Sperma wird von einem Geschlechterverhältnis von 92% zugunsten männlicher Rinderembryonen, bei 76 gesexten Embryonen, berichtet. Bis heute wurden jedoch keine lebenden Nachkommen durch diese Methode produziert. Weitere Ergebnisse und die Produktion lebender Nachkommen sind erforderlich um die Effektivität dieser Methode genauer beurteilen zu können.

Bei elektrophoretischen Untersuchungen von humanen Spermien beobachteten KANEKO et al (1984), dass X-Chromosom tragende Spermien eine größere elektrophoretische Motilität als Y-Chromosom tragende Spermien zeigten. Aufgrund dessen schloss man auf eine höhere negative Ladung der Zelloberfläche X-Chromosom tragender Spermien. Durch Free-Flow-Elektrophorese konnte eine Reinheit der X-Chromosom tragenden Spermienpopulation von nahezu 100% erreicht werden. Die Y-Population erreichte eine maximale Reinheit von 83-89%. Wurde zusätzlich Sialidase zugegeben, so zeigte sich eine Reduktion der elektrophoretischen Motilität bis schließlich kein Unterschied zwischen den zwei Gruppen mehr zu erkennen war. Die unterschiedliche Ladung der Zelloberfläche von X- und Y-Chromosom tragenden Spermien wurde aufgrund dessen auf einen unterschiedlichen Sialinsäuregehalt auf der Membran zurückgeführt (KANEKO et al. 1984). Die getrennten Spermengruppen zeigten jedoch eine starke Beeinträchtigung ihrer Motilität. Das Free-Flow-Elektrophorese-Verfahren wurde bereits mehrfach bei humanem Sperma angewendet (KANEKO et al. 1984; ENGELMANN et al. 1988), jedoch liegen keine Daten über die Fertilität des so gewonnenen Spermas vor. ISHIJIMA et al.(1992) verwendeten Nebenhodenschwanzsperma von Mäusen zu elektrophoretischen Auftrennung in X- und Y-Chromosom tragende Spermienpopulationen. Zwar berichten sie eine Anreicherung von Y-Chromosom tragenden Spermien nahe der Kathode, jedoch zeigte sich auch hier eine extrem herabgesetzte Motilität der Spermien. Eine erfolgreiche Produktion von Nachkommen mit einem entsprechend verschobenen Geschlechterverhältnis erfolgte nicht.

Einen ersten Versuch die Auftrennung von X- und Y-Chromosom tragenden Spermien durch Gegenstromverteilung (CCD = *engl.* Countercurrent Distribution) zu erreichen, unternahmen CARTWRIGHT et al.(1993) an bovinen Spermien. Auch wenn die Reinheit der Y-

Chromosom tragenden Spermienfraktion 80% betrug, so konnten jedoch aufgrund der Dauer des Prozesses keine vitalen Spermien gewonnen werden.

Durch die Beschleunigung der Gegenstromverteilung mittels Zentrifugation (CCCD = Centrifugal Countercurrent Distribution) konnte die Dauer des Prozesses auf eine Stunde verkürzt und die Vitalität der gewonnenen Spermien somit verbessert werden (PASCUAL et al. 1992; OLLERO et al. 2000). Die CCCD-Methode basiert auf der unterschiedlichen Affinität von Zelloberflächen zu wässrigen Polymerlösungen aufgrund hydrophober und hydrophiler Unterschiede. In der Praxis hat sich ein wässriges Zwei-Phasen-System mit einer unteren stationären Phase und einer oberen mobilen Phase etabliert (AKERLUND 1984; PASCUAL et al. 1992; OLLERO et al. 2000). OLLERO et al. (2000) nutzte dieses System zur geschlechtsspezifischen Trennung von Schafesperma. Das Zwei-Phasen-System enthielt verschieden Polymere, dazu zählten Dextran und Polyethylenglycol (PEG). Zur Trennung der Spermien wurden diese der PEG-Dextran-Lösung zugegeben und anschließend zentrifugiert. Die Lösung trennte sich aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Polymere in eine obere (PEG) und eine untere (Dextran) Phase. Da Dextran eine geringere Hydrophobie als PEG aufweist, sammeln sich gering hydrophobe Spermien in dieser unteren Phase während stärker hydrophobe Spermien sich eher in der oberen Phase ansammeln. Solche Spermien deren Hydrophobie genau zwischen den beiden Polymerlösungen liegt, sammeln sich in der Grenzfläche an. Die Trennung der Phasen ist also dichtebedingt, während die Trennung der Spermienpopulationen elektrostatischen Kräften folgt. Die Zentrifugation dient lediglich der Beschleunigung der Phasentrennung. OLLERO et al. (2000) wiederholten diesen Prozess bis zu 49 mal in einer Stunde und konnten eine Reinheit der Y-Chromosom tragenden Spermienpopulation von bis zu 75% mit einer Vitalität von 57% erreichen. Die X-Chromosom tragende Population hatte eine maximale Reinheit von lediglich 66% bei einer Vitalität von 34%. Da die Reinheiten der Spermienpopulationen lediglich durch PCR bestimmt wurden, sind auch in diesem Fall weitere Ergebnisse zur Fertilität und tatsächlichen Produktion von Nachkommen mit vorbestimmten Geschlecht erforderlich.

Andere Methoden beziehen sich auf den Unterschied der Geschlechtschromosomen selbst. BARLOW u. VOSA (1970) entdeckten eine unterschiedlich starke Aufnahme von Quinacrin-Farbstoff durch X- und Y-Chromosomen von Primaten. Dieser Unterschied konnte jedoch bei Nicht-Primatenspezies nicht festgestellt werden.

Die bis heute einzig etablierte Methode zur Produktion von Nutztiernachkommen mit deutlich verschobenem Geschlechterverhältnis stellt die Beltsville Sperm Sexing Technologie (BSST) dar (JOHNSON et al. 1999). Diese Methode nutzt den Unterschied im DNA-Gehalt zwischen X- und Y-Chromosom tragenden Spermien. JOHNSON et al. (1987b) nutzten anfangs fixierte Spermien von *Chinchilla laniger*, da diese Spezies mit 7,5% einen besonders deutlichen Unterschied im DNA-Gehalt zwischen X- und Y-Chromosom tragenden Spermien aufweist. Es konnte bei diesen Versuchen bereits eine durchschnittliche Reinheit der X- und Y-Chromosom tragenden Spermienpopulationen von 95% erreicht werden.

Erste lebende Nachkommen mittels der BSST konnten bei Kaninchen produziert werden (JOHNSON et al. 1989). Bei Nachkommen, welche aus einer Befruchtung mit der X-Chromosom tragenden Spermienpopulation hervorgegangen waren, konnte ein Geschlechterverhältnis von 94% zugunsten weiblicher Nachkommen erzielt werden. Umgekehrt betrug der Anteil männlicher Nachkommen 81%. Durch die BSST konnten bis heute lebende Nachkommen von sieben verschiedenen Säugetierspezies produziert werden (GARNER 2006).

### 2.1.3 Durchflusszytometrische Spermisortierung

#### 2.1.3.1 Entwicklung

Erste hochauflösende Messungen des DNA-Gehaltes mittels Flowzytometrie wurden an Spermienkernen durchgeführt (OTTO et al. 1979; PINKEL et al. 1982; GARNER et al. 1983). Durch den Aufbereitungsprozess wurden die Spermien jedoch, aufgrund der aggressiven Beseitigung des Spermischwanzes und der, den Kern umgebenden Membranen, massiv beschädigt (PINKEL et al. 1982). Zur Anfärbung nutzte man anfänglich den nicht membrandurchgängigen Farbstoff 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), welcher eine Beseitigung der Membranen erfordert um die DNA anfärben zu können (PINKEL et al. 1982; GARNER et al. 1983). Zusätzlich zu heterogametischem Sperma von Rind, Schwein, Schaf und Kaninchen untersuchten GARNER et al. (1983) den DNA-Gehalt von homogametischem Hähnchensperma. Das Hähnchensperma zeigte im Histogramm nur eine einzelne Spitze, während das Sperma der Säugetierspezies jeweils zwei getrennte Spitzen aufwies. Für Bullensperma wurde eine Differenz von 3,9% festgestellt, für Eber-, Schafbock- und Kaninchensperma betrug der Unterschied jeweils 3,7%, 4,1% und 3,9%. Man kam

aufgrund dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung biochemischer Berechnungen des DNA-Gehaltes zu dem Schluss, dass es sich bei den zwei getrennten Spitzen um die jeweiligen X- bzw. Y-Chromosom tragenden Spermienpopulationen handeln muss (GARNER et al. 1983). Zudem wurden in diesem Versuch der Unterschied im DNA-Gehalt der zwei Spermienpopulationen bei verschiedenen Rinderspezies untersucht. Es zeigte sich, dass der Unterschied zwischen X- & Y-Chromosom tragender Spermienpopulation innerhalb einer Spezies konstant ist, aber sich zwischen verschiedenen Spezies signifikant unterscheiden kann (GARNER et al. 1983).

Die stark kondensierte DNA und die abgeflachte Form der Säugetierspermien bereiteten große Schwierigkeiten bei der quantitativen Bestimmung des DNA-Gehalts. Durch den hohen Kondensationsgrad der DNA ist eine quantitative Fluoreszenzfärbung schwierig. Zudem bedingt dieser eine hohe Brechzahl, wodurch das System, aufgrund der abgeflachten Form der Spermienköpfe, von deren Orientierung abhängig wird (DEAN et al. 1978; PINKEL et al. 1982). Bevor es zur Entwicklung von Flowzytometern kam, welche so modifiziert wurden, dass sie die flachen Spermienköpfe relativ einheitlich orientieren, versuchte man das Problem durch eine Dekondensation der DNA, mittels Spaltung der Disulfidbrücken und Einsatz proteolytischer Enzyme, zu lösen (OTTO et al. 1979; GARNER et al. 1983). Zur Lockerung der DNA-Struktur und zur Beseitigung der Zellorganellen zentrifugierten GARNER et al. (1983) Spermien mit DMSO, fixierten sie in Ethanol und behandelten sie mit Papain (Protease) und Dithioerythritol.

Um die schädigenden Einflüsse auf die Spermien zu begrenzen, konzentrierte man sich auf die Entwicklung von speziellen Systemen zur einheitlichen Orientierung der Spermien zum Zeitpunkt der Fluoreszenzanregung. In verschiedenen Versuchen wurde die Form der Injektionsnadel modifiziert, um eine Optimierung der Spermienausrichtung am Ort der Fluoreszenzanregung zu erreichen (DEAN et al. 1978; JOHNSON u. PINKEL 1986). DEAN et al. (1978) beschreiben eine deutliche Verbesserung der Ausrichtung der Spermien bei Einsatz einer keilförmigen Injektionsnadel. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass sie keine Sortierung von Spermien mit Schwanz erlaubt. JOHNSON u. PINKEL (1986) berichten über gleich mehrere Modifikationen eines Flowzytometers zur Erlangung einer höheren Auflösung bei der DNA-Analyse. Zum einen optimierten sie die Orientierung der Spermien durch eine Abschrägung der Injektionsnadel (*engl.* Beveled Needle), was im Vergleich zur keilförmigen

Nadel den Vorteil hat, dass sich diese Methode auch zum Sortieren von Spermien mit Schwanz eignet. Zum anderen wurde ein zweiter Fluoreszenzdetektor hinzugefügt. Dieser wurde dem Laser gegenüber, direkt auf der Achse des Laserstrahls montiert. Eine weitere Verbesserung der Auflösung gelang durch den Einsatz eines Fotomultiplikators. Dazu wurde die gesammelte Fluoreszenz mittels eines Fiberglasbündels dem Fotomultiplikator zugeleitet. Unterschiede im DNA-Gehalt wurden somit besser sichtbar.

Durch den Einsatz der abgeschrägten Injektionsnadel (JOHNSON u. PINKEL 1986) können ca. 30% der Spermien korrekt orientiert werden. Wird statt der abgeschrägten Injektionsnadel die herkömmliche zylindrische Injektionsnadel benutzt, so beträgt der Anteil korrekt orientierter Spermien weniger als 15% (RENS et al. 1998). JOHNSON et al. (1989) berichteten von 60-80% ausreichend orientierter Spermien, wenn es sich um Spermien ohne Schwanz handelt und die Sortiertrate entsprechend niedrig (50-150 Spermien/Sek.) gewählt wird. Nach JOHNSON et al. (1989) sinkt dieser Anteil auf 15-20%, wenn es sich um intakte Spermien, also mit Schwanz, handelt. Auf diese Weise konnten nun ca.  $0,35 \times 10^6$  Spermien/Stunde sortiert werden (JOHNSON et al. 1989).

Trotz des Vorteils gegenüber der herkömmlichen, zylindrischen Injektionsnadel, weist die abgeschrägte Nadel auch Nachteile auf. So ist mit max. 30% die korrekte Ausrichtung der lebenden Spermien immer noch relativ gering und zudem abhängig von der Sortiertrate (RENS et al. 1998). Durch Kombination der herkömmlichen Injektionsnadel mit einer neuen, speziell geformten Düse (Novel Nozzle) konnte der Anteil korrekt ausgerichteter Spermien auf ca. 60% angehoben werden (RENS et al. 1998). Zudem zeigte sich, dass der Anteil korrekt ausgerichteter Spermien bei Einsatz dieser neuen Düse nun nicht mehr von der Sortiertrate abhängig war. JOHNSON et al. (1999) berichtete über den Einbau dieser ausrichtenden Düse in ein Cytomation Moflo<sup>®</sup> Hochgeschwindigkeits-Spermiensortierer. Durch den Einbau dieser Düse konnte die Produktionsrate von sortierten X- und Y-Spermien von  $0,35 \times 10^6$  Spermien/Stunde auf 5 bis  $6 \times 10^6$  Spermien/Stunde für jede Population gesteigert werden. In dem Fall, dass nur X-Spermien benötigt werden, können bis zu  $18 \times 10^6$  Spermien der X-Population pro Stunde sortiert werden (JOHNSON 2000). MAXWELL et al. (2004) nennen eine Sortiertrate von  $15 \times 10^6$  Spermien/Stunde bei Einsatz der Düse nach RENS (1998) und Veränderungen im Design der Sortierelektronik. GARNER (2006) beschreibt die Effizienz des kommerziell genutzten SX MoFlo<sup>®</sup>-Systems (DakoCytomation,

Inc., Fort Collins, CO, USA) mit Cytonozzle<sup>®</sup>-Düse mit 10 Besamungsdosen à  $\sim 2 \times 10^6$  lebenden Spermien/Besamungsdosis für jedes Geschlecht pro Stunde.

Fast sämtliches nicht-humanes Sperma zur geschlechtsspezifischen Sortierung wird derzeit mit diesem Hochdruck-Hochgeschwindigkeits-Flowzytometer, Modell MoFlo<sup>®</sup> SX (DakoCytomation, Inc., Fort Collins, CO, USA) ausgestattet mit einem Argon-Laser, Fluoreszenzdetektoren und einer modifizierten Düse nach RENS (1998), sortiert (G. E. SEIDEL, JR. u. GARNER 2002).

Die Slit-Scan Methode ist ein flowzytometrisches Verfahren, welches eine räumliche Untersuchung der Spermien entlang der Flussrichtung ermöglicht (BENARON et al. 1982; HALAMKA et al. 1984; RENS et al. 1996). RENS et al. (1996) konnten durch dieses Verfahren feststellen, dass es unerheblich ist, ob die Spermien vorwärts, (Kopf voraus) oder rückwärts (Schwanz voraus) die Detektorebene passieren. Es zeigt sich jedoch, dass ein erhöhter Anteil an aufgerollten Spermischwänzen eine verminderte Auflösung zwischen den X- und Y-Chromosom tragenden Spermienpopulationen bedingt (RENS et al. 1996). Bei erhöhtem Anteil aufgerollter Spermischwänze gewährleistet die Slit-Scan Methode, durch Ausschluss der betroffenen Spermien, eine möglichst hohe Auflösung im DNA-Histogramm (RENS et al. 1996).

Eine Trennung von lebenden Spermien wurde erst durch den Einsatz eines membrandurchlässigen Farbstoffs möglich. JOHNSON et al. (1987a) berichteten erstmals vom Einsatz von Bisbenzimidazol (Hoechst 33342) als DNA-bindendem Farbstoff zur flowzytometrischen Trennung von Spermien. Auf eine vorausgehende Behandlung der Spermien mit DMSO-Waschungen, Ethanolfixierung sowie eine proteolytische Behandlung mit Papain konnte verzichtet werden, da Bisbenzimidazol eine quantitative DNA-Färbung auch bei kondensiertem Chromatin ermöglicht. Die Anfärbung wurde so nicht nur schonender im Bezug auf die Spermien, sondern auch vereinfacht im Vergleich zur DAPI-Färbung (JOHNSON et al. 1987a).

JOHNSON u. CLARKE (1988) beobachteten sortierte Eber-, Bullen- und Schafbockspermien nach Mikroinjektion in Hamster Oozyten. Die Bullen- und Schafbockspermien zeigten einen höheren Aktivierungsgrad, in Form von DNA-Dekondensation und Bildung eines männlichen Pronukleus, als die Eberspermien.

Erste erfolgreiche Besamungen mit lebenden Nachkommen eines vorbestimmten Geschlechts, erfolgten auf chirurgische Weise beim Kaninchen (JOHNSON et al. 1989). Hormonell vorbehandelte, weibliche Kaninchen wurden mit etwa  $3 \times 10^5$  Spermien frisch sortiertem Sperma besamt. Die X-Chromosom tragende Spermienpopulation wies eine Reinheit von 86% auf, während die Nachkommen aus Besamungen mit diesem Sperma zu 94% weiblich waren. Die Y-Chromosom tragende Spermienpopulation stimmte in der Reinheit und im Anteil der männlichen Nachkommen mit jeweils 81% exakt überein (JOHNSON et al. 1989). Auch MORRELL et al. (1988) berichten von ersten erfolgreichen Besamungen mit flowzytometrisch sortiertem Sperma, jedoch ist die Anzahl der Nachkommen zu gering, um eine signifikante Verschiebung des Geschlechterverhältnisses zu erkennen.

Als erste Großtierspezies konnte beim Schwein die Durchführbarkeit des Verfahrens demonstriert werden (JOHNSON 1991). CRAN et al. (1993) meldeten die Geburt der ersten Kälber aus Besamungen mit geschlechtsspezifisch sortiertem Sperma. LEVINSON et al. (1995) berichten die erste Schwangerschaft beim Menschen durch IVF mit geschlechtsspezifisch sortiertem Sperma. Grund der Anwendung war in diesem Fall die Vermeidung eines X-chromosomal bedingten Hydrocephalus.

SCHMID et al. (2000) berichten das erste Fohlen aus einer chirurgischen Besamung mit geschlechtsspezifisch sortiertem Sperma. Erste Trächtigkeiten durch nicht-chirurgische Besamungen beim Pferd wurden von BUCHANAN et al. (2000) berichtet.

Mittlerweile wurde der Unterschied im DNA-Gehalt zwischen X- und Y-Chromosom tragenden Spermien von mindestens 23 Säugetierspezies bestimmt. Beim Pferd beträgt dieser Unterschied 4,2% (RATH u. SIEME 2003). Bei sieben dieser Spezies (Bulle, Schafbock, Hirsch, Eber, Hengst, Kaninchen, Mensch) konnten zudem bereits Nachkommen mit sortiertem Sperma produziert werden (GARNER 2006).

Nachkommen durch sortiertes und anschließend kryokonserviertes Sperma sind bisher bei Mensch (FUGGER et al. 1998), Rind (DOYLE et al. 1999; G. E. SEIDEL, JR. et al. 1999), Schwein (JOHNSON et al. 2000), Schaf (HOLLINSHEAD et al. 2001), Pferd (LINDSEY et al. 2002b) und Hirsch (SCHENK u. DEGROFFT 2003) gelungen. Die Verwendung von kryokonserviertem, sortiertem Sperma durch die konventionelle, künstliche Besamungstechnik war jedoch nur bei den drei Wiederkäuerspezies Rind, Schaf und Hirsch erfolgreich. Beim Pferd war eine hysteroskopische Besamung ausreichend, während beim

Schwein eine chirurgische Besamung in den Eileiter erforderlich war. Beim Schwein konnten nachfolgend auch durch IVF (RATH et al. 1999), ICSI (PROBST u. RATH 2003) und mittlerweile auch durch eine spezielle Besamungstechnik, ohne den Einsatz weiterer reproduktiver Techniken (GROSSFELD et al. 2005) Nachkommen mit geschlechtsspezifisch sortiertem Sperma erzeugt werden. Auch beim Menschen war der Einsatz zusätzlicher reproduktive Techniken wie IVF, ICSI und Embryotransfer erforderlich um Schwangerschaften mit geschlechtsspezifisch sortiertem Sperma zu erzielen (FUGGER et al. 1998).

BUCHANAN et al. (2000) berichten von einer 40%igen Trächtigkeitsrate bei Besamungen mit  $25 \times 10^6$  sortierten Spermien/Dosis. Durch hysteroskopische Besamungen auf die Eileiterpapille konnten beim Pferd mittlerweile auch Erfolge mit sehr geringen Mengen an geschlechtsspezifisch sortierten Spermien erzielt werden. LINDSEY et al. (2001; 2002b) konnten durch hysteroskopische Besamung mit  $5 \times 10^6$  motilen, sortierten Spermien/Dosis eine Trächtigkeitsrate von 37,5% erzielen. Im gleichen Versuch wurden erstmals Stuten mit tiefgefrorenem, sortiertem Sperma besamt. Die Trächtigkeitsrate lag, bei gleicher Anzahl motiler Spermien/Dosis, mit 13% jedoch deutlich niedriger. In einer weiteren Studie verglichen LINDSEY et al. (2002a) die tiefuterine Besamung unter Ultraschallkontrolle mit der hysteroskopischen Besamung zur Anwendung bei Besamungen mit geringer Spermienzahl. Auch hier wurde eine Besamungsdosis von  $5 \times 10^6$  motilen Spermien gewählt. Während durch die tief-uterine Besamung keine Trächtigkeiten erzielt werden konnten, kam man bei Verwendung von nicht sortiertem, frischem Sperma auf eine Trächtigkeitsrate von 50% und bei frischem, sortiertem Sperma auf 25%.

#### 2.1.3.2 Kommerzialisierung von geschlechtsspezifisch sortiertem Sperma

Um geschlechtsspezifisch sortiertes Sperma kommerziell nutzen zu können ist es von entscheidender Bedeutung, entsprechende Verfahren zur Kryokonservierung weiterzuentwickeln, damit ein weltweiter Vertrieb ermöglicht wird (GARNER 2006).

Dabei sollten die Produktionskosten, die zum einen durch die technischen Erfordernisse, Investitionskosten und laufende Betriebskosten und zum anderen durch die Personalkosten bedingt sind (G. E. SEIDEL, JR. u. GARNER 2002), möglichst gering gehalten werden.



Zur Kostensenkung könnte die derzeitig verwendete Technik vereinfacht und effizienter gestaltet werden und beispielsweise die Reduktion der Trägerflüssigkeitsmenge durch Umgestaltung der inneren Düsenkammer, sowie Entwicklung spezieller Auffanggefäße gesenkt werden (GARNER 2006). Die Entwicklung von Einwegkomponenten könnte dazu beitragen den Säuberungs- und Sterilisationsaufwand zu vermindern, würde jedoch andererseits die Kosten wiederum erhöhen. MAXWELL et al. (2004) fordern weitere Forschung zur Vermeidung der Destabilisierung der Spermienmembranen. Als konkrete Ansatzpunkte nennen sie die Reduzierung an verwendeter Sheathfluid-Menge, Zugabe von Seminalplasma zu verschiedenen Zeitpunkten und die Entwicklung neuer Kryokonservierungstechniken. Zudem seien Verbesserungen des Sortierequipments, des biologischen Handlings und der Sortiereffizienz nötig, um kommerziell akzeptable Trächtigkeitsraten bei einigen Spezies zu erreichen (MAXWELL et al. 2004). Für eine ökonomische Anwendung in der künstlichen Besamung erfordert es nach AMANN (1999) Flowzytometer mit einer höheren Durchsatzrate, geringeren Kaufpreisen und niedrigeren Wartungskosten.

Nach Entwicklung des Verfahrens im USDA (United States Department of Agriculture) Beltsville Agricultural Research Center durch Larry Johnson (JOHNSON et al. 1989), wurde durch das USDA Patent angemeldet. Die erste Lizenz zur kommerziellen Nutzung wurde an das britische Unternehmen Mastercalf Ltd. ausgestellt, jedoch konnte dieses Unternehmen das Verfahren nicht mehr kommerziell etablieren (GARNER 2001). Aktuell besitzt das private Unternehmen XY Inc. die Lizenz für alle nicht-humanen Säugetierspezies. In Großbritannien ist geschlechtsspezifisch sortiertes Bullensperma seit September 2000 erhältlich (GARNER 2001).

**2.1.3.3 Einsatz von geschlechtsspezifisch sortiertem Sperma in der Pferdezucht**  
Während geschlechtsspezifisch sortiertes Sperma in der Rinderzucht bereits kommerziell genutzt wird, ist der Einsatz in der Pferdezucht, trotz erfolgreicher Besamungen mit kryokonserviertem sortiertem Sperma bisher sehr gering. Dies ist laut SQUIRES (2005) einerseits bedingt durch das teure Equipment, die Kosten für die Lizenz zur Nutzung des Equipments und andererseits durch die stark hengstabhängige Fertilität des sortierten

Spermas, sowie die logistische Organisation zwischen den Standorten von Hengst, Stute und Sortingequipment.

#### 2.1.3.4 Funktionsprinzip des Spermasorters / Ablauf des Sortiervorgangs

Da die grundlegende Voraussetzung zur flowzytometrischen Trennung von X- und Y-Chromosom tragenden Spermien in der Differenz der enthaltenen DNA-Menge liegt, hängt die Effizienz des Sortierprozesses wesentlich von dieser ab. Je größer der Unterschied, umso besser ist die Auflösung der beiden Spermienpopulationen und umso effizienter deren Trennung (MAXWELL et al. 2004).

Um einen hohen Nutzungsgrad bei gleichzeitig guter Auflösung zwischen X- und Y-Population bei der Spermisortierung zu erreichen, ist neben einer gleichmäßigen Anfärbung der X- und Y-Chromosom tragenden Spermien, vor allem die Ausrichtung der Spermien vor dem Laserstrahl von entscheidender Bedeutung (RENS et al. 1998). Eine Auflösung zwischen den X- und Y-Chromosomen tragenden Spermienpopulationen wird über die Messung der Vorwärtsfluoreszenz ( $0^\circ$ ) erreicht. Um eine maximale Orientierung der Spermien vor dem Laser zu erreichen, werden die Spermien durch hydrodynamische Kräfte in einen laminaren Strom verbracht und mit ihrer Querachse senkrecht zum Laserstrahl ausgerichtet. Die individuelle Position der Samenzelle relativ zum Laserstrahl wird über die sogenannte Seitenfluoreszenz (Brechungseffekte der schmalen Spermienkante im Flüssigmedium) durch einen zweiten Fluoreszenzdetektor ( $90^\circ$ ) aufgezeichnet.

Während Flowzytometer normalerweise nur einen Fluoreszenzdetektor im  $90^\circ$ -Winkel zum Laserstrahl besitzen, sind solche, die der Sortierung von Spermien dienen, mit einem zusätzlichen Fluoreszenzdetektor anstelle des Streulichtdetektors im  $0^\circ$ -Winkel, also gegenüber dem Laser, ausgestattet (JOHNSON u. PINKEL 1986). Misst der  $90^\circ$ -Detektor eine mangelhafte Ausrichtung führt dies zum elektronischen Ausschluss des entsprechenden Spermiums (JOHNSON u. PINKEL 1986).

Da die Effizienz des Sortiervorgangs proportional zum Anteil der korrekt ausgerichteten Spermien ist, wurden Flowzytometer zur Spermien-DNA-Analyse mit einer schräg angeschliffenen Injektionsnadel (Beveled Needle) ausgestattet (JOHNSON u. PINKEL 1986). Durch den Ersatz der zylindrischen Standardnadel, durch eine angeschrägte Nadel konnte der, bei Austritt aus der Nadel zylindrisch geformte Spermienstrom, in einen bandförmigen Strom

umgewandelt und somit der Anteil korrekt ausgerichteter Spermien durch hydrodynamische Kräfte erhöht werden (JOHNSON u. PINKEL 1986). Dies geschieht derart, dass der Spermienstrom bei Verlassen der Nadel vom Hüllstrom mantelförmig aufgenommen wird. Bei Eintritt in die Öffnung der Düse, werden die Spermien, durch den verminderten Durchmesser im Zentrum des Hüllstroms stark beschleunigt und richten sich mit ihrer Längsachse parallel zur Flussrichtung aus (DEAN et al. 1978). Durch die angeschrägte Nadel bildet sich ein bandförmiger Zentralstrom in dessen Ebene sich die Spermienköpfe ausrichten (JOHNSON u. PINKEL 1986).

Um die Effizienz des Sortiervorgangs an diesem Punkt weiter zu verbessern, entwickelten RENS et al. (1998) eine Düse (Novel Nozzle) die an zwei Punkten einen sich verjüngenden, elipsenförmigen Querschnitt hat. Diese zwei Abschnitte werden von einem runden Abschnitt unterbrochen. Die elipsenförmigen Querschnitte sind mit ihren weitesten Durchmessern um 90° zueinander verdreht, wobei der weiteste Durchmesser des unteren elipsenförmigen Abschnitts senkrecht zum auftreffenden Laserstrahl liegt. Durch die flüssige Umgebung werden die Spermien in der unteren Ellipse korrekt ausgerichtet und verlassen so die Ellipse durch eine 76 µm große Ausflussöffnung. Bei Austritt aus der Ausflussöffnung treten die Spermien in den Jet-in-Air Strahl ein und passieren so den Laserstrahl (RENS et al. 1998).

Der Vorteil dieser neuen Düse wird erst bei hohen Sortierraten (2,000 Spermien/ Sek.) deutlich. Hier werden bei der neuen Düse ca. 60% der Spermien korrekt ausgerichtet (RENS et al. 1998). Der Nachteil der angeschrägten Nadel im Vergleich liegt in der Abhängigkeit der Ausrichtung an niedrige Sortierraten (RENS et al. 1998). Bei niedrigen Sortierraten (300-500 Spermien/Sek.) unterscheidet sich der Anteil der korrekt ausgerichteten Spermien zwischen diesen zwei Verfahren nicht. Durch die Kombination der neu entwickelte Düse mit einer zylindrischen Standardnadel wird der Anteil an korrekt orientierten Spermien um das zwei- bis dreifache, im Vergleich zu vorherigen Methode gesteigert (RENS et al. 1998).

JOHNSON et al.(1999) berichtet über den Einbau dieser ausrichtenden Düse in ein MoFlo<sup>®</sup>-Hochgeschwindigkeits-Flowzytometer/Zellsortierer (DakoCytomation, Inc., Fort Collins, CO, USA). Durch den Einbau dieser Düse konnte die Sortierrate von  $0,35 \times 10^6$  Spermien/Stunde auf 5 bis  $6 \times 10^6$  Spermien/Stunde für jede Population gesteigert werden.

Die aktuelle Generation von Flowzytometern, sogenannte Hochgeschwindigkeits-Zellsortierer, arbeiten mit Drücken zwischen  $0,84 \text{ kg/cm}^2$  und  $4,22 \text{ kg/cm}^2$  (JOHNSON 2000).

Je nach Fluoreszenzsignal des im letzten anhängenden Tropfen enthaltenen Spermiums, wird der Flüssigkeitsstrom positiv oder negativ aufgeladen und die Ladung, bei Abreißen des Tropfens, mit auf diesen übertragen (G. E. SEIDEL, JR. u. GARNER 2002). Dabei werden Tropfen, die Y-Chromosom tragende Spermien enthalten, negativ und solche, die X-Chromosom tragende Spermien enthalten, positiv aufgeladen und entsprechend dieser Ladung im folgenden, elektrischen Feld abgelenkt (G. E. SEIDEL, JR. u. GARNER 2002). Von Bedeutung ist hier lediglich, dass es sich um entgegengesetzte Ladungen für die zwei Spermienpopulationen handelt, damit diese differenziert werden können. Ob dabei die X-Population positiv und die Y-Population negativ aufgeladen wird oder umgekehrt, ist durch Einstellung am Flowzytometer frei wählbar und lediglich aus Gründen der Unverwechselbarkeit von Bedeutung.

Tropfen, die kein Spermium enthalten oder deren Spermien kein entsprechendes Fluoreszenzsignal abgegeben haben, werden nicht aufgeladen. Um membrangeschädigte Spermien vom Sortierprozess auszuschließen, kann zusätzlich der Lebensmittelfarbstoff FD&C#40 (JOHNSON et al. 1999; SCHENK et al. 1999) eingesetzt werden. FD&C#40 unterdrückt die Fluoreszenz von Hoechst 33342 in Spermien mit beeinträchtigter Membranfunktion (SCHENK et al. 1999). Dies hat, im Vergleich zu Propidium Iodid, den Vorteil, dass potentielle, mutagene Effekte vermieden werden (G. E. SEIDEL, JR. u. GARNER 2002).

Das obere Limit der Sortiertrate liegt bei heute erhältlichen Spermisortierern, bei perfekter Orientierung, bei 10,000 lebenden Spermien jeden Geschlechts pro Sekunde (G. E. SEIDEL, JR. u. GARNER 2002).

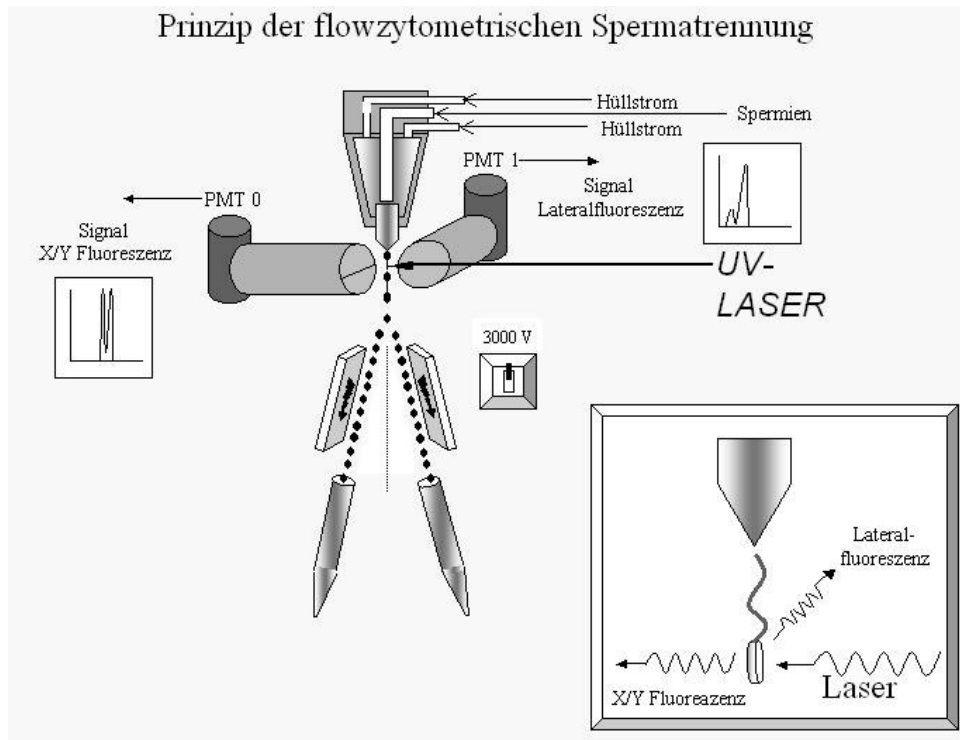


Abbildung 1: **Darstellung des Funktionsprinzips eines Flowzytometers zum Sortieren von Hengstpermien**

„Die mit Hoechst 33342 gefärbte Probe wird über den Probeneinlass ins Flowzytometer gegeben, vom vorbeiströmenden Hüllstrom erfasst und als Flüssigkeitsstrom am Laser vorbeigeführt. Durch Vibrationen wird der Flüssigkeitsstrom in einen Tröpfchenstrom zerteilt, wobei jeder Tropfen eine Samenzelle enthält. Aufgrund des unterschiedlichen DNA-Gehaltes ergibt sich im Laserstrahl ein unterschiedlich starkes Fluoreszenzsignal, das von zwei im rechten Winkel zueinander stehenden Fotozellen erfasst und im Rechner verarbeitet wird. Es werden nur Spermien zum Trennprozess zugelassen, die ein eindeutiges Fluoreszenzsignal senden und somit eindeutig identifizierbar sind. Diese werden abhängig von der Stärke des Signals elektrisch aufgeladen oder verbleiben neutral, falls keine eindeutige Zuordnung vorgenommen werden kann. Im nachgeordneten elektrischen Feld werden die Tropfen ihrer Ladung entsprechend abgelenkt und können in separaten Auffanggefäßen gesammelt werden.“ (BUSS 2005)

### 2.1.3.5 Auffangmedien

Das Auffangmedium ist i.d.R. angereichert mit 2-20% ultrazentrifugiertem Eidotter (JOHNSON 1991) und bei einigen Spezies mit 1-10% Seminalplasma (MAXWELL et al. 2004). Diese genannten Zusätze schützen die sortierten Spermien vor Schäden durch die Verdünnung mit der Trägerflüssigkeit und vor physikalischen Schäden durch den Auswurf in die Auffanggefäße (MAXWELL u. JOHNSON 1999). Verdünnermedien müssen nicht nur den speziellen Ansprüchen von sortiertem Sperma genügen, sondern sind außerdem speziesspezifisch (MAXWELL et al. 2004).

Die hohe Verdünnung der Spermien in den Auffangmedien ist einer von mehreren schädigenden Einflussfaktoren, denen sortierte Spermien zusätzlich ausgesetzt sind. Dieser sogenannte Verdünnungseffekt führt zu einer Destabilisierung der Zellmembranen und somit zu einer funktionellen Kapazitation. Dieser kapazitationsähnliche Zustand ist reversibel und kann zu einem gewissen Anteil durch Zugabe von Seminalplasma zu den Auffangmedien rückgängig gemacht werden (MAXWELL et al. 1998; MAXWELL u. JOHNSON 1999). MAXWELL et al. (1996) konnten bei einer Studie an Eber-, Bullen und Schafbocksperma die Vitalität und Plasmamembranintegrität durch einen Seminalplasmaanteil von 10% im Auffangmedium steigern.

BUCHANAN et al. (2000) benutzten E-Z Mixin<sup>®</sup> CST (Fa. ARS, Chino, CA, USA) und E-Z Mixin<sup>®</sup> CST mit 4% Eidotter als Auffangmedium für Hengstspermien. Im Anschluss an den Sortierprozess wurden die Proben 20 Minuten bei 1200\*g und 22 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 200 µl abgesaugt und das Spermapellet auf 25 x 10<sup>6</sup> lebende Spermien/ml verdünnt. Die Besamungen mit Sperma, dem Eidotter zugeben wurde, zeigten eine Trächtigkeitsrate von 40% am 60. Tag post inseminationem, während die Gruppe ohne Eidotter lediglich eine Tächtigkeitsrate von 10% aufwies.

BUSS (2005) verwendete den Überstand einer bei 850\*g für 10 min. zentrifugierten 2%igen TEST-Eidotter-Lösung als Auffangmedium für sortierte Hengstspermien, die kryokonserviert wurden.

#### 2.1.3.6 Auswirkungen des Sortiervorganges auf die Spermaqualität

Während des Sortiervorgangs sind Spermien multiplen, schädigenden Prozessen ausgesetzt. Dabei handelt es sich um die Kernfärbung, die Inkubation, mechanische Kräfte in Verbindung mit der Passage durch den Zellsortierer, Bestrahlung durch den UV-Laser, die Projektion in die Sammelgefäße unter Hochdruck und eine hohe Verdünnung durch Sheath-Fluid und Auffangmedium (MAXWELL u. JOHNSON 1999). GARNER (2006) verweist zusätzlich auf die möglichen Auswirkungen durch die wechselnden Verdünnermedien mit denen die Spermien während des Sortiervorgangs in Kontakt kommen. Um diese Schäden zu minimieren, ist es essentiell, die Temperatur, die Osmolalität der Puffermedien, den pH-Wert und die Sterilität der Trägerflüssigkeit und der Auffang- und Tiefgefriererdünnermedien konstant zu halten (MAXWELL et al. 2004). Zudem ist beim Aufbereiten der Spermien für

den Sortiervorgang zu beachten, dass die Wahrscheinlichkeit, dass sortierte Spermien ihre Fertilisationsfähigkeit behalten, größer ist, je weniger Einflüsse auf die Spermien einwirken (JOHNSON et al. 1989; JOHNSON u. WELCH 1999). „Post-sorting“ Behandlungen können möglicherweise zu einem gewissen Teil Schäden, die während des Sortiervorgangs an den Spermien aufgetreten sind, kompensieren (MAXWELL et al. 2004).

GARNER et al. (2001) verbesserten die Vitalität stark verdünnter Bullenspermien durch Zugabe von Seminalplasma. MAXWELL u. JOHNSON (1999) deuten auf die unterschiedliche Bedeutung von Seminalplasma für die In-vitro- und die In-vivo-Fertilisation hin. Während sich die Anwesenheit von Seminalplasma bei IVF-Versuchen mit Ebersperma nachteilig auf die Fertilisationskapazität der Spermien auswirkt (RATH u. NIEMANN 1997), konnten MAXWELL et al. (1996) den Anteil vitaler und akrosomenintakter Eberspermien nach dem Sortierprozess durch 10% Seminalplasma im Färbe- und Auffangverdünner steigern. Von übergeordneter Bedeutung für diesen Unterschied scheint der Einfluss des Seminalplasmas auf den Kapazitionszustand der Spermien zu sein. Sowohl bei kryokonservierten (SCHEMBRI et al. 2002) als auch bei flowzytometrisch sortierten (HOLLINSHEAD et al. 2003) Spermien zeigen sich kapazitionsähnliche Veränderungen. Man vermutet eine dekapazitierende Wirkung des Seminalplasmas, welche Spermien bei der In-vitro-Fertilisation an der Akrosomenreaktion hindert, welche auf der anderen Seite jedoch eine verlängerte Lebensdauer flowzytometrisch sortierter Spermien bedingt. Bei In-vivo-Besamungen werden die dekapazitierenden Faktoren vermutlich während der Passage durch den weiblichen Reproduktionstrakt abgestreift, verhindern jedoch eine vorzeitige Akrosomenreaktion im unteren, weiblichen Reproduktionstrakt und verbessern somit die Fertilität (MAXWELL u. JOHNSON 1999). Auch bei kryokonservierten Schafbockspermien konnte die Fertilität durch Zugabe von Seminalplasma deutlich verbessert werden (MAXWELL et al. 1999). Spermien zeigten bei Zugabe von Seminalplasma eine verbesserte Motilität und einen geringeren Anteil kapazitierter und akrosomenreagerter Spermien.

DURAND u. OLIVE (1982) untersuchten die Zytotoxizität, Mutagenität und DNA-Schäden bei Hoechst®33342-gefärbten, somatischen Hamsterzellen. Sie konnten zeigen, dass es bereits bei nicht-toxischen Konzentrationen zu Mutationen kommt und dass die angefärbten Zellen schneller absterben, als die Kontrollproben. Die Toxizität des Farbstoffs wurde als gering bezeichnet, die Mutagenität hingegen als moderat. Bei Untersuchung der DNA-Integrität

sortierter, humaner Spermien konnte jedoch keine UV- und Hoechst 33342-bedingte Erhöhung endogener DNA-Strangbrüche, auch bei verlängerter UV-Bestrahlung, festgestellt werden (CATT et al. 1997). Eine Erhöhung, ähnlich wie bei somatischen Zellen, war lediglich bei dekondensierter Spermien-DNA feststellbar. CATT et al. (1997) vermuten, dass die im Vergleich zu somatischen Zellen sehr kompakte und stabile Chromatinstruktur reifer Spermien die Ursache hier für ist. Gestützt werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen von PARILLA et al. (2004), in denen Lymphozyten von Ferkeln, die aus Besamungen mit Hoechst 33342-gefärbten Spermien und geschlechtsspezifisch sortierten Spermien stammten, auf Chromosomenaberrationen untersucht wurden. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe beobachtet werden.

Untersuchungen der DNA-Integrität mittels SCSA, nach verschiedenen Stufen des Sortierprozess ergaben, dass nicht nur die Färbung mit Hoechst 33342 und die Laserbestrahlung schädigend wirkten, sondern dass vor allem mechanische Einflüsse schädigende Wirkung auf die DNA-Integrität der Spermien hatten (G. E. SEIDEL, JR. u. GARNER 2002). So erhöhten sich die DFI-Werte bereits um 1,8%, wenn die Spermien den Sortiervorgang ohne Anfärbung mit Hoechst 33342 und ohne Laserbestrahlung durchliefen (GARNER 2001). Zusätzliche Schäden der DNA-Integrität durch Anfärbung mit Hoechst 33342 und Laserbestrahlung waren dagegen gering und statistisch nicht signifikant (G. E. SEIDEL, JR. u. GARNER 2002). SUH et al. (2005) stellten bei Untersuchungen an Bullen- und Hengstspermien fest, dass bereits durch eine Senkung des Standarddruckes von 50 psi auf 40 psi die Spermienqualität bezüglich Vitalität und Motilität signifikant verbessert werden kann, ohne eine Senkung der Sortierleistung in Kauf nehmen zu müssen.

GUTHRIE et al (2002) untersuchten die Effekte von unterschiedlichen Laserleistungen des Flowzytometers anhand von Befruchtungsraten und der Embryonalentwicklung von Schweineembryonen. Entgegen den Erwartungen zeigten sich signifikante Werte bezüglich einer verminderten Befruchtungsrate, einem erhöhten Prozentsatz an fragmentierten Embryos und einer verlangsamten Embryonalentwicklung für eine Laserleistung von 25 mW, während sich bei einer Laserleistung von 125 mW keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe nachweisen ließen.

Gesammelte Daten aus 11 verschiedenen Feldversuchen mit Besamungen von 1000 Färsen mit flowzytometrisch sortiertem Sperma (G. E. SEIDEL, JR. et al. 1999) zeigten keine



erhöhte Resorptionsrate zwischen dem ersten und zweiten Trächtigkeitsmonat. Die aus diesen Besamungen resultierenden Kälber zeigten phänotypisch keine vermehrten Unterschiede zu Kälbern aus Kontrollbesamungen. FUGGER et al. (1998) berichtet von ausschließlich normalen und gesunden Kindern nach künstlichen Befruchtungen mit flowzytometrisch sortierten Spermien. Die geringe Anzahl an Nachkommen lässt eine statistische Aussage in diesem Fall jedoch noch nicht zu. Auch eine anatomische Untersuchung von über 400 Nachkommen vier verschiedener Spezies, welche aus Besamungen mit flowzytometrisch sortiertem Sperma hervorgegangen sind, konnte keine Auswirkungen des Sortierprozesses auf den anatomischen Phänotyp der Nachkommen feststellen (MORRELL u. DRESSER 1989). Neuere und ausführlichere epidemiologische Untersuchungen stammen von TUBMAN et al. (2004). Hier wurden 1,169 Kälber aus Besamungen mit flowzytometrisch sortiertem Sperma mit 793 Kälbern aus Kontrollbesamungen, anhand von Trächtigkeitsdauer, Leichtkalbigkeit, Vitalität der Kälber, Absatzgewicht, Abortrate und Todesrate (neonatal bis zum Absetzen) verglichen. Auch diese Studie konnte keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Trotz vielfältiger Untersuchungen zur Zelltoxizität, Embryonalentwicklung von Embryonen aus Hoechst<sup>®</sup> 33342-gefärbten Spermien und dem Zustand von Nachkommen, ist immer noch wenig bekannt über den Verbleib und das Schicksal des Farbstoffs im weiblichen Reproduktionstrakt oder dessen Langzeiteffekte. GARNER (2006) fordert daher zum einen eine Untersuchung weiterer membrangängiger, DNA-spezifischer Farbstoffe, welcher bei größeren Wellenlängen angeregt werden, da diese zu einer geringeren Mutagenität tendieren. Zum anderen ist eine Ausweitung epidemiologischer Studien notwendig um die Beobachtungen phänotypisch unauffälliger Nachkommen zu verifizieren (GARNER 2001).

## 2.2 Kryokonservierung von Hengstsperma

Zur Kryokonservierung von Hengstsperma sind nach BRINSKO u. VARNER (1992) verschiedene Basisschritte notwendig. Nach der Gewinnung wird das Ejakulat, zur Abtrennung des Seminalplasmas, zunächst verdünnt und zentrifugiert (CROCKETT et al. 2001). Es sollten jedoch ca. 5 bis 20% des Seminalplasmas in der Probe belassen werden, da hieraus höhere Prozentsätze der Spermienmotilität (JASKO et al. 1991) und der Akrosomenintegrität (DAWSON et al. 1999) nach der Kühlung resultieren. Nach der Zentrifugation wird das spermienreiche Retentat mit einem entsprechenden Tiefgefrierverdünner resuspendiert und auf die vorgesehene Konzentration verdünnt. Vor der Tiefgefrierung erfolgt eine Kühlung auf +5°C. GIL et al. (2003) empfahlen, Glycerin erst bei Erreichen von +5°C nach der Anpassungsphase dem Sperma zuzugeben, da dies die Auftaumotilitäten und die Membranintegritäten in ihrer Studie an Schafbockspermien verbesserte. Zu anderen Ergebnissen kamen VIDAMENT et al. (2000). In dieser Studie zeigte sich eine größere Auftaumotilität (40% vs. 36%) und eine höhere Trächtigkeitsrate pro Zyklus (56% vs. 42%), wenn den Spermien Glycerin bereits vor der Abkühlphase, bei +22°C statt erst bei +4°C zugegeben wurde. Nach der Anpassungsphase auf +4°C bzw. +5°C erfolgt die kontrollierte Tiefgefrierung auf -196°C und anschließende Lagerung in flüssigem Stickstoff. Die steigende Anzahl an Stuten, welche mit Tiefgefriersperma besamt werden, führte zu einer verstärkten Forschung im Bereich der Kryokonservierung von Hengstsperma. Verschiedene Studien fokussierten sich auf die Identifikation von schädigenden Einflüssen während des Einfrier- und Auftauvorgangs. Dabei wird generell zwischen oxidativen und osmotischen Schäden unterschieden. Die Forschung konzentriert sich daher im speziellen auf eine Verbesserung der Überlebensrate von Tiefgefriersperma durch Verminderung des osmotischen Stresses und der oxidativen Schäden. Im Vergleich zu Spermien anderer Spezies sind Hengstspermien, durch den hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, besonders anfällig für oxidativen Stress. Zusätzlich zu den Membraneffekten kann Lipidperoxidation auch zu DNA-Schäden führen (SQUIRES 2005).

SCHEMBRI et al. (2002) untersuchten kryokonserviertes Hengstsperma auf tiefgefrierbedingte, kapazitationsähnliche Veränderungen mittels Chlortetracyclin-Fluoreszenzfärbung. Dabei stellten sie fest, dass die beim Einfrieren und Auftauen von

Hengstpermien auftretenden, kapazitationsähnlichen Veränderungen zum einen zwar durch den Einfrier- und Auftauprozess selbst, vor allem aber durch das Entfernen des Seminalplasmas, bedingt werden.

### 2.2.1 Geschichtlicher Verlauf

Die erste Trächtigkeit aus kryokonserviertem Hengstesperma berichteten BARKER u. GANDIER (1957). Obwohl mittlerweile die Tiefgefrierverfahren für Hengstesperma verbessert wurden, eignet sich auch heute noch das Sperma vieler Hengste nicht zur Tiefgefrierung (SQUIRES et al. 2004). Über die erste Trächtigkeit durch kryokonservierte, sortierte Hengstpermien berichteten LINDSEY et al. (LINDSEY et al. 2002b).

### 2.2.2 Tiefgefrierverdünner für geschlechtsspezifisch sortiertes Hengstesperma

Eine hohe Überlebensrate der Spermien nach dem Sortiervorgang ist bereits aus dem Grunde, dass eine hohe Investition in diese Gameten getätigt wurde, besonders wichtig. Je höher der Anteil an befruchtungsfähigen, sortierten Spermien nach der Kryokonservierung oder nach gekühlter Frischlagerung ist, umso weniger Spermien müssen pro Besamungsdosis sortiert werden (GARNER 2006). Da aber, trotz Elimination toter und geschädigter Zellen, sortierte Spermien zu einer schnelleren Degeneration als unsortierte Proben tendieren (RATH et al. 2003a; RATH et al. 2003b), fordert GARNER (2006) ein Überdenken der Kryokonservierungsverfahren und der Lagerung sortierter Spermien.

BUSS (2005) verglich modifizierten Magermilchverdünner (INRA 82), der 2% klarifizierten Eidotter und verschiedene Konzentrationen Glycerin enthielt mit Lactose-EDTA-Verdünner, welcher mit 20% Eidotter und 4% Glycerin angereichert war. Auch LINDSEY et al. (2002b) setzten Lactose-EDTA-Verdünner mit Glycerin als Tiefgefrierverdünner für sortierte Hengstpermien ein.

#### 2.2.2.1 Bestandteile eines Tiefgefrierverdünners

Zwar ist es unwahrscheinlich, dass ein einzelner Zusatz im Tiefgefrierverdünner die Auftaumotilität und Fertilität dramatisch verbessern wird, trotzdem scheint es durchaus möglich, dass durch den Einsatz von Antioxidantien, Aminosäuren und eventuell alternativer

Kryoprotektiva die Tiefgefrierfähigkeit einiger Hengste verbessert werden kann (SQUIRES 2005).

Generell müssen dem Ejakulat zur Kryokonservierung spezielle Nähr- und Schutzsubstanzen zugesetzt werden. Zudem muss die Einhaltung des osmotischen Gleichgewichts zwischen Zellen und Medium und eine ausreichende Pufferkapazität des Verdünners im Bereich zwischen pH 6 und pH 7, sowie die Senkung des Spermienstoffwechsels und Keimwachstums durch Temperaturniedrigung und Antibiotikazugabe gewährleistet werden (WEITZE 2001). I.d.R. enthalten Tiefgefrierverdünner für Hengstesperma Zucker, Elektrolyte, Eidotter und Glycerin (HEITLAND et al. 1996). Glycerin ist als penetrierende Gefrierschutzsubstanz bei der Spermakryokonservierung zahlreicher Tierarten ein sehr bedeutendes Gefrierschutzmittel (PARKS u. GRAHAM 1992). Man geht davon aus, dass Glycerin wie andere Zellmembran penetrierende Schutzsubstanzen, durch seine wasserbindende Eigenschaft wirkt (WEITZE 2001). Es wird vermutet, dass Glycerin sowohl die Membranfluidität durch Einlagerung in die Lipiddoppelmembran, als auch alle metabolischen Reaktionen durch Wandlung der intrazellulären Viskosität verändert (HAMMERSTEDT u. GRAHAM 1992). Hengstpermien überstehen die Kryokonservierung nicht ohne Gefrierschutzsubstanzen (SQUIRES et al. 2004). Die Konzentration der dem Verdünner zugefügten Gefrierschutzsubstanz sollte deshalb zwar niedrig genug sein, um den toxischen Effekt möglichst gering zu halten, gleichzeitig jedoch den maximal möglichen Schutz bieten (GRAHAM 1996). BUSS (2005) untersuchte Glycerinkonzentrationen von 2,5% und 5% in einem modifizierten Magermilchverdünner zur Eignung bei der Kryokonservierung von geschlechtsspezifisch sortierten Hengstpermien. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Auch Eidotter wirkt kryoprotektiv, zählt jedoch zu den nicht penetrierenden Substanzen. Es ist bisher noch nicht gelungen, die wirksamen Komponenten des Eidotters eindeutig zu bestimmen und in definierten Medien zu verwenden. Während einerseits Lecithin als kryoprotektiv aktive Komponente des Eidotters angesehen wird (QUINN et al. 1980), wird andererseits dem Phosphatidylserin diese schützende Eigenschaft zugesprochen (BUTTLER u. ROBERTS 1975).

Puffer werden entweder in geringer Konzentration zur Aufrechterhaltung eines bestimmten pH-Wertes oder als Hauptkomponente verwendet, um die Pufferkapazität zu gewährleisten.

Proteine frischer oder gefriergetrockneter Magermilch haben ebenso wie z.B. der organische Puffer HEPES eine zufriedenstellende Pufferkapazität.

Zucker dienen zum einen als Energiesubstrate und zum anderen wirken sie in höhermolekularer Form als extrazellulärer Gefrierschutz, da sie die Zellmembran nicht passieren können. Hinsichtlich der Auftaumotilität sind Glukose und Fruktose in höheren Konzentrationen anderen Zuckern, wie Laktose, Succrose und Maltose überlegen (PAQUIGNON 1985).

#### 2.2.2.1.1 Antioxidantien (AO)

Es wurde bereits mehrfach versucht durch die Zugabe von Antioxidantien zu Verdünnermedien eine Reduktion der Lipidperoxidation zu erreichen (BALL et al. 2001; PENA et al. 2003; ROCA et al. 2004; ALMEIDA u. BALL 2005; KLINC 2005). SQUIRES (2005) vermutet, dass die Wirkung der Antioxidantien, als Zusätze bei der Kühlung von Hengstsperma, v.a. von der speziellen, antioxidativ wirksamen Substanz selbst und von deren Konzentration im Verdünnermedium abhängt. Diese Vermutung wird durch Versuche von BAUMBER et al. (2003) gestützt. In diesen Versuchen untersuchte man die Auswirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf die DNA-Integrität von Hengstspemien. Dabei konnten sie feststellen, dass es sowohl durch ROS als auch durch die Kryokonservierung selbst zu einer gesteigerten DNA-Fragmentation kommt. Beim Vergleich der antioxidativen Wirksamkeit von Katalase, Superoxiddismutase (SOD) und Glutathion konnte eine positive Wirkung jedoch nur für Katalase und Glutathion bestätigt werden. In einer aktuellen Studie verglichen ALMEIDA u. BALL (2005) die Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocopherolsuccinat auf die Lipidperoxidation und die Motilität von Hengstspemien.  $\alpha$ -Tocopherolsuccinat erwies sich beim Schutz vor Lipidperoxidation zwar als effektiver, jedoch zeigte sich, im Gegensatz zu  $\alpha$ -Tocopherol, auch eine verminderte Motilität.

Durch die Zugabe von Trolox, einem wasserlöslichen Vitamin E-Analogen, konnten PENA et al. (2003) eine Verbesserung der Auftaumotilität und eine gesteigerte mitochondriale Aktivität bei kryokonservierten Eberspermien erzielen. ROCA et al. (2004) konnten die Auftauvitalität von kryokonservierten Eberspermien steigern, indem sie den Tiefgefrierverdünner mit der fettlöslichen, antioxidativ wirksamen Substanz BHT (Butylhydroxytoluen) versetzten. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von BALL et al.

(2001), welche in ihrer Studie neben BHT auch Vitamin E, Trolox, Vitamin C, Katalase und BSA an Hengstspemien testeten. Dabei konnte durch keine der verwendeten Substanzen eine signifikante Verbesserung der Motilität bei einer Lagerung über 72 Stunden bei +5°C erzielt werden. BHT führte sogar zu einem signifikanten Abfall der Motilität.

Die negative Wirkung radikaler Sauerstoffspezies, welche sich an verschiedenen Stellen während des Sortierprozess bilden, kann durch den Zusatz antioxidativ wirksamer Substanzen minimiert werden (BECONI et al. 1993; MAXWELL u. STOJANOV 1996). KLINC (2005) nutzte erstmals Antioxidantien bei sortierten Bullenspermien. In dieser Studie zeigten Spermien, welche in Anwesenheit von Antioxidantien sortiert und aufbereitet wurden, eine signifikant höhere Motilität nach dem Auftauen und nach anschließendem Thermoresistenztest. Zusätzlich ließ sich auch ein positiver Effekt auf die Spermienmorphologie beobachten. So war die Anzahl an morphologischen Abweichungen im Vergleich zu herkömmlich sortierten Spermien signifikant verringert. Diese Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse aus Studien an unsortierten Spermien (DE LAMIRANDE u. GAGNON 1992; BILODEAU et al. 2002)

### 2.2.3 Selektive Separationsverfahren zur Erzielung qualitativ hochwertiger Spermienpopulationen

Ejakulate in ihrer nativen Form enthalten neben den bestimmenden Komponenten wie Spermien und Seminalplasma zum Teil auch beigemengte Bestandteile wie z.B. Epithelzellen oder Smegmabestandteile. Selbst in normospermen Ejakulaten ist immer auch ein gewisser Anteil morphologisch und sicher auch in ihrer Funktion veränderter Spermatozoen enthalten (SIEME et al. 1997). In der Pferdebesamung ist es üblich Ejakulate zum späteren Gebrauch in der Besamung, durch Verdünnung mit speziellen Verdünnermedien und mittels Zentrifugation mit anschließender Resuspension aufzubereiten. Dieses herkömmliche Verfahren führt jedoch nicht zu einer Selektion der Spermien höherer Qualität vom übrigen Ejakulat, welches aus einzelnen Subpopulationen von Spermien besteht (SIEME et al. 2003) und stellt immer einen Kompromiss zwischen Spermienrückgewinnung und Minimierung der Spermienbelastung dar (PICKETT et al. 1975; KNOP et al. 2005). Vergleichende Übersichten verschiedener Techniken zur morphologischen und funktionellen Selektion wurden für den humanmedizinischen Bereich von MORTIMER (1994; 2000) veröffentlicht. Im Bereich der

Veterinärmedizin liegen entsprechende Übersichten zum Rind (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al. 1997) und zum Pferd (SIEME et al. 2003) vor. Ziel verschiedener Untersuchungen war es, Verfahren zu entwickeln, mit denen sich möglichst schonend und effizient die Spermien vom Seminalplasma trennen und die vorwärtsbeweglichen, morphologisch normalen Spermien aus dem Gesamtejakulat selektieren lassen. SIEME et al. (2003) teilen die Verfahren zur Spermienseparation generell in vier Kategorien ein: (1) Zentrifugation und Resuspension, (2) Transmigrationsverfahren, (3) Dichtegradientenzentrifugation und (4) Verfahren unter Verwendung adhäsiver Substanzen (z.B. Glaswolle-Sephadex-Filtration).

Als ein modifiziertes Verfahren der herkömmlichen Zentrifugation zur Aufbereitung von Hengstsperma für die Kryokonservierung, steht die Kissenzentrifugationstechnik zur Verfügung. Diese Technik ermöglicht das Arbeiten mit hohen Zentrifugalkräften, um höhere Rückgewinnungsraten zu erreichen. Vorteil dieser Technik ist, dass der physikalische Schaden durch die Gravidationskräfte und Pelletierung vermindert wird, indem die Spermien während der Zentrifugation auf einer weichen, kissenähnlichen Flüssigkeit mit hoher Dichte schwimmen (MAKLER et al. 1984; KNOP et al. 2005). Wie auch bei der herkömmlichen Zentrifugationstechnik, kann auch durch die Kissenzentrifugation lediglich eine Separation der Spermien vom Seminalplasma erreicht werden, eine Selektion zwischen den Spermienpopulationen ist durch diese Technik allerdings nicht möglich. Die Zentrifugation hat außerdem den Nachteil, dass alle korpuskulären Elemente des Ejakulates im Zentrifugat konzentriert und nicht oder allenfalls in geringem Maße von der Spermienfraktion separiert werden können (SIEME et al. 1997).

Transmigrationsverfahren dienen der Selektion motiler und normomorpher Spermien aus normo- oder pathospermen Ejakulaten. Das Prinzip beruht auf der Fähigkeit dieser Spermien aktiv aus der Aufbereitungssuspension in ein angrenzendes Medium überzuwandern, während Partikeln ohne Eigenbewegung dies nicht möglich ist (OETTLE u. WISWEDEL 1989; KRÖGER 1991). Aufgrund der Tatsache, dass die quantitative Selektion der Transmigration sehr gering ist, hat sich die Anwendung dieses Verfahrens bisher hauptsächlich auf die spermatologische Diagnostik vor allem zur Beurteilung konservierter Samendosen begrenzt (HENRIC-PETRI 1993). KRÖGER (1991) konnte in Abhängigkeit der Transmigrationsmedien maximale Migrationsraten von 5-12% der Ausgangspopulation

erreichen. SIEME et al. (1997) bewerteten Transmigrationsverfahren aufgrund dessen als nicht praktikabel für die Routineanwendung in der Pferdebesamung.

Durch verschiedene Filtrationstechniken wurde die adhäsive Wirkung bestimmter Substanzen zur Spermien Selektion genutzt. Studien an Hengstspermien wurden bisher durch Glaswoll- und Glaswoll-Sephadexfiltration (WALTER 1992; HENRIC-PETRI 1993), Glaskugelfiltration (KLINC et al. 2005) und mittels spezieller Filtermembranen (MARTINSSON 1995) durchgeführt. WALTER (1992) und HENRIC-PETRI (1993) konnten anhand ihrer Studien belegen, dass hinsichtlich der Separation einer morphologisch weitgehend intakten und motilen Spermienpopulation die Glaswoll-Sephadexfiltrationsmethode einer der Zentrifugation gleichwertige Selektionsmethode ist, die zudem den Vorteil hochgradiger Fremdpartikelfreiheit bietet.

Bei der Dichtegradientenzentrifugation wird generell zwischen der Zentrifugation mit einem kontinuierlichen oder einem diskontinuierlichen Gradienten unterschieden (WALTER 1992). LE LANNOU und BLANCHARD (1988) halten den Einsatz des diskontinuierlichen Gradienten zur Trennung von Spermien für geeigneter, da sich die Spermien aufgrund ihrer morphologischen Veränderungen entlang der verschiedenen Gradienten verteilen. Obwohl bereits bis zu sechs verschiedene Gradientenschichten effektiv eingesetzt wurden (HYNE et al. 1986), gilt eine zweifache Gradientenschichtung als Standard (BONGSO et al. 1993). Als Medium für die Dichtegradientenzentrifugation wurde bisher vorwiegend Percoll verwendet. Percoll ist ein mit Polyvinylpyrrolidin beschichtetes polymerisiertes Kieselsäuregel. Bei Suspension mit einem partikelhaltigem Medium und nach Veränderung der Gravität stellt sich ein entsprechender Dichtegradient ein, dessen anteilige Schichtungen isoliert abgetrennt werden können (SIEME et al. 1997). Ergebnisse von WALTER (1992) belegen, dass dieses Verfahren sehr gut geeignet ist, um partikuläre, nicht spermale Ejakulatanteile sicher abzutrennen. Mit 50 bis 60% waren die Rückgewinnungsraten deutlich besser im Vergleich zur Transmigration. Die durch Zentrifugation über einem kontinuierlichen Percollgradienten erhaltene Spermienpopulation zeigte allerdings eine verringerte Anzahl an vorwärtsbeweglichen Spermien, einhergehend mit einem Anstieg an hypermotilen, ortsbeweglichen Spermien, sowie vermehrter Agglutination der Spermien untereinander. Bei einerseits signifikant erhöhtem Anteil formnormaler Spermien, war gleichzeitig der Anteil an Spermien mit leicht morphologisch veränderten Akrosomen erhöht. Während MORTIMER



(1994) vermutete, dass diese negativen Effekte durch die Kieselsäurepartikel selbst verursacht wurden, führten AVERY u. GREVE (1995) dies auf nicht gebundenes Polyvinylpyrrolidon zurück. SIEME et al. (1997) bezeichnen die Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll als ein sehr gutes Selektionsverfahren für Hengstspemien. Für den Gebrauch in der Praxis halten sie es jedoch für ungeeignet, da die Methode sehr aufwendig ist und die Spermienpopulation aus dem Gradienten für eine weitere Verwendung vom Medium freigewaschen werden muss.

#### 2.2.4 Temperaturverlauf während des Einfriervorgangs

Bei der Kryokonservierung von Spermien steigt die Überlebensrate der Spermien zunächst mit steigender Gefrierrate an, um dann nach Erreichen eines Optimums mit zunehmender Gefrierrate wieder abzufallen (WEITZE 2001; MAZUR u. KOSHIMOTO 2002). Schnelle Einfrierraten verursachen intrazelluläre Eiskristalle, die aber zunächst unschädlich sind. Erst die Zusammenballung dieser kleinen Eiskristalle aufgrund ihrer großen Oberflächenenergie und damit verbundener Instabilität bei zu langsamem Auftauen verursachen Zellschäden, weshalb die Auftaurate immer der Einfrierrate angepasst werden muss (MAZUR 1980). Zur Kryokonservierung von Hengstsperma sind Kühlraten von 10-50°C/min, mit relativ niedrigen Konzentrationen an Kryoprotektiva üblich. Die Anzahl an Studien zum Effekt der Kühlrate bei der Kryokonservierung von Hengstsperma ist jedoch sehr gering (SQUIRES 2005). Generell hängt der Temperaturverlauf, sowohl beim Einfrieren, als auch beim Auftauen von Spermien u.a. von der Art der Konfektionierung und von der Zusammensetzung des Verdünnermediums ab. Da die Erhaltung der Befruchtungsfähigkeit von vielen Einflussfaktoren vor und nach dem eigentlichen Verarbeitungsprozess abhängig ist, ist die Optimierung aller Faktoren sehr kompliziert (PURSEL u. PARKS 1985). WATSON (2000) bezeichnet relativ hohe Gefrierraten von 15 – 60°C/min als am günstigsten für das Überleben der Spermien. DEVIREDDY (2002) verglich verschiedene Gefrierraten zwischen 2°C/min und 130°C/min zur Kryokonservierung von Hengstsperma. Die Vitalität der Spermien war zwischen 20°C/min und 130°C/min relativ konstant. Für Kenney- und Lactose-EDTA-Verdüner im speziellen wurde eine Gefrierrate von 60°C/min als optimal erkannt. Zum Vergleich drei verschiedener Tiefgefriersysteme für Ebersperma untersuchten THURSTON et al. (2003) die tiefgefrorenen Spermien auf Motilität, Plasmamembran- und Akrosomenintegrität. Die Spermien wurden bei allen drei Systemen einheitlich mit 6°C/min

auf  $-5^{\circ}\text{C}$  abgekühlt und dort für 30 Sekunden gehalten. Die weitere Kühlung bis auf  $-80^{\circ}\text{C}$  erfolgte mit  $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  und  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , je nach System. Sperma, welches mit  $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  eingefroren wurde, zeigte eine signifikant schlechtere Vitalität als jenes, welches mit  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$  gekühlt wurde. Die Motilität zwischen den zwei Programmen, welche mit  $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$  kühlten, war zugunsten jenes Programms verschoben, welches bei der Eiskristallbildung bei  $-5^{\circ}\text{C}$  keinen Temperaturanstieg zeigte. BWANGA et al. (1991) verwendeten drei verschiedene Einfrierprogramme zur Kryokonservierung von Ebersperma. Programm A kühlte dabei von  $+5^{\circ}\text{C}$  mit  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bis auf  $-6^{\circ}\text{C}$  ab, stoppte bei  $-6^{\circ}\text{C}$  für eine Minute und kühlte dann mit  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  bis auf  $-100^{\circ}\text{C}$  herunter. Das Programm B glich dem ersten, mit dem Unterschied, dass bei  $-6^{\circ}\text{C}$  keine Plateauphase eingefügt war und dass die Kühlrate  $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$  statt  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  betrug. Programm C kühlte von  $+5^{\circ}\text{C}$  bis  $-100^{\circ}\text{C}$  mit einer Rate von  $35^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Programm A konnte anschließend die besten Auftausergebnisse vorweisen. CHAVEIRO et al. (2006) unterteilten den Temperaturverlauf bei der Kryokonservierung von Bullenspermien in drei Abschnitte. Im ersten Abschnitt von Raumtemperatur bis zur Haltetemperatur erfolgte die Kühlung mit Raten von 0,2, 0,75 und  $3,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Die Haltetemperatur wurde bei 13, 9, 5 und  $1^{\circ}\text{C}$  gewählt. Der zweite Kühlabschnitt von der Haltetemperatur bis  $-6^{\circ}\text{C}$  erfolgte mit Kühlraten von 50, 20, 4 und  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Der letzte Abschnitt bis  $-100^{\circ}\text{C}$  erfolgte dann mit 10, 80 und  $150^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Für die zwei ersten Abschnitte wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden. Die Haltetemperatur war signifikant besser für Temperaturen zwischen  $+5^{\circ}\text{C}$  und  $+9^{\circ}\text{C}$ . Im letzten Abschnitt ergaben sich signifikant bessere Werte für die beiden höheren Kühlraten von 80 und  $150^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . FISER (1990) deutet zudem auf einen Zusammenhang zwischen der Glyzerinkonzentration und der Einfrier- und Auftaurate hin. Für eine Glyzerinkonzentration von 3% wird eine Einfrierate von  $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$  und eine Auftaurate von  $1200^{\circ}\text{C}/\text{min}$  empfohlen. Der Temperaturverlauf im Gefriergut lässt sich prinzipiell in drei Abschnitte gliedern. Der erste Abschnitt kennzeichnet die flüssige Phase. Dabei bleibt das einzufrierende Sperma bis unter den Gefrierpunkt flüssig. Sobald die Kristallisation einsetzt, wird Energie in Form von Wärme frei. Der Temperaturbereich zwischen  $0^{\circ}\text{C}$  und  $-10^{\circ}\text{C}$  gilt als kritisch für die Bildung von Eiskristallen (CHECK et al. 1994; MAZUR u. KOSHIMOTO 2002). Diese Phase des kurzzeitigen Temperaturanstiegs wird als „Rebound Effect“ bezeichnet. Je nachdem wie gut die Wärme an die Umgebung abgegeben wird, zeigt sich in der Temperaturverlaufskurve statt

des Temperaturanstiegs ein „Gefrierplateau“. CHECK et al. (1994) bezeichnet die Bildung von intrazellulären Eiskristallen als einen Hauptfaktor bei der Schädigung der humaner Spermien während des Kryokonservierungsprozesses. In ihrer Studie versuchten CHECK et al. (1994) mit einer sogenannten „Modified Rapid Cryopreservation Technique“ die Aufenthaltszeit des Gefrierorgans im Bereich von 0°C bis -10°C zu reduzieren und somit die Auftauqualität der Spermien zu verbessern. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zum Standardverfahren festgestellt werden. Außerdem besteht während des Überganges der Membranen von der flüssigen in die Gelphase die Gefahr der Destabilisierung der Spermienmembranen (SQUIRES 2005). Ist die Kristallisation abgeschlossen, kühlt das Gefriergut in der letzten Phase schnell bis auf die Endtemperatur ab. MAZUR u. KOSHIMOTO (2002) zeigten anhand eines Modells an Mäusespermien jedoch, dass auch zu hohe Kühlraten schädigend wirken können, da bei überschreiten bestimmter Kühlraten das Wasser nicht schnell genug aus dem Intrazellularraum der Spermien entweichen kann und in dem Fall intrazelluläre Eiskristalle bildet. MORRIS (2006) untersuchte humane Spermien, die mit hohen Tiefgefriereraten eingefroren worden waren, mittels der sogenannten „Cryo Scanning Electron Microscopy“ und konnte keine Anzeichen intrazellulärer Eiskristallbildung finden. Die Schäden die Spermien, welche mit hohen Tiefgefriereraten eingefroren wurden, nach dem Auftauen zeigen, sind nach MORRIS (2006) Folge eines osmotischen Schocks, welcher durch den Auftauprozess verursacht wird. MAZUR (1985) bezeichnet den Temperaturbereich von -15°C bis -60°C als den Bereich in dem die Hauptschäden bei der Tiefgefrierung von Zellen entstehen. Sobald diese Temperatur unterschritten ist, sind die Zellen weitgehend „inert“ und können zur Lagerung in flüssigen Stickstoff getaucht werden (GRAHAM 1996).

Aktuelle Studien zur Entwicklung alternativer Einfrierverfahren, wie die „Unique Freezing Technology“ (GOOLSBY et al. 2004), bei der das Gefriergut in einem Bad mit einer speziellen organischen Flüssigkeit und einer Gefriereratte von 6,1°C/min eingefroren wird oder die Verwendung von „Ultra Freezern“ (ALAMO et al. 2005) zur Tiefgefrierung bis -152°C, konnten das herkömmliche Verfahren mit flüssigem Stickstoff bisher nicht übertreffen.

Eine erste Studie zum Vergleich verschiedener Temperaturverläufe bzw. Verfahren zur Kryokonservierung von flowzytometrisch sortiertem Hengstsperma führte BUSS (2005) durch. In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied zwischen sortierten Spermien,

welche in einem computergesteuerten Einfrierautomat mit 60°C/min eingefroren wurden und solchen, welche für mindestens 7 Minuten im Stickstoffdampf lagerten, bevor sie in flüssigen Stickstoff eingetaucht wurden, festgestellt werden.

## 2.3 Beurteilung qualitätsrelevanter Parameter von Hengstsperma

Die Tatsache, dass ein einzelner Hengst i.d.R. mit einer Vielzahl Stuten angepaart wird, macht die Fertilität der Hengste zu einem bedeutenden Faktor beim Gesamterfolg eines Zuchtprogramms. Da die genaue Evaluierung der Fertilität der Hengste per se eine große Anzahl geschlechtsgesunder Stuten zur Anpaarung erfordern würde und dann auch nur retrospektiv bewertet werden könnte, wäre es ideal die Fertilität eines Hengstes vor Beginn seiner Zuchtkarriere vorhersagen zu können. Zur Zeit wird dies in Form einer gründlichen anatomischen Untersuchung, sowie einer routinemäßigen Samenuntersuchung durchgeführt. Durch eine derartige „Zuchttauglichkeitsuntersuchung“ können zwar eindeutig unfruchtbare Hengst ausgeschlossen werden, jedoch ist auf diese Weise keine Vorhersage über die genauere Qualität der Fruchtbarkeit möglich. Ebenso wenig eignet sich diese Untersuchung zum Ausschluss subfertiler Hengste (COLENBRANDER et al. 2003). Durch mehr oder weniger zufriedenstellende Korrelation verschiedener Spermienfunktionstests kann die Fertilität jedoch genauer bestimmt werden. Durch die Kombination verschiedener Spermienfunktionstests kann die Verlässlichkeit der Fertilitätsbestimmung gesteigert werden. In der aktuellen Forschung konzentriert man sich daher momentan auf die Auswahl bestimmter Test, durch welche möglichst viele bedeutende Qualitätsmerkmale der Spermien schnell und möglichst günstig festgestellt werden können (COLENBRANDER et al. 2003). In dieser Hinsicht hat sich vor allem die Flowzytometrie als besonders geeignet erwiesen, da sie eine objektive und schnelle Analyse mehrerer Spermienparameter gleichzeitig, bei einer sehr großen Spermienzahl ermöglicht. Mittlerweile sind verschiedene Färbungen für Spermienparameter wie Vitalität, Kapazitation, Akrosomenstatus, Mitochondrienmembranpotential und Chromatinintegrität erhältlich (COLENBRANDER et al. 2003).

KIRK et al. (2005) untersuchten Tiefgefrierspermaproben verschiedener Hengste unter Berücksichtigung flowzytometrischer Untersuchungen auf Vitalität, Akrosomenintegrität und

Mitochondrienmembranpotential, sowie visueller und computergestützter Motilitätsanalyse und verglichen die Ergebnisse mit der Fruchtbarkeit der Hengste. Das Ziel dieser Untersuchung war es ein möglichst verlässliches Analyseverfahren zu Bestimmung des Fruchtbarkeitspotentials einzelner Spermaproben zu erstellen. Es wurden unter Verwendung der vier Variablen (Vitalität, Akrosomenintegrität, Mitochondrienmembranpotential, Motilität) verschiedene Integrationsmodelle entwickelt. Das Modell, welches als das praktischste empfunden wurde, verwendete zum einen die visuell bestimmte Motilität nach 0 und 90 Minuten und zum anderen den Anteil lebender Spermien und den Anteil lebender Spermien mit intaktem Akrosom. Dieses Modell konnte die Fruchtbarkeitsunterschiede zwischen den Hengsten bei Erstbesamungen zu 79% erklären. Es zeigte sich bei diesen Untersuchungen, dass durch Berufung auf nur eine einzelne der vier Variablen keine angemessene Erklärung der Fruchtbarkeitsunterschiede der Hengste erfolgen konnte. Durch die Kombination der Ergebnisse verschiedener Untersuchungen, welche verschiedene Spermieigenschaften messen, kann jedoch eine verbesserte Bewertung des Fruchtbarkeitspotential von Tiefgefrierspermaproben, sowie eine effektive Bewertung neuer Kryokonservierungsverfahren erfolgen (KIRK et al. 2005).

Zu gleichen Erkenntnissen kamen WILHELM et al. (1996). Sie verwendeten flowzytometrische Verfahren zur Untersuchung der Vitalität der Spermien, den Anteil der motilen Spermien, sowie die Hamsteroozytenpenetration (Anteil der penetrierten Hamsteroozyten). Für die einzelnen Parameter zeigte sich keine hohe Korrelation zur Fruchtbarkeit der Hengste. Das Modell jedoch, welches sich aus allen drei Parametern zusammensetzte zeigte eine hohe Korrelation zur Fruchtbarkeit der Hengste (WILHELM et al. 1996).

### 2.3.1 Motilität

Die Motilitätsbestimmung ist wichtiger Bestandteil jeder routinemäßigen Spermauntersuchung. Zwar ist nur durch sie keine genauere Aussage über die Fertilität des Spermas möglich (KIRK et al. 2005), andererseits aber ist dies die einfachste und schnellste Methode sich einen Überblick über die Spermaqualität zu verschaffen (WABERSKI et al. 1999). Außerdem stellt die Motilität eine essentielle Vitalitätseigenschaft der Spermien dar, ohne die eine Befruchtung in vivo nicht möglich ist. Durch eine Vielzahl von Studien wurde

versucht eine mögliche Korrelation zwischen der Motilität der Hengstpermien und der Fertilität zu bestimmen. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind teils widersprüchlich. Während einerseits eine positive Korrelation gefunden wurde (DOWSETT u. PATTIE 1982; JASKO et al. 1992; CLEMENT et al. 1995), konnten andere Studien diese Ergebnisse nicht bestätigen (VOSS et al. 1981; PALMER u. MAGISTRINI 1992; SIEME et al. 2001).

Verschiedene Studien an kryokonserviertem Hengstperma zeigten, dass sich der Anteil progressiv beweglicher Spermien beim Kryokonservierungsprozess um bis zu 60 Prozent reduziert (COCHRAN et al. 1983; CHRISTANELLI et al. 1984; KLOPPE et al. 1988). Bei Versuchen mit flowzytometrisch sortierten Bullenspermien stellten SCHENK et al. (1999) fest, dass der Motilitätsverlust durch den Sortierprozess wesentlich geringer war als der Motilitätsverlust, welcher durch die Kryokonservierung induziert wurde.

## 2.3.2 Flowzytometrische Untersuchungen

Während die meisten Labortests zur Evaluierung der Spermaqualität keine besonders hohe Korrelation zur Fertilisationskapazität zeigen, bietet die Nutzung einer Vielzahl an Fluorochromen in Verbindung mit der Flowzytometrie die Möglichkeit einer weitgefächerten Analyse verschiedener Spermienattribute (GILLAN et al. 2005). Idealerweise wünscht man sich einen Labortest der mehrere Spermienparameter gleichzeitig misst (COLENBRANDER et al. 2003; KIRK et al. 2005; SQUIRES 2005). Zusätzlich bietet die Flowzytometrie den Vorteil eine große Anzahl an Spermien in einem relativ kurzen Zeitraum zu bewerten (GILLAN et al. 2005). Diese Technologie ist besonders nützlich zur Bewertung verschiedener Kühl- und Gefrierverfahren und deren Auswirkung auf die Spermien (SQUIRES 2005).

### 2.3.2.1 Plasmamembranintegrität

Die Plasmamembranintegrität und -funktionalität ist nach JEYENDRAN et al. (1984) von erheblicher Bedeutung für die Vitalität und Befruchtungsfähigkeit der Spermien.

Es gibt verschiedene Methoden zur Bestimmung der Spermiovitalität, jedoch sind die meisten sehr langsam und schlecht reproduzierbar. Zudem umfassen sie oft nur 100 bis 200 Spermien (MERKIES et al. 2000).

### 2.3.2.1.1 Techniken zur Bestimmung der Plasmamembranintegrität

Mit Hilfe der Kombination von SYBR<sup>®</sup>14 und PI (Propidiumjodid) lässt sich die Plasmamembranintegrität bei Spermien durchflusszytometrisch bestimmen (GARNER et al. 1994). Da PI ein nicht membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff ist, gelingt eine Kernfärbung der Spermien mit PI nur bei geschädigter Plasmamembran. SYBR<sup>®</sup>14 ist membranpermeabel und färbt somit jede Zelle unabhängig vom funktionellen Zustand. Verwendet man beide Farbstoffe in Kombination wird bei geschädigter Spermienmembran SYBR<sup>®</sup>14 durch PI verdrängt (KRIENKE 2003). Spermien mit geschädigter Plasmamembran haben eine rote Kernfärbung, Spermien mit intakter Plasmamembran sind grün gefärbt und Spermien mit teilweise geschädigter Plasmamembran sind sowohl grün als auch rot gefärbt. GARNER et al. (1994) bezeichneten diese doppelt gefärbten Spermien als moribund. Da diese moribunden Spermien bereits erste Degenerationserscheinungen der Zellmembran zeigen, werden sie von GARNER und JOHNSON (1995) zu den toten Spermien gezählt. Der prozentuale Anteil der doppelt gefärbten Spermien war bei aufgetauten Tiefgefrierspermaproben deutlich höher, verglichen mit den entsprechenden flüssigkonservierten Spermaproben. Daher beurteilen die Autoren diese Population von Spermien als einen guten Indikator für schädliche Einflüsse, die bei der Lagerung und dem Umgang mit TG-Proben auf diese einwirken. NEILD et al. (2003) führten eine Studie durch, um festzustellen zu welchem Zeitpunkt des Tiefgefrier- und Auftauprozesses Membranveränderungen auftreten. Dabei stellten sie fest, dass die größte Schädigung der Plasmamembranen durch den Auftauprozess entsteht.

LOVE et al. (2003) verglichen die Spermienmotilität mit der Vitalität in frischem Hengstsperma, welches mit verschiedenen Konzentrationen an toten Spermien versehen war. Sie nutzten ebenfalls SYBR<sup>®</sup>14 und PI zur Vitalitätsbestimmung und konnten eine hohe Korrelation feststellen. Zu ähnlichem Ergebnis kamen GARNER et al. (1997b) bei kryokonservierten Bullenspermien. Zur Möglichkeit der Fertilitätsprognose mittels Bestimmung der Plasmamembranintegrität liegen verschiedene Ergebnisse vor. Während durch einige Studien keine Korrelation festgestellt werden konnte (THOMAS et al. 1996; GARNER et al. 1997a), zeigten andere eine signifikante Beziehung zwischen Plasmamembranintegrität und Fertilität auf (CHRISTENSEN et al. 2000; DIGRASSIE 2000).

### 2.3.2.2 Akrosomenintegrität

Intakte und reaktionsfähige Akrosomen sind Voraussetzung für die Befruchtungsfähigkeit der Spermien (BLOTTNER et al. 1998). Bei der Beurteilung des akrosomalen Status *in vitro*, ist zwischen der echten und der falschen Akrosomenreaktion zu unterscheiden (BEDFORD 1970). Die echte Akrosomenreaktion stellt den physiologischen Vorgang dar, die falsche Akrosomenreaktion hingegen ist das Ergebnis degenerativer Veränderungen des Akrosoms, bedingt durch Autolyse (BEDFORD 1970).

#### 2.3.2.2.1 Techniken zur Bestimmung der Akrosomenintegrität

In einer Studie an kryokonservierten Bullenspermien kombinierten THOMAS et al. (1997) erstmals die drei Fluoreszenzfarbstoffe FITC-PNA, SYTO<sup>®</sup>17 und PI. Durch diese Färbemethode können gleichzeitig Akrosomenintegrität und Vitalität bestimmt werden. Arachis hypogaea Lectin (PNA) gekoppelt an Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) dient zur Bestimmung des akrosomalen Status der Spermien. FITC-PNA bindet selektiv an die äußere Akrosomenmembran und emittiert nach Laseranregung grünes Licht. SYTO<sup>®</sup>17 ist ein fluoreszierender Farbstoff, der ähnlich wie SYBR<sup>®</sup>14 die DNA aller Spermien anfärbt und nach Laseranregung Licht im orangen Bereich emittiert. Propidiumjodid (PI) färbt, im Gegensatz zu SYTO<sup>®</sup>17, nur tote Spermien an (KRIENKE 2003). Tote Spermien sind also durch eine rote Fluoreszenz gekennzeichnet. Bei unfixierten, vitalen Spermien ist die Plasmamembran, die über der äußeren Akrosomenmembran verläuft, nicht permeabel für FITC-PNA (CHENG et al. 1996). Folglich färben sich vitale Spermien mit intaktem Akrosom nur mit SYTO<sup>®</sup>17 an und fluoreszieren somit orange. Bei erfolgter Akrosomenreaktion kann FITC-PNA an die äußere Akrosomenmembran binden. Vitale und gleichzeitig akrosomenreagierte Spermien fluoreszieren deshalb orange und grün (KRIENKE 2003). Spermien mit geschädigter Plasmamembran, bei denen die äußere Akrosomenmembran zumindest in Teilen noch erhalten ist, sind durch eine rote Kernfärbung und eine grün fluoreszierende Kopfkappe gekennzeichnet. Eine vierte Spermienpopulation, die sich nur durch PI anfärben lässt, schließt Spermien mit völliger Degeneration und Verlust des Akrosoms ein (RATHI et al. 2001; KRIENKE 2003).



### 2.3.2.3 Mitochondrienmembranpotential

Die Aufgabe der Mitochondrien besteht hauptsächlich in der Bereitstellung von Energie in Form von ATP-Molekülen für die Motilität der Spermien (GRAVANCE et al. 2000). Eine korrekte und fehlerfreie Funktion der Mitochondrien ist daher von besonderer Bedeutung für die Fortbewegung der Spermien und hat direkten Einfluss auf diese (AUGER et al. 1989). Als Mitochondrienmembranpotential (MMP) wird der elektrochemische Gradient an der inneren Mitochondrienmembran bezeichnet, der durch die Ausschleusung von Protonen, während der oxidativen Phosphorylierung der Atmungskette, aus der Mitochondrienmatrix entsteht (LEHNINGER et al. 1994; KRIENKE 2003). Dieser elektrochemische Gradient an der inneren Mitochondrienmembran dient der Synthese der ATP-Moleküle. Daher lässt sich über die Höhe des MMP die Mitochondrienfunktion und der Energiestatus der Spermien beurteilen (COSSARIZZA et al. 1993). Das MMP intakter Mitochondrien beträgt zwischen -180 und -200mV (COSSARIZZA et al. 1996).

#### 2.3.2.3.1 Techniken zur Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials

GARNER et al. (GARNER et al. 1997b) verwendeten drei verschiedene Fluoreszenzfärbungen zur Bestimmung der Mitochondrienfunktion kryokonservierter Bullenspermien. Bei den verwendeten Farbstoffen handelte es sich um Rhodamin 123 (R123), 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid (JC-1) und MitoTracker Green FM (MITO). Die Autoren stellten für jede der drei fluorometrischen Messverfahren eine hohe Korrelation untereinander, sowie mit den Ergebnissen aus der Vitalitäts- und Motilitätsbestimmung fest. Jedoch bietet die Verwendung von JC-1 gegenüber Rhodamin 123 und MitoTracker Green FM den Vorteil, dass zwischen Mitochondrien mit hohem und niedrigem MMP unterschieden werden kann.

Das lipophile, membranpermeable Cyanid 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolcarbocyaninjodid (JC-1) ist ein Kation mit einer delokalisierten Ladung (REERS et al. 1991), welches monomer oder in Aggregatform vorliegen kann. Zur Einschleusung in die Mitochondrienmatrix bedarf es der monomeren Form (COSSARIZZA et al. 1996). Da es sich um ein Kation handelt, ist der Einstrom um so stärker, je höher das MMP ist. Ab einem Schwellenwert von -80 bis -100 mV bilden sich reversibel JC-1-Aggregate (KRIENKE 2003). Bei Laseranregung fluoresziert die monomere Form von JC-1 mit einer

Wellenlänge von 510-520 nm grün , während in Aggregatform bei 590 nm oranges Licht emittiert wird (REERS et al. 1991; GARNER u. THOMAS 1999). Dies ermöglicht eine Abgrenzung zwischen Mitochondrien mit hohem und solchen mit niedrigem MMP.

#### 2.3.2.4 DNA-Integrität

Die Integrität der Spermien-DNA ist von besonderer Bedeutung für den genetischen Beitrag des Vartieres zur Entwicklung normaler Nachkommen (EVENSON u. JOST 2000). Während der Spermatogenese und der epidydimalen Reifung kommt es zu einer starken Kondensierung des Chromatins der Spermien-DNA. Die kondensierte Form des Chromatins dient der Resistenz gegenüber äußeren Schädwirkungen (EVENSON u. JOST 2000) und ist vermutlich der Grund für die größere Stabilität gegenüber potentiell mutagenen Effekten des UV-Lichts und des Hoechst 33342-Farbstoffs, im Vergleich zur DNA somatischer Zellen (CATT et al. 1997; MAXWELL et al. 2004). MADRID-BURY et al. (2005) konnten eine signifikante Korrelation zwischen der Chromatininstabilität kryokonservierter Spermien fünf verschiedener Bullen mit der Non-Return-Rate feststellen. Bullen mit höherer Fertilität zeigten eine höhere Spermienchromatininstabilität. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen BOCHENEK et al. (2001) in einer Studie mit Tiefgefriersperma von acht verschiedenen Bullen. EVENSON u. JOST (2000) bezeichnen das Fertilitätspotential von Samenproben mit  $COMP_{\alpha_t}$ -Werten (Anteil Spermien mit denaturierter DNA) von 0-15%, 16-24%, 25-30% und >30%, als sehr hoch, hoch, mäßig und sehr gering. LARSON et al. (2000) konnten durch humane Spermien mit  $COMP_{\alpha_t}$ -Werten über 27% keine Schwangerschaften durch IVF und ICSI mehr erzielen.

Über die Ätiologie der Anfälligkeit für eine potentielle DNA-Denaturierung ist bisher wenig bekannt (EVENSON u. JOST 2000). Als mögliche Ursachen werden radikale Sauerstoffspezies (SQUIRES 2005), Alter (SPANNO et al. 1998), erhöhte Körpertemperatur (EVENSON et al. 2000a), Zigarettenrauch (POTTS et al. 1999) und diverse Umwelteinflüsse, wie z.B. Luftverschmutzung (SELEVAN et al. 2000) diskutiert.

##### 2.3.2.4.1 Techniken zur Bestimmung der DNA-Integrität

Verschiedenen Studien mit Bullen- (BALLACHEY et al. 1987; BALLACHEY et al. 1988; EVENSON 1999), Hengst- (C. LOVE u. KENNEY 1994; EVENSON et al. 2000b) und Ebersperma (EVENSON et al. 1994) bestätigen den Wert der

Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA) für die Fertilitätsbestimmung. Dieser gut reproduzierbare Test misst die Anfälligkeit der Spermien-DNA für denaturierende Prozesse (EVENSON u. JOST 2000). Er beruht auf dem Prinzip, dass abnormal strukturiertes Spermienchromatin eine höhere Anfälligkeit für physikalisch induzierte Denaturierung zeigt (DIGRASSIE 2000). Durch eine initiale Säuredenaturierung wird der DNA-Doppelstrang abnormal strukturierter DNA teilweise aufgespalten und liegt dann als Einzelstrang vor. Im Anschluss daran folgt eine Färbung mit Akridinorange. Dieser fluoreszierende Farbstoff lagert sich an die DNA an und emittiert, bei Anlagerung an DNA-Einzelstränge rotes Licht und bei Doppelsträngen grünes Licht (EVENSON et al. 1991). Die Fluoreszenzanalyse erfolgt flowzytometrisch in einem genauen Zeitfenster um eine vergleichbare Denaturierung und Anfärbung zu gewährleisten. Als Maß der DNA-Integrität dient der DNA-Fragmentationsindex (DFI) (EVENSON et al. 2002). Dieser Wert berechnet sich als Quotient aus der Rotfluoreszenz und der Gesamtfluoreszenz (Rot- + Grünfluoreszenz). Er bezeichnet also den Anteil an DNA-Einzelsträngen an der Gesamt-DNA und ist somit ein Maß für die DNA-Integrität der Spermien.



## 3 Material & Methoden

### 3.1 Ejakulatgewinnung

Die Ejakulatentnahme der für den entsprechenden Versuchsabschnitt verwendeten Landbeschäler des Niedersächsischen Landgestüts in Celle erfolgte zwei- bis dreimal pro Woche, morgens zwischen 6:30 Uhr und 8:00 Uhr im Rahmen des routinemäßigen Betriebes an der Hengstprüfungsanstalt in Adelheidsdorf und am Niedersächsischen Landgestüt in Celle. Für die Versuche wurden insgesamt 6 verschiedene Hengste im Alter zwischen 5 und 15 Jahren, mit bekannter Fertilität verwendet.

Die Entnahme erfolgte an einem Phantom (Modell „Celle“, Klug 1993) mittels einer künstlichen Scheide (Modell „Hannover“, Klug 1993) nach Stimulation an einer, in der Deckhalle anwesenden rossigen Stute. Die künstliche Scheide wurde innen mit Einmalschlauchfolie (Fa. Minitüb, Tiefenbach) ausgekleidet. Als Auffanggefäße dienten sterile, skalierte Glasflaschen, welche mit einem Gazefilter (Fa. Minitüb, Tiefenbach) zur Abtrennung der Schleimfraktion und grober Verunreinigungen, versehen waren.

### 3.2 Untersuchung des Nativspermas

Die Ejakulate wurden unmittelbar nach Entnahme routinemäßig auf Volumen (ml), Dichte (Spermien/ml), Konsistenz (wässrig, molkig, milchig, rahmig), Farbe (grau, weiß, gelb) und progressive Motilität (%) untersucht. Zur Dichtebestimmung diente ein Photometer (SpermaCue<sup>®</sup>, Fa. Minitüb, Tiefenbach). Die Bestimmung der Motilität des Nativspermas erfolgte durch Schätzung an einem Phasenkontrastmikroskop (BX 60, Fa. Olympus, Hamburg) mit einem auf +38°C vorgewärmten Objektisch (HAT 400, Fa. Minitüb, Tiefenbach).

Voraussetzung für die weitere Verwendung im Rahmen der Versuche war die Erfüllung der Mindestanforderungen an Ejakulate nach den Richtlinien des Instituts für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule in Hannover (s. Tabelle 1) bezüglich der Konsistenz und progressiver Motilität.

Tabelle 1: **Mindestanforderungen an Hengstsperma** (modifiziert nach den Richtlinien des Instituts für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover)

Konsistenz	Volumen [ml]	Dichte [Mio./mm <sup>3</sup> ]	Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien [%]
molkeähnlich	40	0,03	50

### 3.3 Beurteilungsmethoden

#### 3.3.1 Mikroskopische Untersuchung

##### 3.3.1.1 Motilität

Bei der Bestimmung der Spermienmotilität wurde lediglich der Anteil progressiv motiler Spermien erfasst. Die Bestimmung erfolgte in allen Versuchsteilen unmittelbar nach der Ejakulatgewinnung. Im ersten Versuchsteil erfolgte eine zusätzliche Motilitätsbestimmung direkt nach Ablauf der Inkubation der Sortierproben (s. Abbildung 4, Zp.2). Die nicht zu sortierenden Kontrollen zur Tiefgefrierung, sowie die Halteproben wurden zeitgleich untersucht. Weitere Motilitätskontrollen erfolgten direkt nach dem Auftauen der sortierten und unsortierten Tiefgefrierproben und nach 10 minütiger Inkubation bei 38°C. Dazu wurden die aufgetauten Spermien suspensionen in vorgewärmte 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf, Hamburg) gefüllt und in einem auf 38°C beheizten Aluminiumblock gelagert. Die unsortierten Kontrollen wurden zusätzlich jeweils im Abstand von einer halben Stunde bis zu drei Stunden nach Auftauen kontrolliert. Durch die rasche Abnahme der Motilität der sortierten Proben erfolgte die Motilitätsbestimmung in diesem Versuchsteil jedoch lediglich bis 10 Minuten nach dem Auftauen. Alle Motilitäten der aufgetauten Proben wurden blind bewertet, d.h. die Zuordnung zu einer spezifischen Gruppe erfolgte erst nach der Beurteilung. Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, dass spezielle Gruppen unbewusst, aufgrund von zu erwartenden Tendenzen, besser bzw. schlechter bewertet wurden.

Im zweiten Versuchsteil erfolgte zusätzlich zur Motilitätsbestimmung direkt nach Ejakulation eine weitere nach dem Sortiervorgang, im Anschluss an die Zentrifugation (s. Abbildung 6, Zp.2). Zeitgleich wurde auch die Halteprobe untersucht. Nach dem Auftauen wurden auch in diesem Versuchsteil die Proben in vorgewärmte 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Fa. Eppendorf,

Hamburg) gefüllt und in einem auf 38°C beheizten Aluminiumblock gelagert. Die Motilitätsbestimmung erfolgte direkt nach dem Auftauen, sowie 10 Minuten später und jeweils im Abstand von einer halben Stunde bis zu drei Stunden nach Auftauen.

Im dritten Versuchsteil gab es zusätzlich zur initialen Bestimmung der Motilität nur eine weitere im Anschluss an die durchgeführte Dichtegradientenzentrifugation. Zeitgleich wurde auch die Kontrollprobe untersucht.

Im vierten Versuchsteil wurde die Motilität der sortierten Proben nach dem Sortierprozess, jedoch vor der Abkühlung auf +4°C bestimmt. Die Motilitätsbestimmung nach dem Auftauen erfolgte dem zweiten Versuchsteil entsprechend.

Die Bestimmung der Motilität erfolgte durchgehend durch die gleiche Person an einem Phasenkontrastmikroskop (BX 60, Fa. Olympus, Hamburg) als subjektive Schätzung drei unterschiedlicher Gesichtsfelder bei 200x Vergrößerung.

### 3.3.1.2 Morphologie

Die morphologische Beurteilung erfolgte nach einer Fixierung im Hancock-Medium (s. Anhang). Dazu wurden die jeweiligen Spermien suspensionen bzw. das Nativsperma im Hancock-Medium auf eine Dichte von ca.  $25 \times 10^6$  Spermien/ml verdünnt. Hiervon wurden jeweils 7µl auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Beurteilung erfolgte am Phasenkontrastmikroskop (BX 60, Fa. Olympus, Hamburg) mit eingelegetem Grünfilter (IF550, Fa. Olympus, Hamburg) bei 1000x Vergrößerung mit Ölimmersion. Je fixierter Probe wurden mindestens 200 Spermien nach folgendem Schema ausgezählt.

Tabelle 2: Auswertungsschema zur Erfassung morphologischer Veränderungen

<b>Veränderungen</b>	<b>Genauere Differenzierung</b>
Kappenveränderungen	Abgelöste Akrosomen/ Akrosomen in Ablösung, deformierte Akrosomen, persistierendes Akrosomgranulum
Kopfveränderungen	deformierte, eingeschnürte, verjüngte, runde, schmale Köpfe, Zwergköpfe, Riesenköpfe, Spaten-, Lanzen-, Kolbenform
Halsveränderungen	Halsbrüche, Plasmotropfen, paraxialer/retroaxialer Schwanzansatz
Verbindungsstückveränderungen	gebrochenes/ fibrilläres/ deformiertes Verbindungsstück, Plasmotropfen
Haupt- & Endstückveränderungen	Schleifenform, aufgerollt, um den Kopf aufgerollt, abgeknickt, rudimentär, Plasmotropfen
Missbildungen	Doppelköpfe, Zwillingschwänze, andere
Normale Spermien	

Die Auflistung der Veränderungen erfolgte hierarchisch, so dass Spermien mit mehreren Veränderungen unter diejenige Kategorie fielen, die von oben nach unten als erste auf sie zutraf. Bei allen Versuchsteilen erfolgte eine morphologische Beurteilung des Nativspermas, welches direkt nach der Ejakulation im Hancock-Medium fixiert wurde. Bei den Versuchsteilen mit Kryokonservierung erfolgte immer auch eine morphologische Beurteilung zum zweiten Untersuchungszeitpunkt (s. jeweiliges Ablaufdiagramm) und der Auftauproben. Im dritten Versuchsteil erfolgte eine zweite morphologische Beurteilung unmittelbar nach der Dichtegradientenzentrifugation.

### 3.3.2 Flowzytometrische Untersuchungen

Die Auswertung der Spermien erfolgte mit Hilfe eines Flowzytometers (FACScan, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg). Das Gerät war mit einem luftgekühlten Argon-Ionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Leistung von 15 mW ausgestattet. Für die Messung



standen folgende Filter zur Auswahl: FL-1 (530/30 nm), FL-2 (585/42 nm) und FL-3 (650LP nm). Für die Datenanalyse war ein Power Mac G4-Computer (Fa. Apple Computer Inc., Cupertino, CA, USA) an das Flowzytometer angeschlossen. Die Bearbeitung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Software-Programm WinMDI Version 2.8 (Internetdownload @ <http://facs.scripps.edu/software.html>). Lediglich die Auswertung der SCSA™-Daten wurde mit dem Software-Programm DAS Version 4.40 (BEISKER, 1994) vorgenommen.

Die Messungen des Akrosomenstatus, der Plasmamembranintegrität, des Mitochondrienmembranpotentials und der Spermienchromatinstruktur wurde mit Hilfe der bei KRIENKE (2003) beschriebenen, durchflusszytometrischen Verfahren bestimmt. Bei allen Analyseverfahren wurden pro gemessene Probe 10.000 Spermien, bei einer Durchflussrate von 150 bis 300 Spermien pro Sekunde analysiert. Für die Färbungen mit JC-1 und mit SYTO®17/FITC-PNA/PI wurde das Frischsperma bzw. das Tiefgefriersperma durch Verdünnung mit Tyrode-Medium (s. Anhang 9.4) auf eine Endkonzentration von  $5 \times 10^6$  Spermien/ml verdünnt und nach Anfärbung für 15 Minuten im abgedunkelten Inkubator (TS Autoflow CO2 Incubator, Fa. NuAire™, Plymouth, MN, USA) bei 37°C inkubiert.

### 3.3.2.1 Bestimmung des akrosomalen Status & der Plasmamembranintegrität

Zur Bestimmung des akrosomalen Status und der Plasmamembranintegrität der Spermien wurden die verschiedenen Spermien suspensionen nach dem bei KRIENKE (2003) beschriebenen Verfahren durchflusszytometrisch analysiert (s. auch Kap.2.3.2.2.1). Zur Bestimmung des akrosomalen Status wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffs FITC-PNA zwischen Spermien mit intaktem Akrosom und Spermien mit Akrosomschäden unterschieden. Durch Verwendung der Fluoreszenzfarbstoffe SYTO®17 und PI wurde zusätzlich zwischen vitalen Spermien mit intakter Plasmamembran und nicht vitalen mit geschädigter Plasmamembran unterschieden.

Zur Anwendung kamen die Farbstoffe SYTO®17 von Molecular Probes (Katalog-Nr.: S-7579, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), FITC-PNA (Katalog-Nr. L-7381, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und Propidiumiodid 95-98% (Katalog-Nr.: P-4170, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen). Für jede Messung wurden 500 µl des mit Tyrode verdünnten Spermas mit 2 µl SYTO®17 (0,5 mM), 3 µl PI (2,99 mM) und 5 µl FITC-PNA

(100µg/ml Aqua dest.) gemischt und 15 Minuten unter Lichtausschluss, bei 37°C inkubiert.

Für die Messungen wurden die Filter FL-1 und FL-3 eingesetzt.

Bei der Auswertung wurden die Spermienköpfe in folgende vier Gruppen (s. Abbildung 2) eingeteilt: membranintakte Spermien mit intaktem Akrosom (orange angefärbte Spermien), membrangeschädigte Spermien mit intaktem Akrosom oder völligem Verlust des Akrosoms (rot angefärbte Spermien), membrangeschädigte Spermien mit geschädigtem Akrosom (rot angefärbte Spermien mit grün angefärbtem Akrosom) und membranintakte Spermien mit geschädigtem Akrosom (orange angefärbte Spermien mit grün angefärbtem Akrosom). Die Trennung zwischen den einzelnen Populationen erfolgte subjektiv.

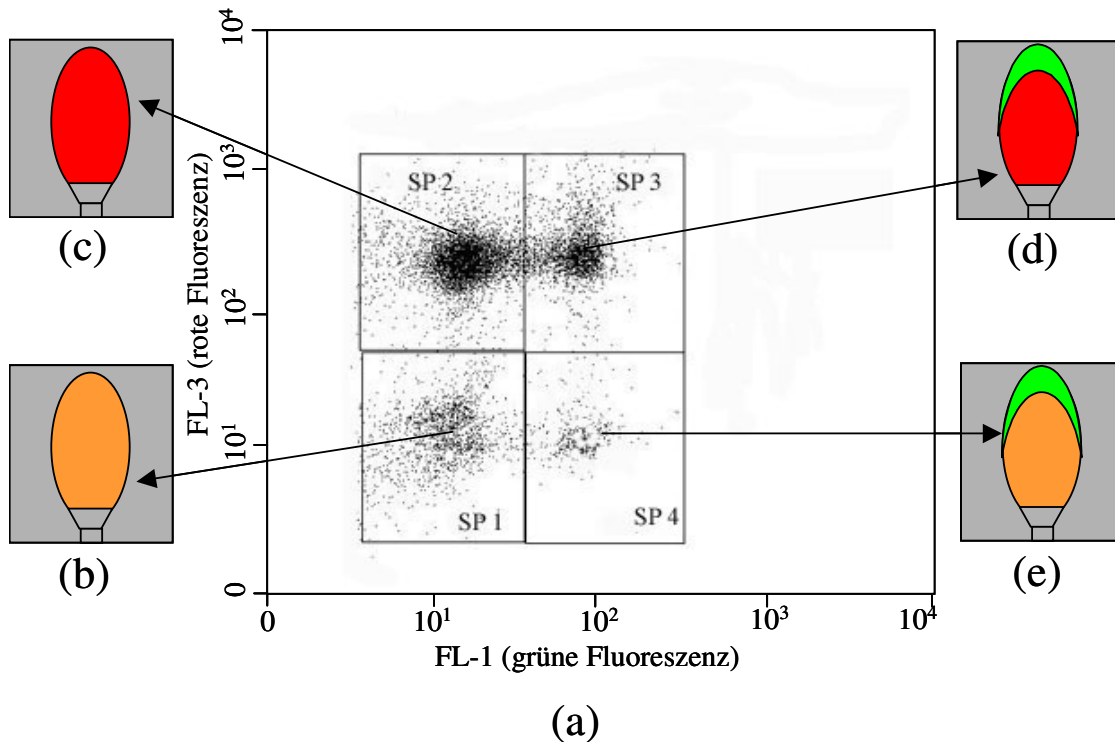


Abbildung 2: Punktwolkendiagramm nach KRIENKE (2003)

„Punktwolkendiagramm (a) der 4 Spermienpopulationen (SP) nach SYTO<sup>®</sup> 17/ FITC-PNA / PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischen Auswertung (Ausdruck des Computerbildes; SP 1 = vitale Spermien mit intaktem Akrosom; SP 2 = membrangeschädigte Spermien mit intaktem Akrosom oder völligem Verlust des Akrosoms; SP 3 = membrangeschädigte Spermien mit geschädigtem Akrosom; S 4 = vitale Spermien mit geschädigtem Akrosom). Schematische Darstellung der vitalen Spermien mit intaktem Akrosom (b), der toten Spermien mit intaktem Akrosom (c), der toten Spermien mit Akrosomenschädigung (d) und der vitalen Spermien mit Akrosomenschädigung (e) nach SYTO<sup>®</sup> 17 / FITC-PNA / PI-Färbung.“ (KRIENKE 2003)

### 3.3.2.2 Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials

Die Bestimmung des Mitochondrienmembranpotentials (MMP) erfolgte nach dem bei KRIENKE (2003) beschriebenen Verfahren. Verwendet wurde der Farbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-Tetraethylbenzimidazolylcarbocyaninjodid (JC-1) von Molecular Probes (Katalog-Nr.: T-3168, Fa. MoBitec GmbH, Göttingen). Zu 500 µl des vorverdünnten Spermas wurden jeweils 10 µl JC-1 (0,153mM) zugesetzt und 15 Minuten unter Lichtausschluss bei 37 C inkubiert. Für die Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-2 für die orange Fluoreszenz eingesetzt. Bei der Auswertung wurde der prozentuale Anteil der Spermien mit erhöhter Orangefluoreszenz, d.h. mit hohem MMP bestimmt (s. Abbildung 3: Punktwolkendiagramm nach KRIENKE (2003)). Die Trennung zwischen den Spermienpopulation erfolgte hier ebenfalls subjektiv.

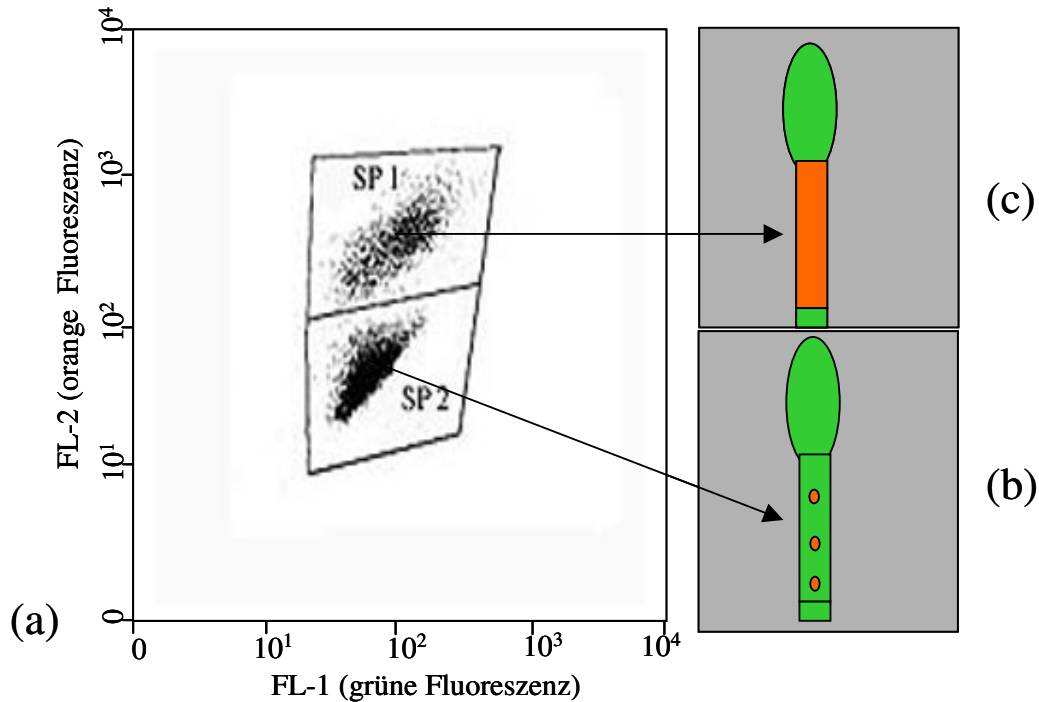


Abbildung 3: Punktwolkendiagramm nach KRIENKE (2003)

„Punktwolkendiagramm (a) der beiden Spermienpopulationen (SP) nach JC-1-Färbung und anschließender durchflusszytometrischen Auswertung (Ausdruck des Computerbildes; SP 1 = Spermien mit hohem MMP; SP 2 = Spermien mit niedrigem MMP). Schematische Darstellung der Spermien mit niedriger Orange fluoreszenz des Mittelstücks, d.h. mit niedrigem MMP (b) und der Spermien mit hoher Orange fluoreszenz des Mittelstücks, d.h. mit hohem MMP (c) nach JC-1-Färbung.“(KRIENKE 2003)

### 3.3.2.3 Bestimmung der DNA-Integrität

Beim Sperm Chromatin Structur Assay (SCSA™) handelt es sich um ein Verfahren zur Beurteilung der Integrität der Spermachromatinstruktur (s. auch Kap.2.3.2.4.1.) Zur SCSA™-Messung wurde, je nach Versuchsanordnung, sowohl in 2ml-Plastikröhrchen (Fa. Eppendorf, Hamburg) schockgefrorenes Frischsperma, als auch in 0,25 ml-Pailletten (Art-Nr. 13407, Fa. Minitüb, Tiefenbach) abgefülltes Tiefgefriersperma verwendet. Beide Probenarten wurden bis zur Messung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Plastikröhrchen wurden für 2 Minuten, die Pailletten für 17 Sekunden in einem 38°C warmen Wasserbad aufgetaut.

Bei der Durchführung des SCSA™-Tests erfolgte die Probenaufbereitung und Messung nach den Angaben von EVENSON und JOST (2000). Die Geräteeinstellungen wurden zu Beginn einer jeden Messreihe neu vorgenommen und nach jeder zehnten Messung anhand einer Referenzprobe überprüft. Für die Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne

Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt. Zur computergestützten Bestimmung der Messdaten wurde die in die Auswertung eingehende Spermienpopulation eingegrenzt. Es wurde der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot + grün) für jedes einzelne Spermium ermittelt und durch ein spezielles Software-Programm (DAS Version 4.40, BEISKER, 1994) als DNA-Fragmentationsindex (DFI) bewertet. Alle DFI-Werte der analysierten Spermien einer Samenprobe wurden in Abhängigkeit ihrer Höhe in einem Verteilungshistogramm dargestellt. Anhand dieses Histogramms wurde der Mittelwert der DFI-Werte und die Standardabweichung (SD), errechnet.

### 3.4 Spermaaufbereitung

#### 3.4.1 Aufbereitung der Kontrollproben

Die zur Kryokonservierung, nicht jedoch zur flowzytometrischen Sortierung vorgesehenen Kontrollproben im ersten Versuchsteil wurden nach der bei KNOP et al.(2005) beschriebenen Methode weiter verarbeitet. Dazu wurde das Ejakulat nach der routinemäßigen Samenuntersuchung (s. Kap. 3.2) in einer Menge von  $3 \times 10^9$  Spermien in 50ml-Plastikzentrifugationsröhrchen mit konischem Boden (Bestell-Nr. 62.559, Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) gegeben und mit KMT-Verdüner (Kenney Modified Tyrode (KENNEY et al. 1975)) auf 46ml aufgefüllt. Je Zentrifugationsröhrchen wurden 4 ml OptiPrep™ (Kat.-Nr. 1114542, Fa. Progen Biotechnik GmbH, 69123 Heidelberg) mittels einer 20ml-Spritze (Fa. Chirana T. Injecta, Slowakische Republik) und einer Plastikmülette (Fa. Minitüb, Tiefenbach) unter die jeweilige Spermiesuspension geschichtet. Die Zentrifugation (Tischzentrifuge Universal 32, Fa. Hettich, Tuttlingen) erfolgte bei 1000xg über 20 Minuten. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand mittels einer Wasserstrahlpumpe (Eigenbau) vorsichtig abgesaugt und anschließend das Kissen mittels einer 20ml-Spritze (Fa. Chirana T. Injecta, Slowakische Republik) und einer Liquorpunktionskanüle (0,9x70mm, Fa. Terumo, Leuven, Belgien) entfernt. Im Anschluss erfolgte eine Dichtebestimmung des erhaltenen spermienreichen Retentats im Hämozytometer (Thoma neu®, Fa. Hecht, Sontheim). Jenes Retentat wurde dann mit modifiziertem Magermilchverdünner (INRA82, (IJAZ u. DUCHARME 1995)), dem 2% klarifizierter Eidotter zugesetzt waren, auf  $300 \times 10^6$  Spermien/ml verdünnt. Ab dem Zeitpunkt, an dem für die zu sortierenden Proben die

Inkubation begann, wurden die Kontrollproben unter Temperaturkontrolle bei +15°C in einer Styroporbox gelagert (s.Ablaufdiagramme) und in der Form vom Labor des Landgestüts in Celle bzw. der Hengstprüfungsanstalt in Adelheidsdorf zum Labor des Instituts für Tierzucht in Mariensee transportiert. Mit Beginn der Abkühlphase der sortierten Proben, wurden auch die Kontrollproben im Wassermantel bei +5°C gelagert. Dazu wurde das verwendete Wasser ebenfalls auf +15°C eingestellt um plötzliche Temperaturschwankungen zu vermeiden. Direkt vor der Kryokonservierung erfolgte eine weitere Verdünnung auf  $200 \times 10^6$  Spermien/ml mit auf +5°C gekühltem, modifiziertem Magermilchverdünner (INRA82, (IJAZ u. DUCHARME 1995)), dem 2% klarifizierter Eidotter und 7,5% Glycerin zugesetzt waren. Durch die Glycerinkonzentration von 7,5% ergab sich eine Endkonzentration von 2,5% in der Probe. Die so erstellten Proben wurden in einem Kühlraum bei +5°C mittels eines Abfüllautomaten (Fa. IMV, L'Aigle, Frankreich) in auf +5°C gekühlte 0,25ml-Pailetten (Art-Nr. 13407, Fa. Minitüb, Tiefenbach) abgefüllt und per Ultraschall verschlossen. Direkt im Anschluss erfolgte die Kryokonservierung (s. Kap. 3.6) im Tiefgefrierautomaten (Minidigitcool<sup>®</sup>, Fa. IMV, L'Aigle, Frankreich).

### 3.4.2 Aufbereitung der zu sortierenden Proben

Die zur flowzytometrischen Sortierung vorgesehenen Proben wurden anfangs in der gleichen Art und Weise wie die Kontrollproben aufbereitet und zentrifugiert (s.Kap. 3.4.1). Nach der Zentrifugation wurde das spermienreiche Retentat jedoch mit KMT-Verdünner (Kenney Modified Tyrode (KENNEY et al. 1975)) resuspendiert. Die Spermiesuspension wurde auf eine Dichte von  $111 \times 10^6$  Spermien/ml eingestellt und anschließend auf Aliquots von 1,8ml in 2ml-Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (Bisbenzimid, Kat-Nr. B-2261, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurde eine Reihe verschiedener Verdünnungskonzentrationen nach dem in Tabelle 3 ersichtlichem Schema angelegt und mit KMT auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt. Dies war erforderlich, um trotz Schwankungen zwischen verschiedenen Ejakulaten bzw. verschiedenen Hengsten eine am jeweiligen Sortiertag geeignete Anfärbung der Spermien für den Sortierprozess zu erhalten.

Tabelle 3: Anlegen einer Reihe von Konzentrationen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342

Spermiensuspension [ml]	Hoechst 33342 (5mg/ml) [µl]	KMT [µl]
1,8	5	195
1,8	10	190
1,8	15	185
1,8	20	180
1,8	25	175
1,8	30	170

Jeder Ansatz wurde mindestens in zweifacher Ausführung angelegt. Die gefärbten Proben wurden anschließend in einem Inkubationsgefäß (Embryonentransportgefäß + Steuergerät HF 50, Fa. Minitüb, Tiefenbach) gelagert und während des Transportes vom Labor des Landgestüts in Celle bzw. der Hengstprüfungsanstalt in Adelheidsdorf zum Labor des Instituts für Tierzucht in Mariensee für 90 min. bei 34°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde jeweils eine Probe jeder Farbstoffkonzentration durch einen Filter der Porenweite von 20 µm (BD Falcon™, Becton Dickinson Labware, MA, USA) filtriert und mit 667µl KMT auf eine Endkonzentration von 75 Mio. Spermien/ml gebracht. Kurz vor dem Sortiervorgang wurden dem Probenröhrchen 2µl des Lebensmittelfarbstoffes FD&C#40 (Fa. Warner Jenkinson Company Inc., St. Louis, MO, USA) aus einer Stocklösung mit 25mg/ml hinzugegeben. Hierdurch wird das Fluoreszenzsignal bei membranveränderten Spermien reduziert und entsprechende Spermien vom Sortierprozess ausgeschlossen. Die benötigte Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33342 in den zu sortierenden Proben schwankte zwischen den Hengsten und bei den einzelnen Hengsten zwischen den einzelnen Versuchstagen, lag aber im Regelfall zwischen 20µl und 30µl. Um ausreichend Probenmaterial zur flowzytometrischen Sortierung bereitzustellen, wurden, sobald die für den jeweiligen Hengst üblichen Konzentrationen absehbar waren, mehrfache Ansätze der entsprechenden Konzentration angelegt und wie oben beschrieben inkubiert.

Die flowzytometrische Sortierung (s. Kap. 3.5) erfolgte nach der Beltsville Sperm Sexing Technology (JOHNSON et al. 1999). Die Auffanggefäße wurden mit 0,5 ml Equi Pro® Liquid Culture (Fa. Minitüb, Tiefenbach) als Auffangmedium befüllt. Im zweiten Versuchsteil wurde

zusätzlich noch ein weiteres Auffangmedium verwendet (s. Kap. 3.7.2). Um den Verlust an sortierten Spermien nach der Sortierung möglichst gering zu halten, musste es sich bei dem verwendeten Auffangmedium um ein möglichst klares Verdünnermedium handeln, damit nach der Zentrifugation eine klare Abgrenzung zwischen Pellet und Überstand gewährleistet werden konnte.

Zur Konzentrierung und Abtrennung des Trägermediums erfolgte direkt nach dem Sortiervorgang eine Zentrifugation bei ca. 700\*g für 15 Minuten. Der Überstand wurde entfernt und das verbliebene Pellet von ca. 30µl mit 77µl modifiziertem Magermilchverdünner (INRA82 (IJAZ u. DUCHARME 1995)), dem 2% klarifizierter Eidotter zugesetzt waren, resuspendiert. Die sortierten Spermienproben enthielten nach jeder Sortiereinheit jeweils 8 Mio. Spermien (nach Resuspension).

Zur Kühlung wurden die Auffanggefäße mit der Spermiesuspension unmittelbar nach Resuspension in 100ml-Plastikflaschen gestellt, die mit 95ml ca. 21°C (Raumtemperatur) warmem Leitungswasser befüllt waren. In diesem Wassermantel wurden sie anschließend in einen Kühlraum mit einer Temperatur von +5°C verbracht. Der Wassermantel diente dabei sowohl der Vermeidung von Temperaturschwankungen innerhalb der Spermiesuspension als auch der gleichmäßigen Abkühlung derselben. Zusätzlich waren die Plastikflaschen mit Alufolie umwickelt um die Proben vor Lichteinwirkung zu schützen.

Die Verweildauer der Proben im Kühlraum bei +5°C betrug mindestens 2,5 Stunden, war aber zudem davon abhängig, zu welchem Zeitpunkt die Proben sortiert worden waren. Das bedeutet, dass die Proben, die am jeweiligen Versuchstag zuletzt sortiert wurden, genau 2,5 Stunden im Kühlraum gelagert wurden, die zuvor sortierten Proben jedoch bereits entsprechende Zeit länger dort lagerten. Nachdem die zuletzt sortierten Proben 2,5 Stunden im Kühlraum gelagert waren, wurden die Gefäße ihrem Wassermantel entnommen und jedem Gefäß 53 µl modifizierter Magermilchverdünner (INRA82 (IJAZ u. DUCHARME 1995)), dem 2% klarifizierter Eidotter und 7,5 % Glycerin zugesetzt waren zugefügt. So entstand eine Spermienendkonzentration von 50 Mio. Spermien / ml und eine Glycerinendkonzentration von 2,5%.

Das Abfüllen erfolgte manuell in gekennzeichneten 0,25ml-Pailletten (Art-Nr. 13407, Fa. Minitüb, Tiefenbach). Dabei wurde zuerst eine vorbereitete und gekühlte Menge von ca. 50µl des mit 2,5% Glycerin angesetzten Verdünners ohne Spermien in die Paillette aufgezogen.



Auf diese Weise wurde ein Spermienverlust durch Aufsaugen in den Verschlussstopfen am Ende der Paillette verhindert. Anschließend folgten das Abfüllen der Spermisuspension und das Verschließen durch Ultraschall mit Hilfe eines Abfüllautomaten (Fa. IMV, L'Aigle, Frankreich). Um Temperatursprünge zu vermeiden, fanden diese Vorgänge im Kühlraum bei einer Temperatur von +5°C statt. Direkt im Anschluss erfolgte die Kryokonservierung (s. Kap 3.6) im Tiefgefrierautomaten (Minidigitcool<sup>®</sup>, Fa. IMV, L'Aigle, Frankreich).

### 3.4.3 Aufbereitung der Halteproben

Im ersten und zweiten Versuchsteil wurde parallel immer eine Halteprobe angelegt. Bei dieser handelte es sich um unzentrifugiertes Sperma, welches mit modifiziertem Magermilchverdünner (INRA82 (IJAZ u. DUCHARME 1995)) auf eine Dichte von  $50 \times 10^6$  Spermien / ml eingestellt und bei +15°C gelagert wurde.

Im dritten Versuchsteil wurde die Halteprobe in der gleichen Art und Weise (Verdünnung 1:1 mit KMT) wie das zentrifugierte Sperma aufbereitet und bei +15°C gelagert, jedoch nicht zentrifugiert.

### 3.4.4 Aufbereitung der Proben zur PureSperm<sup>®</sup>- Dichtegradientenzentrifugation

Die Proben die zur PureSperm<sup>®</sup> (Kat-Nr. PS100, Fa. Nidacon, Göteborg, Schweden)-Dichtegradientenzentrifugation vorgesehen waren, wurden nach der routinemäßigen Samenuntersuchung (s.Kap. 3.2) im Verhältnis 1:1 mit KMT-Verdünner (Kenney Modified Tyrode (KENNEY et al. 1975)) verdünnt und für die Fahrt vom Landgestüt in Celle zum Institut für Tierzucht in Mariensee bei +15°C gelagert. Im Labor wurden dann jeweils 2 ml des 1:1 verdünnten Spermas mittels einer 5ml-Spritze (Fa. Chirana T. Injecta, Slowakische Republik) auf den vorbereiteten, diskontinuierlichen PureSperm<sup>®</sup>-Gradienten gegeben (s. Kap. 3.7.3 & Kap. 3.7.4) und bei 600g über 20 Minuten zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode). Die Gradienten wurden in 50ml-Zentrifugationsröhrchen mit konischem Boden (Bestell-Nr. 62.559, Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) übereinander geschichtet (s.Kap. 3.7.3). Sollte im Anschluss eine Sortierung der entsprechenden Spermien erfolgen (4. Versuchsteil), so wurden pro Hengst vier Röhrchen zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden 900 µl der spermienreichen Fraktion im Konus des Gefäßes mit einer 1000µl-Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg) abgesaugt und in einem

separaten 50ml-Zentrifugationsröhrchen gesammelt. Anschließend erfolgte eine Dichtebestimmung des erhaltenen spermienreichen Retentats im Hämozytometer (Thoma neu<sup>®</sup>, Fa. Hecht, Sontheim). Sollten die Spermien sortiert werden, so wurde die Spermiesuspension mit KMT auf eine Dichte von  $111 \times 10^6$  Spermien / ml verdünnt. Die anschließende Inkubation und die weitere Verarbeitung erfolgte den herkömmlich sortierten Spermien (s. Kap. 3.4.2) entsprechend.

### 3.5 Durchflusszytometrische Sortierung

Die flowzytometrische Sortierung der fluoreszenzgefärbten Spermien erfolgte nach der „Beltsville Sperm Sexing Technology“ nach JOHNSON et al. (1999) mit einem „High Speed Cell Sorter“ (Moflo<sup>®</sup> DakoCytomation, Fort Collins, CO, USA), welcher mit einem 5W Argon UV-Laser bei 200mW betrieben wurde. Der Anregungswellenbereich lag zwischen 351-364 nm. Als Hüllstrom diente Stallion Sheath Fluid (s. Anhang) mit einem pH-Wert von 7,2. Es wurde bei einem Arbeitsdruck von 3,6 bar sortiert. Während der Durchführung der Versuche konnte eine durchschnittliche Sortiertrate von 3500-4500 Zellen pro Sekunde erzielt werden. Als Auffanggefäße dienten 10ml-Zentrifugationsröhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht), die mit 0,5 ml Auffangmedium gefüllt waren. Den Auffangmedien waren je 10% Eidotter zugesetzt. Als Auffangmedium wurde ein spezieller Verdünner für Hengstspermien verwendet (Equi Pro<sup>®</sup> Liquid Culture, Fa. Minitüb, Tiefenbach). Im zweiten Versuchsteil kam außerdem INRA82 ohne Magermilchanteil zum Einsatz. Eine Reanalyse für die Proben der Tiefgefrierversuche wurde nicht durchgeführt, da im Gegensatz zum reinen Sortiervorgang die Sortiergenauigkeit im Rahmen dieser Versuchsreihen nicht von Bedeutung war.

### 3.6 Tiefgefrierung

Zur Kryokonservierung wurde ein Tiefgefrierautomat (Minidigitcool<sup>®</sup>, Fa. IMV, L'Aigle, Frankreich) verwendet. Dieser Automat diente zum Tiefgefrieren des in Pailletten konfektionierten Spermas. Das Kühlgut wurde dabei nach der von KLUG und SIEME (2003) beschriebenen Methode mit einer Einfriereschwindigkeit von  $60^{\circ}\text{C}/\text{min}$  von  $+5^{\circ}\text{C}$  auf  $-155^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, ca. 15 Minuten bei  $-155^{\circ}\text{C}$  gehalten. Anschließend wurden die Proben bis zur Auswertung in entsprechenden Lagerungscontainer in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$

gelagert. Im zweiten Versuchsabschnitt wurde zusätzlich noch ein weiteres Tiefgefrierprogramm verwendet (s. Kap. 3.7.2).

Das Auftauen aller Pailletten erfolgte im Wasserbad bei 37°C für mindestens 17 Sekunden. Die Pailletten wurden trocken gewischt und jeweils in ein leeres, im Aluminiumblock bei 37°C vorgewärmtes Reaktionsgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg) entleert.

## 3.7 Versuche

### 3.7.1 1. Versuchsteil: Vergleich eines herkömmlichen Tiefgefrierverdünners und eines Tiefgefrierverdünners mit Zusatz von Antioxidantien (AO) auf sortiertes und kryokonserviertes Hengstsperma

Nachdem KLINC (2005) positive Effekte von Antioxidantien auf Morphologie und Motilität von sortiertem Bullenspermien feststellen konnte, sollte dieser Versuch zeigen, ob eine Anwendung der gleichen Antioxidantien zu ähnlichen Effekten bei kryokonservierten, sortierten Hengstspermien führt. Die Aufbereitung der Proben bis zur Kryokonservierung (s. Ablaufdiagramm) unterschied sich zwischen den sortierten Gruppen lediglich durch den Zusatz von Antioxidantien (+/-AO) in den einzelnen Verdünnermedien. Die eingesetzten Substanzen und Konzentrationen wurden von KLINC (2005) übernommen. Dabei handelte es sich um Katalase, Na-Pyruvat und BSA. Die genannten Substanzen wurden dem Zentrifugationsverdünner (KMT), dem Inkubationsverdünner (KMT) und dem TG-Verdünner (INRA82) zugegeben (s. Abbildung 4: Ablaufdiagramm, Versuchsteil I). Auch der Trägerflüssigkeit wurden die Antioxidantien, nicht jedoch BSA zugegeben. Die Medien wurden dabei mit 15 IE/ml Katalase (Kat-Nr. C-1345, , Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 1 mM Natriumpyruvat ((Best-Nr. A-4859, Fa. AppliChem, Darmstadt) und 3 mg/ml BSA Fraktion V (Kat-Nr. A-9647, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen ) angereichert. Da der KMT-Verdünner bereits Natriumpyruvat enthält, wurde hier nur die entsprechende Differenzmenge zugegeben.

Pro Versuchstag wurde das Ejakulat eines Hengstes, entweder mit oder ohne Zusatz von Antioxidantien sortiert und eingefroren. Ejakulate jeden Hengstes wurden an mindestens 6 Versuchstagen (3 x mit AO und 3 x ohne AO) sortiert. Zusätzlich wurden von jedem Ejakulat, eine Halteprobe (s. Kap. 3.4.3) und nicht sortierte Kontrollproben (s. Kap. 3.4.1) als Split-

Sample jeweils mit und ohne Zusatz von Antioxidantien zur Kryokonservierung aufbereitet (s. Abbildung 4: Ablaufdiagramm, Versuchsteil I). Das sortierte Sperma konnte aus verfahrenstechnischen und zeitlichen Gründen nicht im Split-Sample-Verfahren untersucht werden, da pro Untersuchungstag nur entweder Sperma mit oder ohne Antioxidantien gesortet werden konnte. Da sich die Versuchsdauer über mehrere Monate erstreckte, kam es mitunter vor, dass Hengste verletzungsbedingt, durch Turniereinsätze oder durch Verlegung auf eine andere Deckstation, mitten im Versuchszeitraum aus den Versuchen ausschieden. Die Daten wurden in dem Fall nicht für die einzelnen Hengste ausgewertet, jedoch in die Gesamtwertung mit einbezogen, wenn von dem betreffenden Hengst Proben für alle Versuchsgruppen vorlagen.

Unmittelbar nach der Gewinnung wurde im Rahmen der routinemäßigen Samenuntersuchung die progressive Motilität (s. Kap. 3.3.1.1) der Spermien im Ejakulat bestimmt und eine Hancockfixierung (Hancock-Lösung s. Anhang) zur späteren morphologischen Auswertung (s. Kap. 3.3.1.2) erstellt. Darauf folgend wurde das Ejakulat in vier Teilproben aufgeteilt. Dabei handelte es sich um eine Halteprobe (s. Kap. 3.4.3), eine Probe, die mit (+AO) und eine Probe, die ohne (-AO) Antioxidantien im KMT- und Tiefgefriererdünnungsaufbereiter aufbereitet und kryokonserviert wurde (s. Kap. 3.4.1), sowie die zur flowzytometrischen Sortierung bestimmte Probe (s. Kap. 3.4.2). Dabei war es vom jeweiligen Versuchstag abhängig, ob diese mit (+AO) oder ohne (-AO) Antioxidantien in den Verdünnungsmedien weiter aufbereitet wurde (s. Abbildung 4). Die Untersuchungen auf Motilität & Morphologie erfolgten am ersten, zweiten und dritten Untersuchungszeitpunkt (s. Abbildung 4). Die flowzytometrischen Untersuchungen (FITC-PNA/PI/SYTO<sup>®</sup>17, JC-1, SCSA<sup>™</sup>) hingegen erfolgten aus zeitlichen und logistischen Gründen nur am zweiten und dritten Untersuchungszeitpunkt.

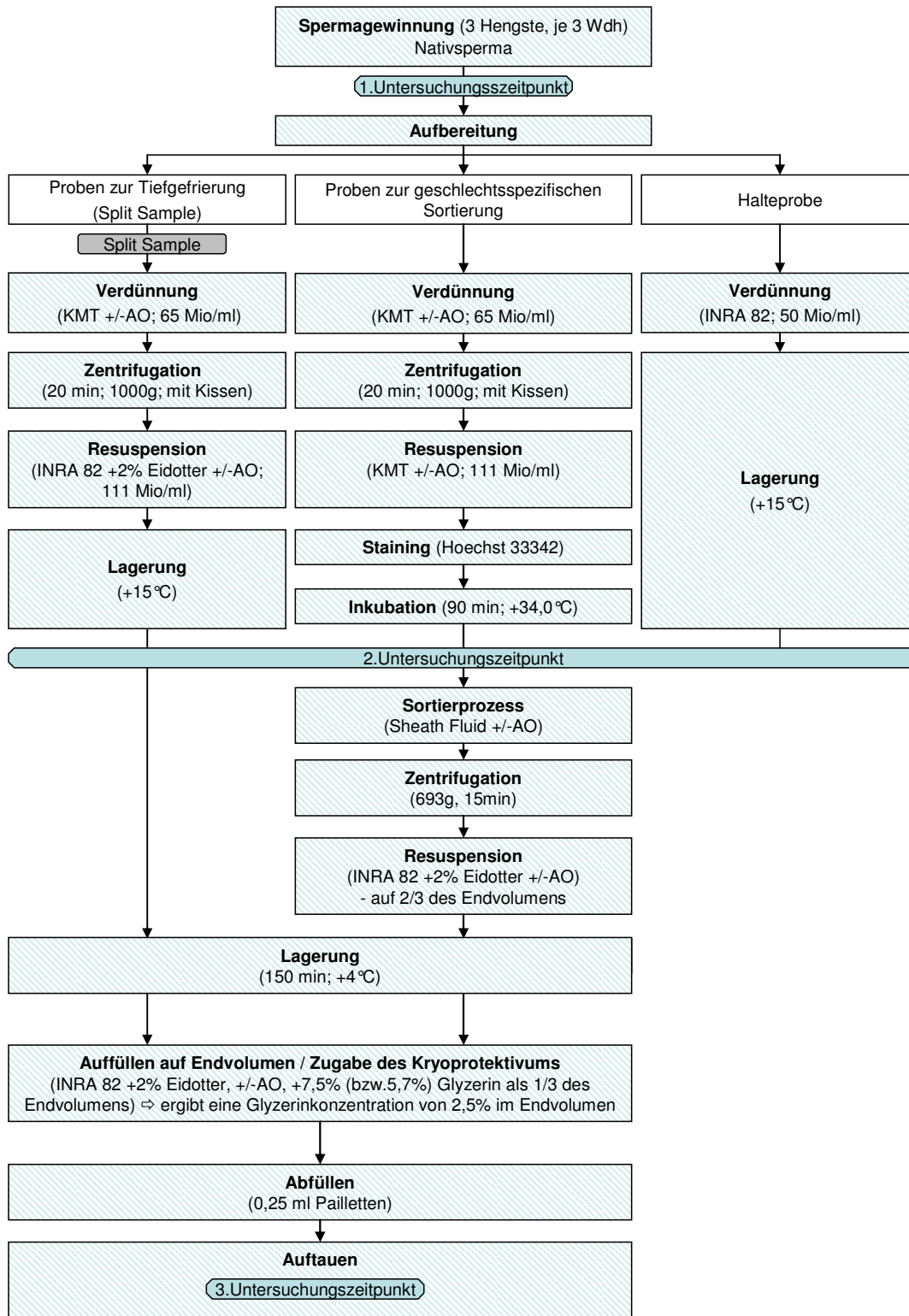


Abbildung 4: Ablaufdiagramm, Versuchsteil I

### 3.7.2 2. Versuchsteil: Vergleich zweier Auffangmedien und zweier Temperaturverlaufskurven bei der Tiefgefrierung von sortiertem Hengstsperma

Im zweiten Versuchsteil wurden zwei verschiedene Auffangmedien, sowie zwei verschiedene Temperaturverläufe zur Kryokonservierung miteinander verglichen. Es kamen zwei Hengste, mit je mindestens 6 Wiederholungen für jede der Versuchsgruppen, zum Einsatz. Bei den verwendeten Auffangmedien handelte es sich zum einen um Equi Pro<sup>®</sup> Liquid Culture (Fa. Minitüb, Tiefenbach), ein kommerziell erhältliches Verdünnermedium speziell für Hengstspermien und zum anderen um INRA 82 (IJAZ u. DUCHARME 1995), jedoch ohne den Magermilchanteil (s. Anhang). Grund für die Verwendung ohne den Magermilchanteil war es, durch die klare Konsistenz des Mediums eine möglichst hohe Rückgewinnung der sortierten Spermien nach der Zentrifugation zu erreichen. Bei einer Menge von etwa  $8 \times 10^6$  Spermien pro Auffanggefäß ist eine Abgrenzung des Pellets in milchigen oder getrübbten Medien schwer und kann bei Entfernung des Überstandes zu deutlichen Verlusten führen. Beide Auffangmedien wurden mit 10% Seminalplasma angereichert. Die zwei verschiedenen Temperaturverläufe bei der Kryokonservierung unterschieden sich lediglich im Temperaturbereich von +5°C bis -6°C. Während Tiefgefrierprogramm 2 nach der von KLUG und SIEME (2003) beschriebenen Methode mit einer Geschwindigkeit von 60°C/min bis auf minus 155°C kühlte, wurde im Tiefgefrierprogramm 1 mit einem segmentierten Temperaturverlauf eingefroren. In letzterem Programm wurde, unter Berücksichtigung des Kristallisationspunktes, mit einer moderaten Kühlgeschwindigkeit von 6°C/min im Bereich von +5°C bis -6°C begonnen. Sobald -6°C erreicht wurden, kühlte das Programm 1 mit der gleichen Geschwindigkeit wie Programm 2 (s. Abbildung 5). Demnach wurden zum zweiten Untersuchungszeitpunkt (s. Abbildung 6) drei verschiedene Proben miteinander verglichen. Dabei handelte es sich um die Halteprobe (s. Kap. 3.4.3) und die zwei, in verschiedenen Medien aufgefangenen, sortierten Proben (s. Kap. 3.4.2). Zum dritten Zeitpunkt wurden hingegen vier Proben miteinander verglichen. Sortierte Spermien aus beiden Auffangmedien wurden einmal mit Programm 1 und einmal mit Programm 2 eingefroren.

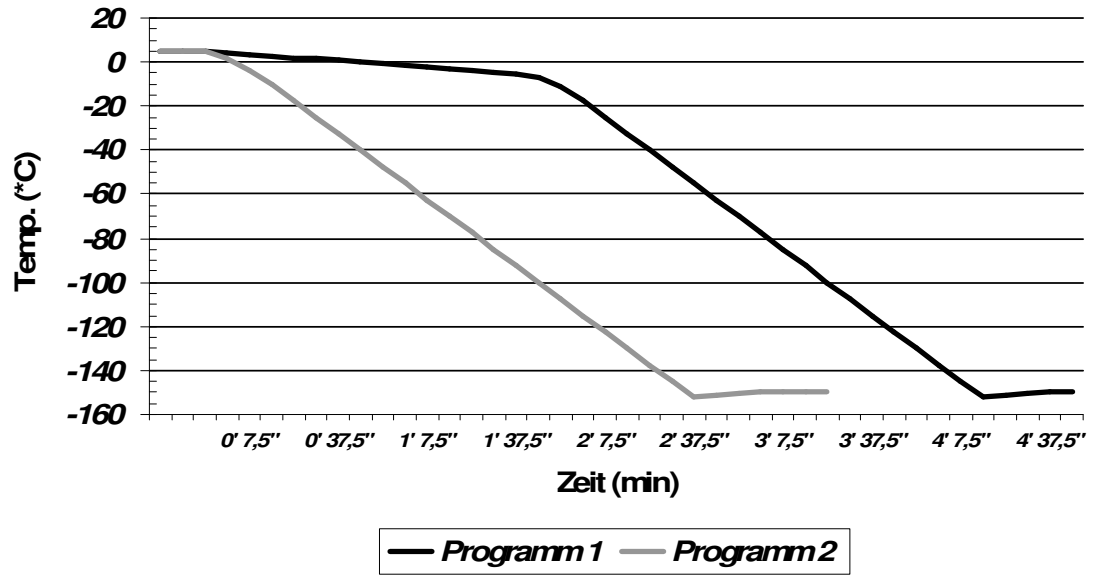


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Temperaturverlaufs der Einfrierprogramme

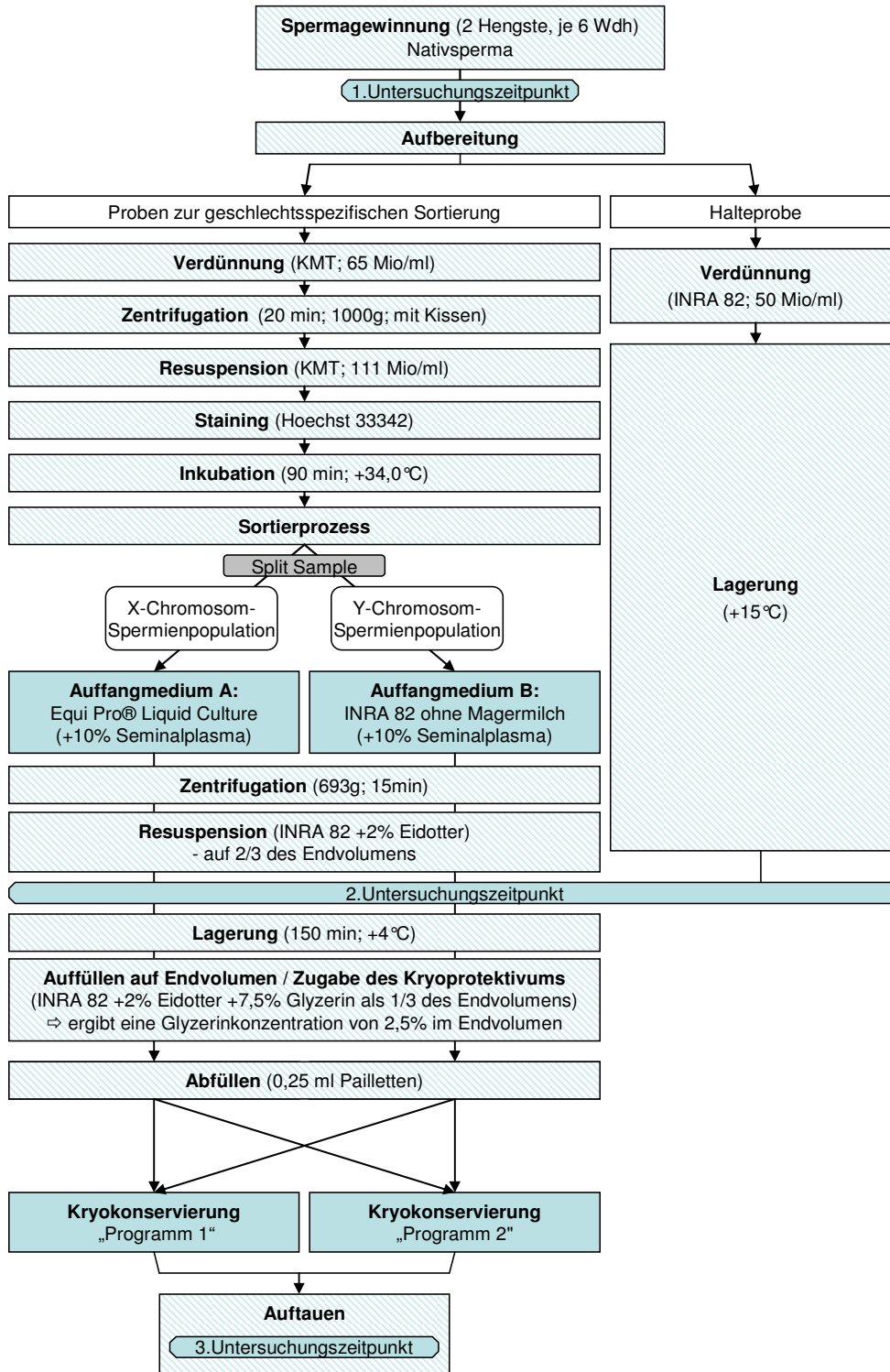


Abbildung 6: Ablaufdiagramm, Versuchsteil II



### 3.7.3 3. Versuchsteil: Untersuchung der qualitativen Selektion von Hengstspermien durch Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) über einem PureSperm<sup>®</sup>-KMT-Gradienten

Dieser Versuchsteil diente der Feststellung, ob durch diese spezielle Art der Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) eine Selektion und Anreicherung der qualitativ höherwertigen Spermienfraktion im Pellet erreicht werden kann. Zur DGZ wurden ein diskontinuierlicher PureSperm<sup>®</sup>-KMT-Dichtegradient mit zweifacher Gradientenschichtung in einem 50ml-Zentrifugationsröhrchen mit konischem Boden (Bestell-Nr. 62.559, Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) übereinandergeschichtet. Zuerst wurde die obere Gradientenschicht in das Gefäß verbracht. Diese bestand zu 45% aus PureSperm<sup>®</sup>-(Kat-Nr. PS100, Fa. Nidacn, Göteborg, Schweden) und zu 55% aus KMT-Verdünnernmedien und hatte ein Volumen von 2,2ml. Mittels 1000µl-Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg) wurde anschließend die untere Gradientenschicht untergeschichtet. Diese bestand zu 90% aus PureSperm<sup>®</sup>- & zu 10% aus KMT-Verdünnernmedien und hatte ein Volumen von 3,5ml. Die Anrichtung dieses diskontinuierlichen Gradienten geschah unmittelbar vor der Zentrifugation, zu der dann 2ml des 1:1 mit KMT verdünnten Spermas (s. Kap. 3.4.4) vorsichtig mittels 5ml Spritze (Fa. Chirana T. Injecta, Slowakische Republik) und Latexschlauch (auf 15 cm Länge gekürzt) auf den oberen Gradienten gegeben wurde. Bei der Aufbereitung war darauf zu achten, dass die Phasentrennung erhalten blieb. Die Zentrifugation (Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode) erfolgte dann über 20min bei 600g. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die untersten 900µl (Pellet bzw. Phase 1) der spermienreichen Fraktion im Konus des Zentrifugationsröhrchens mittels einer 1000µl-Pipette mit erweiterter Pipettenspitzenöffnung abgesaugt und in einem separaten Zentrifugationsröhrchen gesammelt (s. Kap. 3.4.4). Auf die gleiche Art und Weise wurde im Anschluss 1ml der direkt über dem Pellet (Phase 1) liegenden Phase (Phase 2) gewonnen und gesammelt. Zur Bestimmung des Abnahme der Spermienqualität in den höher gelegenen Phasen wurde zusätzlich eine weitere, im Bereich der oberen Gradientenschicht gelegene Phase gesammelt, jedoch war die Auswertung aufgrund zu geringer Spermienkonzentration nur selten möglich, so dass diese statistisch nicht berücksichtigt wurde.

Eine morphologische Untersuchung und eine Bewertung der progressiven Motilität erfolgte zum ersten und zweiten Untersuchungszeitpunkt (s. Abbildung 7: Ablaufdiagramm,

Versuchsteil III). Die flowzytometrischen Untersuchungen (FITC-PNA/ PI/ Syto17 und JC-1) erfolgten zum zweiten Untersuchungszeitpunkt und dienten dem Vergleich zwischen der Halteprobe (s. Abbildung 7) und den einzelnen Phasen, sowie der Phasen untereinander.

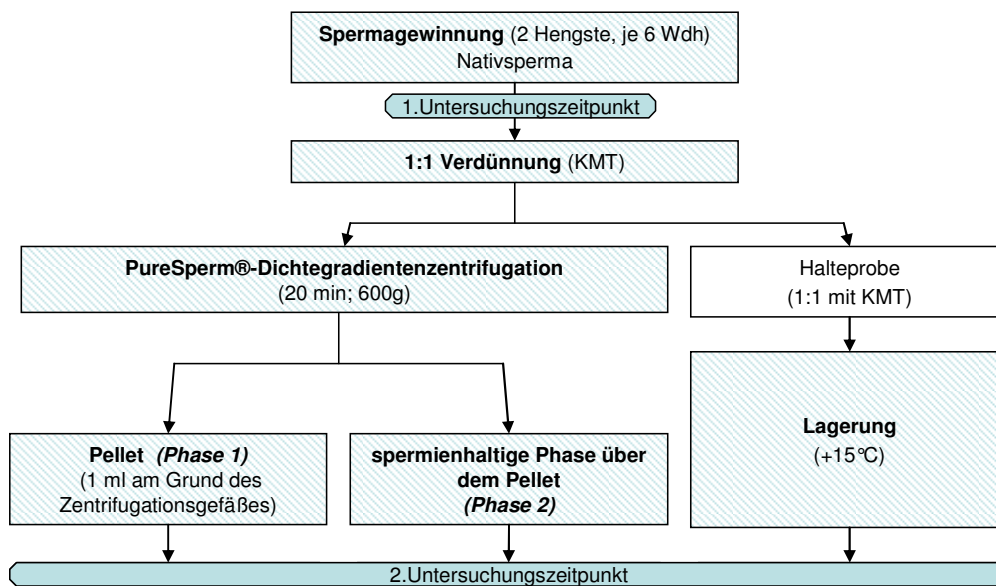


Abbildung 7: Ablaufdiagramm, Versuchsteil III

### 3.7.4 4. Versuchsteil: Vergleich zweier Zentrifugationsmethoden zur Aufbereitung von HengstspERMien zur geschlechtsspezifischen Sortierung mit anschließender Kryokonservierung

Der vierte Versuchsteil basiert auf den positiven Ergebnissen aus dem dritten Teil. Hier sollte geprüft werden, ob sich die gesteigerte Spermienqualität durch die PureSperm®-Dichtegradientenzentrifugation auch in der Qualität des anschließend sortierten und kryokonservierten Spermias widerspiegelt und eine Optimierung des Verfahrens im Vergleich mit der zuvor verwendeten Zentrifugationsmethode mit OptiPrep™-Kissen (s. Kap. 3.4.1 & Kap. 3.4.2) darstellt. Die Aufbereitung der Proben erfolgte entsprechend Kapiteln 3.4.4 und 3.4.2. Jedes Ejakulat wurde im Split-Sample-Verfahren geteilt und nach beiden Verfahren aufbereitet. Da die Proben jedoch nicht gleichzeitig sortiert werden konnten und aus verfahrenstechnischen Gründen die PureSperm®-DGZ erst im Institut für Tierzucht in Mariensee möglich war, wurden die mit Kissen zentrifugierten Proben (OptiPrep™-Proben) bereits am Landgestüt in Celle aufbereitet und fluoreszenzgefärbt (s. Kap. 3.4.2) und während

der Fahrt inkubiert (s.Ablaufdiagramm). Die PureSperm<sup>®</sup>-DGZ erfolgte unmittelbar nach Ankunft in Mariensee.

Es wurden vier Zentrifugationsröhrchen pro Hengst verwendet um eine ausreichende Menge an Spermien zu erhalten. Nach Zentrifugation wurden die Pellets (je 900µl) mit einer 1000µl Pipette abgesaugt und in einem gemeinsamen Zentrifugationsröhrchen gesammelt. Dies ergab pro Hengst ein Volumen von 3,6ml (4 x 900µl). Die Spermienkonzentration in diesen 3,6ml wurde mittels Hämozytometer (Thoma neu<sup>®</sup>, Fa. Hecht, Sontheim) bestimmt und daraufhin mit KMT auf  $111 \times 10^6$  Spermien / ml eingestellt.

Während die OptiPrep<sup>®</sup>-Proben bereits sortiert wurden, erfolgte die Inkubation der PureSperm<sup>®</sup>-Proben. Nach 90 Minuten Inkubation war der Sortierprozess der OptiPrep<sup>®</sup>-Proben i.d.R. abgeschlossen und es konnte unmittelbar mit der Sortierung der PureSperm<sup>®</sup>-Proben begonnen werden. Die Behandlung im Anschluss an den Sortierprozess erfolgte entsprechend Kapiteln 3.4.2 und 3.6. Dabei erfolgte die Kryokonservierung aller Proben gemeinsam 2,5 Stunden nachdem die zuletzt sortierten Proben zur Kühlung auf +5°C in den Kühlraum verbracht worden waren.

Eine morphologische Untersuchung (s. Kapitel 3.3.1.2) und Beurteilung der progressiven Motilität (s. Kapitel 3.3.1.1) erfolgte am Ejakulat direkt nach Gewinnung (s. Abbildung 8: Ablaufdiagramm, Versuchsteil IV), im Anschluss an den Sortierprozess direkt nach Resuspension (s. Abbildung 8, 2.Untersuchungszeitpunkt) und nach dem Auftauen der tiefgefrorenen Proben (s. Abbildung 8, 3.Untersuchungszeitpunkt). Die Motilität wurde nach dem Auftauen zusätzlich im Thermoresistenztest nach 10 Minuten und alle 30 Minuten bis 3 Stunden nach Auftauen bestimmt. Zum dritten Untersuchungszeitpunkt erfolgte zusätzlich eine flowzytometrische Untersuchung (FITC-PNA/ PI/ SYTO<sup>®</sup>17) der Proben.

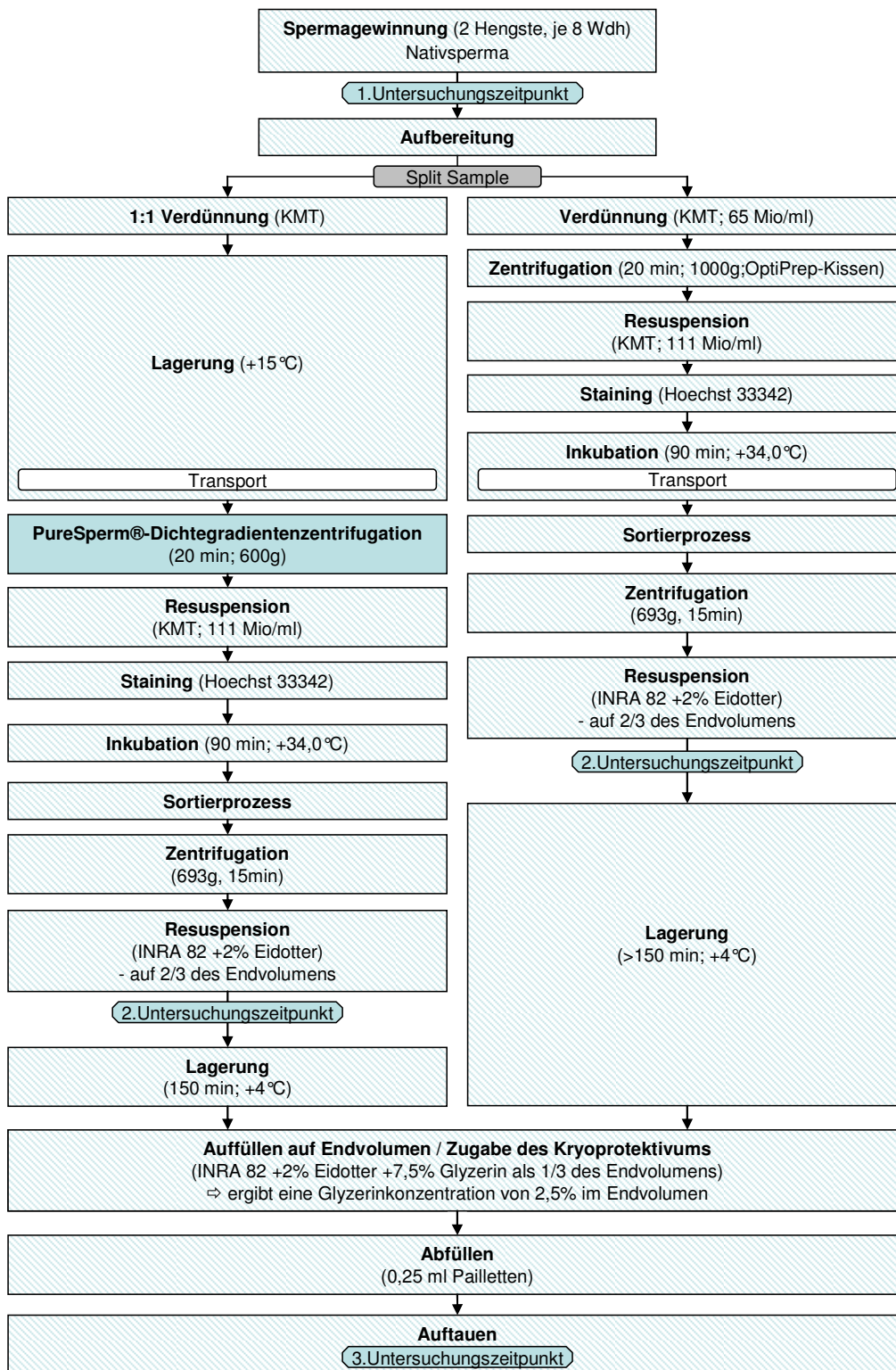


Abbildung 8: Ablaufdiagramm, Versuchsteil IV

### 3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Computerprogramm „Sigma Stat<sup>®</sup> for Windows“ (Version 2.0, Jandel Scientific Cooperation, Erkrath). Für die einfaktorielle Varianzanalyse (One Way ANOVA) wurde das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung (SD) berechnet. Bei der Verwendung der zweifaktoriellen Varianzanalyse (Two Way ANOVA) im zweiten Versuchsteil wurde statt der Standardabweichung der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet. Die Ergebnisse wurden auf Normalverteilung geprüft. Bei vorliegender Normalverteilung erfolgte die Varianzanalyse mittels ANOVA. Bei nicht vorhandener Normalverteilung wurden die Medianwerte ermittelt und die Daten durch ANOVA on Ranks geprüft. Die Einzelwerte wurden, wenn nicht anders erwähnt, per Tukey-Test analysiert. Zur übersichtlicheren Gestaltung des Ergebnisteils wurden jedoch, auch bei nicht vorhandener Normalverteilung, die Mittelwerte angegeben.

Die Hengste wurden zunächst zusammengefasst und als Gruppe untersucht. Anschließend wurde jeder der Hengste einzeln untersucht. Unterschiede zwischen den Gruppen galten ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  als signifikant. Signifikante Unterschiede wurden, je nach P-Wert, in die drei folgenden Klassen eingeordnet:

1.  $0,05 > P > 0,01$
2.  $0,01 > P > 0,001$
3.  $P < 0,001$

Im zweiten Versuchsteil wurden die Ergebnisse der zwei Einfrierprogramme (Programm 1 & Programm 2), sowie der zwei Auffangmedien (INRA & Liquid Culture) zum Zeitpunkt 3 (s. Abbildung 6: Ablaufdiagramm, Versuchsteil II) durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Two Way ANOVA) geprüft. Bei nicht vorhandener Normalverteilung wurden die Daten hier durch einfaktorielle Varianzanalyse mittels Rank Sum Test (Mann-Whitney Rank Sum Test) oder t-Test geprüft. Der Vergleich zwischen den vier einzelnen Gruppen (INRA Progr.1/ INRA Progr. 2/ Liq. Culture Progr.1/ Liq. Culture Progr.2) erfolgte wiederum durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (One Way ANOVA).

Lagen, wie bei den flowzytometrischen Daten im vierten Versuchsteil, lediglich zwei Wertegruppen zum statistischen Vergleich vor, so wurde, bei vorhandener Normalverteilung

der t-Test angewendet. Lag keine Normalverteilung vor, so wurde der Rank Sum Test angewendet.

## 4 Ergebnisse

Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich immer auf die Unterschiede zwischen Werten einer Spalte. Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangswerte im Nativsperma, erfolgte kein Vergleich der Hengste zum jeweiligen Zeitpunkt untereinander.

### 4.1 1.Versuchsteil

#### 4.1.1 Morphologie

##### 4.1.1.1 Morphologisch unveränderte Spermien

Direkt nach der Inkubation (Zp.2) unterscheiden sich die zur Sortierung aufbereiteten Probengruppen in ihrer Morphologie zwar signifikant vom Nativsperma zum Zeitpunkt 1, jedoch läßt sich kein signifikanter Unterschied der inkubierten Probengruppen (Sort+AO & Sort-Kontrolle) untereinander feststellen (s. Tabelle 4).

Auch nach dem Auftauen (Zp.3) zeigen die Probengruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz zum Zeitpunkt 2, ist nun auch zur Ausgangsmorphologie im Nativsperma (s. Nativ, Zp.1) kein signifikanter Unterschied mehr vorhanden (s. Tabelle 6). Die Hengste zeigen, individuell betrachtet, teils eine sehr unterschiedliche Reaktion. Während Hengst 2 und Hengst 3 (s. Tabelle 7) keinerlei Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennen lassen, ist für Hengst 1 (s. Tabelle 7) der Anteil morphologisch unveränderter Spermien der sortierten Gruppe mit Antioxidantien (Sort+AO) signifikant größer als bei beiden unsortierten Gruppen (TGV+AO & TGV-Kontrolle).

Tabelle 4: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach 1,5 Stunden Inkubation (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Gesamtwertung)

	<b>n</b>	<b><math>\bar{x} \pm SD</math></b>
Nativ (Zp.1)	31	78,7 $\pm$ 8,2 <sup>a</sup>
Sort+AO (Zp.2)	18	71,7 $\pm$ 8,6 <sup>b</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.2)	13	70,5 $\pm$ 8,1 <sup>b</sup>

a:b p<0,05

Tabelle 5: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach 1,5 Stunden Inkubation (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Hengste einzeln)

	Hengst 1		Hengst 2		Hengst 3	
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	9	73,4 ± 7,5	9	84,1 ± 7,4 <sup>a</sup>	9	82,2 ± 4,3 <sup>c</sup>
Sort+AO (Zp.2)	6	71,3 ± 7,0	6	71,3 ± 11,1 <sup>b</sup>	4	76,8 ± 6,3
Sort-Kontrolle (Zp.2)	3	69,2 ± 8,4	3	79,2 ± 3,0	5	70,3 ± 5,7 <sup>d</sup>

c:d P<0,01

a:b P<0,05

Tabelle 6: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Gesamtwertung)

	n	$\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	23	78,0 ± 8,5
Sort+AO (Zp.3)	12	83,1 ± 7,5
Sort-Kontrolle (Zp.3)	11	85,1 ± 9,6
TGV+AO (Zp.3)	23	78,3 ± 10,8
TGV-Kontrolle (Zp.3)	23	76,7 ± 11,6

Tabelle 7: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Hengste einzeln)

	Hengst 1		Hengst 2		Hengst 3	
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	7	71,8 ± 6,3	7	83,2 ± 8,3	7	82,4 ± 4,7
Sort+AO (Zp.3)	4	82,3 ± 6,6 <sup>a</sup>	3	83,8 ± 10,4	4	85,5 ± 7,6
Sort-Kontrolle (Zp.3)	3	75,5 ± 10,5	4	91,6 ± 6,3	3	88,7 ± 4,4
TGV+AO (Zp.3)	7	65,8 ± 3,3 <sup>b</sup>	7	86,3 ± 9,3	7	84,5 ± 4,2
TGV-Kontrolle (Zp.3)	7	63,7 ± 7,1 <sup>b</sup>	7	85,4 ± 6,1	7	83,3 ± 6,5

a:b P<0,01



#### 4.1.1.2 NAR-Spermien

Der Anteil an Spermien mit normalem akrosomalen Rand (NAR) ist nach Inkubation (Zp.2), im Vergleich zum Nativsperma signifikant vermindert (s. Tabelle 8). Bei Hengst 3 kann dieser Unterschied nur für die inkubierte Kontrollgruppe (Sort-Kontrolle) festgestellt werden (s. Tabelle 9). Die Gruppe mit Zusatz von Antioxidantien (Sort+AO) entspricht im Anteil der NAR-Spermien in etwa dem Nativsperma und zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant höheren Anteil an NAR-Spermien (s. Tabelle 9). Während sich Hengst 1, wie in der Gesamtwertung, mit beiden inkubierten Proben signifikant vom Nativsperma unterscheidet, ist hingegen für Hengst 2 kein signifikanter Unterschied feststellbar (s. Tabelle 9).

Nach dem Auftauen (Zp.3) ist der Anteil an NAR-Spermien bei der unsortierten Probengruppe mit Antioxidantien (TGV+AO) im Vergleich zum Nativsperma und zur sortierten Kontrollgruppe (Sort-Kontrolle) signifikant vermindert. Die sortierten Probengruppen unterscheiden sich jedoch nicht signifikant vom Nativsperma. Ein Unterschied der sortierten oder der unsortierten Gruppen untereinander ist nicht erkennbar (s. Tabelle 10). Individuell betrachtet, ist der Unterschied der unsortierten Gruppen (TGV+AO & TGV-Kontrolle) zum Nativsperma nur bei Hengst 1 auch signifikant ausgeprägt (s. Tabelle 11). Bei Hengst 2 ist dieser Unterschied nicht signifikant. Hengst 3 zeigt keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Tabelle 11).

Tabelle 8: Anteil [%] an NAR-Spermien nach 1,5 Stunden Inkubation (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Gesamtwertung)

	<b>n</b>	<b><math>\bar{x} \pm SD</math></b>
Nativ (Zp.1)	31	97,9 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>
Sort+AO (Zp.2)	18	96,0 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.2)	13	94,2 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>

a:b P<0,05

Tabelle 9: Anteil [%] an NAR-Spermien nach 1,5 Stunden Inkubation (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Hengste einzeln)

	Hengst 1		Hengst 2		Hengst 3	
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	9	98,9 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	9	97,7 $\pm$ 1,9	9	96,7 $\pm$ 1,6 <sup>d</sup>
Sort+AO (Zp.2)	6	94,8 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	6	96,3 $\pm$ 1,6	4	96,8 $\pm$ 1,7 <sup>e</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.2)	3	94,7 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup>	3	96,7 $\pm$ 2,3	5	91,5 $\pm$ 2,2 <sup>f</sup>

d:f P&lt;0,001

a:b; e:f P&lt;0,01

a:c P&lt;0,05

Tabelle 10: Anteil [%] an NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Gesamtwertung)

	n	$\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	23	97,5 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>
Sort+AO (Zp.3)	12	96,6 $\pm$ 2,0
Sort-Kontrolle (Zp.3)	11	97,6 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>
TGV+AO (Zp.3)	23	94,6 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>
TGV-Kontrolle (Zp.3)	23	95,4 $\pm$ 2,9

a:b P&lt;0,05

Tabelle 11: Anteil [%] an NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Hengste einzeln)

	Hengst 1		Hengst 2		Hengst 3	
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	7	98,6 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	7	97,5 $\pm$ 2,1	7	96,6 $\pm$ 1,8
Sort+AO (Zp.3)	4	95,5 $\pm$ 2,1	3	98,2 $\pm$ 1,5	4	96,3 $\pm$ 2,1
Sort-Kontrolle (Zp.3)	3	96,8 $\pm$ 1,6	4	98,5 $\pm$ 1,1	3	97,0 $\pm$ 2,5
TGV+AO (Zp.3)	7	92,5 $\pm$ 3,6 <sup>b</sup>	7	97,1 $\pm$ 1,2	7	95,6 $\pm$ 1,7
TGV-Kontrolle (Zp.3)	7	94,6 $\pm$ 2,4 <sup>c</sup>	7	97,0 $\pm$ 0,5	7	96,1 $\pm$ 1,4

a:b P&lt;0,01

a:c P&lt;0,05

## 4.1.2 Motilität

### 4.1.2.1 Zeitpunkt 2

Zum Zeitpunkt 2 zeigen alle Gruppen, außer der nicht inkubierten Gruppe mit AO-Zusatz (TGV+AO) eine signifikante Abnahme der progressiven Motilität im Vergleich zur Ausgangsmotilität (s. Tabelle 12). Diese Abnahme ist jedoch bei den inkubierten Gruppen (Sort+AO & Sort-Kontrolle) deutlicher ausgeprägt und unterscheidet sich nicht nur von der Ausgangsmotilität (s. Nativ, Zp.1), sondern auch signifikant von der nicht inkubierten Gruppe mit AO-Zusatz (TGV+AO). Die inkubierte Proben­gruppe mit AO-Zusatz (Sort+AO) zeigt zu diesem Zeitpunkt auch im Vergleich zur Halteprobe und der nicht inkubierten Kontrollgruppe (TGV-Kontrolle) eine signifikant verminderte Motilität (s. Tabelle 12). Insgesamt wurden 30 Ejakulate, mit mindestens 8 Ejakulaten pro aufgeführten Hengst untersucht.

Tabelle 12: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien zum Zeitpunkt 2 (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1

	Gesamtwertung $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	75,3 ± 7,2 <sup>a</sup>	75,0 ± 8,5 <sup>f</sup>	76,3 ± 5,2 <sup>k</sup>	77,8 ± 6,2 <sup>m</sup>
Sort+AO (Zp.2)	55,3 ± 7,8 <sup>b</sup>	56,0 ± 10,8 <sup>g</sup>	54,0 ± 6,5 <sup>l</sup>	60,0 ± 4,1 <sup>n</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.2)	60,4 ± 5,4 <sup>c</sup>	62,5 ± 2,9 <sup>h</sup>	58,3 ± 7,6 <sup>l</sup>	62,0 ± 4,5 <sup>n</sup>
TGV+AO (Zp.2)	68,1 ± 5,0 <sup>d</sup>	67,9 ± 3,9 <sup>i</sup>	70,6 ± 3,2	69,4 ± 5,0 <sup>o</sup>
TGV-Kontrolle (Zp.2)	66,7 ± 5,9 <sup>e</sup>	65,6 ± 5,0	71,3 ± 2,3	66,1 ± 6,0 <sup>n</sup>
Halteprobe (Zp.2)	67,2 ± 5,4 <sup>e</sup>	65,0 ± 3,5 <sup>j</sup>	71,9 ± 5,3	67,2 ± 5,1 <sup>p</sup>

f:g; m:n P<0,001

m:p P<0,01

a:b,c,e; d:b,c; e:b; f:h,j; i:g; k:l; m:o P<0,05

### 4.1.2.2 Zeitpunkt 3

#### Direkt nach Auftauen:

Die progressive Motilität der sortierten und unsortierten Gruppen ist nach dem Auftauen im Vergleich zur Ausgangsmotilität (s. Nativ, Zp.1) signifikant vermindert. Außerdem ist die progressive Motilität der zwei sortierten Gruppen (Sort+AO & Sort-Kontrolle) signifikant geringer als bei den unsortierten (TGV+AO & TGV-Kontrolle). Ein Unterschied der

sortierten oder der unsortierten Gruppen untereinander ist nicht erkennbar (s. Tabelle 13). Insgesamt wurden nach dem Auftauen 23 Ejakulate, mit mindestens 7 Ejakulaten pro aufgeführten Hengst untersucht.

Tabelle 13: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien direkt nach dem Auftauen (Zp.3, 0min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1

	Gesamtwertung $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	75,5 ± 7,5 <sup>a</sup>	74,2 ± 8,6 <sup>d</sup>	77,1 ± 4,9 <sup>h</sup>	78,6 ± 6,3 <sup>l</sup>
Sort+AO (Zp.3, 0min)	24,2 ± 8,7 <sup>b</sup>	18,8 ± 7,5 <sup>e</sup>	25,0 ± 8,7 <sup>i</sup>	31,3 ± 6,3 <sup>m</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.3, 0min)	27,3 ± 11,5 <sup>b</sup>	28,3 ± 16,1 <sup>f</sup>	27,5 ± 6,5 <sup>i</sup>	33,3 ± 5,8 <sup>m</sup>
TGV+AO (Zp.3, 0min)	57,7 ± 11,0 <sup>c</sup>	52,5 ± 6,9 <sup>g</sup>	67,9 ± 7,6 <sup>j</sup>	56,4 ± 9,0 <sup>n</sup>
TGV-Kontrolle (Zp.3, 0min)	56,5 ± 9,5 <sup>c</sup>	55,0 ± 6,5 <sup>g</sup>	60,0 ± 7,6 <sup>k</sup>	60,7 ± 5,3 <sup>n</sup>

d:e,f; g:e; i:h,j,k; l:m,n; m:n P<0,001

g:d,f; h:k P<0,01

a:b,c; b:c P<0,05

#### 10 Minuten nach Auftauen:

Nach 10 minütiger Inkubation bei +38°C ist der Unterschied der sortierten (Sort+AO & Sort-Kontrolle) zu den unsortierten (TGV+AO & TGV-Kontrolle) Probengruppen weiterhin signifikant. Ein Unterschied der sortierten Gruppen oder unsortierten Gruppen untereinander ist auch nach 10 Minuten Inkubation nicht erkennbar (s. Tabelle 14).

Tabelle 14: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 10 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 10min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1

	Gesamtwertung $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 $\bar{x} \pm SD$
Nativ (1)	75,5 ± 7,5 <sup>a</sup>	74,2 ± 8,6 <sup>d</sup>	77,1 ± 4,9 <sup>h</sup>	78,6 ± 6,3 <sup>a</sup>
Sort+AO (Zp.3, 10min)	29,2 ± 7,3 <sup>b</sup>	30,0 ± 8,2 <sup>e</sup>	26,7 ± 10,4 <sup>i</sup>	32,5 ± 2,9 <sup>b</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.3, 10min)	30,0 ± 10,0 <sup>b</sup>	25,0 ± 13,2 <sup>f</sup>	31,3 ± 6,3 <sup>i</sup>	38,3 ± 2,9 <sup>c</sup>
TGV+AO (Zp.3, 10min)	58,9 ± 9,8 <sup>c</sup>	55,0 ± 5,5 <sup>g</sup>	64,3 ± 7,9 <sup>j</sup>	62,1 ± 7,6 <sup>d</sup>
TGV-Kontrolle (Zp.3, 10min)	56,3 ± 8,9 <sup>c</sup>	53,6 ± 8,0 <sup>g</sup>	62,9 ± 4,9 <sup>k</sup>	57,1 ± 7,6 <sup>e</sup>

d:e,f; g:f; i:h,j,k; l:m,n,o,p; m:o,p; n:o	P<0,001
g:d,e; h:k; n:p	P<0,01
a:b,c; b:c; h:j	P<0,05

### 30 Minuten nach Auftauen:

Da die progressive Motilität der sortierten Proben 30 Minuten nach dem Auftauen bereits sehr stark abgefallen war und die Mindestanforderungen an kryokoserviertes Hengstsperma von 30% vorwärtsbeweglichen Spermien (Richtlinien des Instituts für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover) nicht mehr erfüllt wurden, erfolgte von 30 bis 180 Minuten lediglich die Beurteilung der unsortierten Proben (s. Kap.3.3.1.1) um ggf. einen späteren Effekt der Antioxidantien zu erfassen. Da außerdem die progressive Motilität der aufgetauten Proben mit fortschreitender Zeit abnimmt, wird der zunehmende Unterschied zur Ausgangsmotilität (Nativ, Zp.1) nicht jedes Mal erneut erwähnt.

30 Minuten nach Auftauen ist der Unterschied der Gruppe mit AO-Zusatz (TGV+AO) zur Kontrollprobe (TGV-Kontrolle) in der Gesamtwertung nicht signifikant, auch wenn die Mittelwerte der Gruppe mit AO-Zusatz bei allen Hengsten über denen der Kontrollen liegen (s. Tabelle 15).

Tabelle 15: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 30min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1

	Gesamt- wertung $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	75,5 ± 7,5 <sup>a</sup>	74,2 ± 8,6 <sup>c</sup>	77,1 ± 4,9 <sup>f</sup>	78,6 ± 6,3 <sup>h</sup>
TGV+AO (Zp.3, 30min)	53,4 ± 11,6 <sup>b</sup>	54,2 ± 10,2 <sup>d</sup>	57,9 ± 9,9 <sup>g</sup>	55,7 ± 5,3 <sup>i</sup>
TGV-Kontrolle (Zp.3, 30min)	49,6 ± 8,9 <sup>b</sup>	48,6 ± 6,3 <sup>e</sup>	53,6 ± 6,3 <sup>g</sup>	52,9 ± 3,9 <sup>i</sup>

c:e; f:g; h:i	P<0,001
c:d	P<0,01
a:b	P<0,05

60 Minuten nach Auftauen:

Nach 60 Minuten zeigt sich bei Hengst 2 ein signifikanter Unterschied zugunsten der Gruppe mit AO-Zusatz (s. Tabelle 16). Die durchschnittliche progressive Motilität liegt bei diesem Hengst, für die Gruppe mit Antioxidantien, um etwa 11% höher als die der Kontrollproben.

Tabelle 16: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 60 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 60min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1

	Gesamt- wertung $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	$75,5 \pm 7,5^a$	$74,2 \pm 8,6^c$	$77,1 \pm 4,9^e$	$78,6 \pm 6,3^h$
TGV+AO (Zp.3, 60min)	$42,7 \pm 11,2^b$	$38,3 \pm 7,5^d$	$51,4 \pm 9,0^f$	$43,6 \pm 8,0^i$
TGV-Kontrolle (Zp.3, 60min)	$39,3 \pm 8,7^b$	$38,6 \pm 6,9^d$	$40,7 \pm 7,3^g$	$44,3 \pm 4,5^i$

a:b; c:d; e:f,g; h:i P<0,001

f:g P<0,05

90 Minuten nach Auftauen:

Nach 90 Minuten zeigt sich in der Gesamtwertung erstmals eine signifikant höhere Motilität der Gruppe mit AO-Zusatz im Vergleich zu den Kontrollproben (s. Tabelle 17). Die Mittelwerte der AO-Gruppe (TGV+AO) liegen bei allen drei Hengsten über denen der jeweiligen Kontrollgruppe. Bei Hengst 2 ist wiederum der deutlichste Unterschied (P<0,01) mit ca.15% zu verzeichnen.

Tabelle 17: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 90 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 90min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1

	Gesamt- wertung $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	$75,5 \pm 7,5^a$	$74,2 \pm 8,6^d$	$77,1 \pm 4,9^f$	$78,6 \pm 6,3^i$
TGV+AO (Zp.3, 90min)	$38,9 \pm 11,4^b$	$34,2 \pm 3,8^e$	$49,3 \pm 9,8^g$	$38,6 \pm 6,9^j$
TGV-Kontrolle (Zp.3, 90min)	$31,7 \pm 8,3^c$	$30,7 \pm 7,3^e$	$36,4 \pm 8,0^h$	$32,9 \pm 3,9^j$

a:b,c; d:e; f:g,h; i;j P<0,001  
 g:h P<0,01  
 b:c P<0,05

120 Minuten nach Auftauen:

Nach 120 Minuten hat der Unterschied zusätzlich an Signifikanz ( $P<0,01$ ) gewonnen (s. Tabelle 18). Hengst 2 zeigt einen hochsignifikanten Unterschied ( $P<0,001$ ) der mittleren progressiven Motilität von ca. 19%. Auch bei den übrigen zwei Hengsten liegen die Mittelwerte der AO-Proben über denen der Kontrollen, zeigen jedoch im Gegensatz zu Hengst 2 keine Signifikanz.

Tabelle 18: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 120min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1

	Gesamt- wertung $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	75,5 ± 7,5 <sup>a</sup>	74,2 ± 8,6 <sup>d</sup>	77,1 ± 4,9 <sup>f</sup>	78,6 ± 6,3 <sup>i</sup>
TGV+AO (Zp.3, 120min)	33,6 ± 11,1 <sup>b</sup>	28,3 ± 6,1 <sup>e</sup>	43,6 ± 6,3 <sup>g</sup>	35,0 ± 5,0 <sup>j</sup>
TGV-Kontrolle (Zp.3, 120min)	25,0 ± 9,0 <sup>c</sup>	22,9 ± 8,6 <sup>e</sup>	25,7 ± 5,3 <sup>h</sup>	31,4 ± 4,8 <sup>j</sup>

a:b,c; d:e; f:g,h; g:h; i;j P<0,001  
 b:c P<0,01

150 Minuten nach Auftauen:

Nach 150 Minuten hat die zuvor deutliche Differenz wieder abgenommen und die Mittelwerte der Motilitäten gleichen sich wieder einander an. Eine Signifikanz ist nur für Hengst 2 zu verzeichnen.

Tabelle 19: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 150 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 150min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1

	Gesamt- wertung $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	75,5 ± 7,5 <sup>a</sup>	74,2 ± 8,6 <sup>c</sup>	77,1 ± 4,9 <sup>e</sup>	78,6 ± 6,3 <sup>h</sup>
TGV+AO (Zp.3, 150min)	28,4 ± 11,2 <sup>b</sup>	22,5 ± 6,1 <sup>d</sup>	38,6 ± 6,3 <sup>f</sup>	30,0 ± 5,0 <sup>i</sup>
TGV-Kontrolle (Zp.3, 150min)	25,5 ± 9,0 <sup>b</sup>	22,1 ± 6,4 <sup>d</sup>	27,9 ± 8,1 <sup>g</sup>	31,4 ± 3,8 <sup>i</sup>

a:b; c:d; e:f,g; h:i P<0,001

f:g P<0,05

#### 180 Minuten nach Auftauen:

Nach drei Stunden Inkubation ist ein signifikanter Unterschied bei keinem der drei Hengste mehr nachweisbar. Die mittleren Motilitätswerte der AO-Gruppe (TGV+AO) liegen jedoch bei allen drei Hengsten immer noch über denen der jeweiligen Kontrollgruppe.

Tabelle 20: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 180 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 180min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1

	Gesamt- wertung $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	75,5 ± 7,5 <sup>a</sup>	74,2 ± 8,6 <sup>c</sup>	77,1 ± 4,9 <sup>e</sup>	78,6 ± 6,3 <sup>g</sup>
TGV+AO (Zp.3, 180min)	26,6 ± 9,9 <sup>b</sup>	24,2 ± 8,6 <sup>d</sup>	32,9 ± 6,4 <sup>f</sup>	28,6 ± 5,6 <sup>h</sup>
TGV-Kontrolle (Zp.3, 180min)	20,7 ± 9,5 <sup>b</sup>	16,4 ± 6,3 <sup>d</sup>	24,3 ± 9,3 <sup>f</sup>	26,4 ± 3,8 <sup>h</sup>

c:d; e:f; g:h P<0,001

a:b P<0,05



### 4.1.3 Vitalität & Akrosomenintegrität

#### 4.1.3.1 PI positive Spermien

Zum Zeitpunkt 2 ist kein signifikanter Unterschied der einzelnen Gruppen untereinander zu verzeichnen. Da auch für die einzelnen Hengste keine signifikanten Unterschiede vorhanden sind, sind alle Werte in Tabelle 21 zusammengefasst.

Nach dem Auftauen (Zp.3) zeigen die sortierten Gruppen (Sort+AO & Sort-Kontrolle) einen signifikant höheren Anteil an PI-positiven Spermien als die unsortierten Gruppen (s. Tabelle 22). Ein signifikanter Unterschied zwischen den sortierten bzw. unsortierten Gruppen mit und ohne Antioxidantien besteht nicht. Allen drei Hengsten ist gemeinsam, dass der Anteil PI-positiver Spermien bei der sortierten Kontrollgruppe (Sort-Kontrolle) höher liegt als bei der sortierten Gruppe mit AO-Zusatz (Sort+AO). Bei den zwei unsortierten Gruppen ist es wiederum genau umgekehrt, hier liegen die Werte für die Kontrollgruppe (TGV-Kontrolle) unter denen der Gruppe mit AO-Zusatz (s. Tabelle 22). Die Unterschiede liegen bei den einzelnen Hengsten jedoch nicht im signifikanten Bereich.

Tabelle 21: Anteil [%] PI positiver Spermien zum Zeitpunkt 2

	Gesamtwertung (n= 31) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n= 8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n= 11) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 (n= 8) $\bar{x} \pm SD$
Halteprobe	38,4 ± 7,2	38,4 ± 4,1	33,0 ± 6,6	45,3 ± 4,7
Sort+AO	44,2 ± 18,6	43,6 ± 19,5	43,8 ± 24,3	48,8 ± 17,0
Sort-Kontrolle	50,5 ± 21,3	53,5 ± 20,5	42,0 ± 24,3	67,1 ± 14,1
TGV+AO	41,7 ± 10,2	38,6 ± 8,0	41,2 ± 8,4	48,4 ± 13,3
TGV-Kontrolle	40,5 ± 9,7	34,6 ± 8,1	40,7 ± 9,7	47,4 ± 9,9

Tabelle 22: Anteil [%] PI positiver Spermien nach dem Auftauen (Zp.3)

	Gesamtwertung (n= 23) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$
Sort+AO	70,6 ± 9,8 <sup>a</sup>	71,7 ± 3,9 <sup>c</sup>	69,1 ± 11,0 <sup>h</sup>	66,4 ± 11,5
Sort-Kontrolle	74,2 ± 5,4 <sup>b</sup>	73,5 ± 8,4 <sup>c</sup>	73,1 ± 3,6 <sup>i</sup>	73,4 ± 2,7 <sup>k</sup>
TGV+AO	58,3 ± 10,7 <sup>c</sup>	57,2 ± 10,9 <sup>f</sup>	50,2 ± 5,6 <sup>j</sup>	61,1 ± 5,0
TGV-Kontrolle	52,3 ± 9,6 <sup>d</sup>	50,7 ± 3,6 <sup>g</sup>	48,5 ± 10,7 <sup>j</sup>	52,7 ± 8,9 <sup>l</sup>

b:d,c; a:d; P<0,001

a:c; e:g; i;j; k:l P<0,01

e:f; h;j P<0,05

#### 4.1.3.2 PI negative & FITC-PNA negative Spermien

Zum Zeitpunkt 2 gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich des Anteils an PI- und FITC-PNA-negativen Spermien. Lediglich Hengst 3 zeigt für die inkubierte Kontrollgruppe (Sort-Kontrolle) einen signifikant geringeren Anteil PI- und FITC-PNA-negativer Spermien im Vergleich zur Halteprobe (s. Tabelle 23).

Nach dem Auftauen ist der Anteil PI- und FITC-PNA-negativer Spermien bei den sortierten Probengruppen (Sort+AO & Sort-Kontrolle) im Vergleich zu den unsortierten (TGV+AO & TGV-Kontrolle) signifikant vermindert (s. Tabelle 24). Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den sortierten bzw. den unsortierten Probengruppen aufgrund des AO-Zusatzes. Wie bereits zum Zeitpunkt 2, so hat auch nach dem Auftauen die sortierte Gruppe mit AO-Zusatz (Sort+AO) bei jedem der drei Hengste größere Anteile an PI- und FITC-PNA-negativen Spermien im Vergleich zur sortierten Kontrollgruppe (Sort-Kontrolle). Für die zwei nicht sortierten Gruppen war, wie bereits zu Zeitpunkt 2, genau das Gegenteil der Fall (s. Tabelle 24). Allerdings liegen die Unterschiede auch zu diesem Zeitpunkt nicht im signifikanten Bereich.

Tabelle 23: Anteil [%] PI negativer und FITC-PNA negativer Spermien zum Zeitpunkt 2

	Gesamtwertung (n= 31) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n= 8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n= 11) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 (n= 8) $\bar{x} \pm SD$
Halteprobe	61,2 ± 7,2	61,2 ± 4,0	66,6 ± 6,6	54,2 ± 4,8 <sup>a</sup>
Sort+AO	55,2 ± 18,5	55,8 ± 19,3	55,6 ± 24,1	50,3 ± 17,0
Sort-Kontrolle	49,1 ± 21,2	46,2 ± 20,3	57,6 ± 24,1	32,4 ± 13,9 <sup>b</sup>
TGV+AO	57,8 ± 10,2	61,0 ± 7,9	58,4 ± 8,5	51,0 ± 13,3
TGV-Kontrolle	59,0 ± 9,6	65,0 ± 7,9	58,9 ± 9,6	52,2 ± 9,9

a:b P&lt;0,05

Tabelle 24: Anteil [%] PI negativer und FITC-PNA negativer Spermien nach dem Auftauen (Zp.3)

	Gesamtwertung (n= 23) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$
Sort+AO	29,2 ± 9,7 <sup>a</sup>	28,3 ± 3,9 <sup>e</sup>	30,8 ± 10,9 <sup>h</sup>	33,2 ± 11,4
Sort-Kontrolle	25,6 ± 5,3 <sup>b</sup>	26,4 ± 8,4 <sup>e</sup>	26,7 ± 3,4 <sup>i</sup>	26,4 ± 2,7 <sup>k</sup>
TGV+AO	41,4 ± 10,8 <sup>c</sup>	42,5 ± 10,8 <sup>f</sup>	49,6 ± 5,6 <sup>j</sup>	38,6 ± 5,0
TGV-Kontrolle	47,3 ± 9,7 <sup>d</sup>	49,0 ± 3,6 <sup>g</sup>	51,3 ± 10,8 <sup>j</sup>	46,9 ± 8,9 <sup>l</sup>

b:c,d P&lt;0,001

a:d P&lt;0,001

a:c; e:g; i;j; k:l P&lt;0,01

e:f; h;j P&lt;0,05

#### 4.1.3.3 PI negative & FITC-PNA positive Spermien

Zum Zeitpunkt 2 liegen keine signifikanten Unterschiede der Anteile an PI-negativen und FITC-PNA-positiven Spermien zwischen den verschiedenen Proben vor (s. Tabelle 25). Nach dem Auftauen ist für den Anteil an PI-negativen und FITC-PNA-positiven Spermien lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der sortierten Kontrollgruppe (Sort-Kontrolle) und der unsortierten Kontrolle (TGV-Kontrolle) erkennbar (s. Tabelle 26). Die sortierten bzw. unsortierten Proben weisen jedoch keinen signifikanten Unterschied untereinander auf. Bei

Hengst 1 ist der Anteil PI-negativer und FITC-PNA-positiver Spermien der sortierten Gruppe mit AO-Zusatz (Sort+AO) signifikant geringerer als bei beiden unsortierten (s. Tabelle 26). Für die sortierte Kontrollgruppe (Sort-Kontrolle) ist dieser Unterschied nur im Vergleich zur unsortierten Kontrolle (TGV-Kontrolle) signifikant.

Tabelle 25: Anteil [%] PI negativer und FITC-PNA positiver Spermien zum Zeitpunkt 2

	Gesamtwertung (n= 31) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n= 8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n= 11) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 (n= 8) $\bar{x} \pm SD$
Halteprobe	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,3
Sort+AO	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,3	0,9 ± 0,4
Sort-Kontrolle	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,4
TGV+AO	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,4	0,6 ± 0,2
TGV-Kontrolle	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,1

Tabelle 26: Anteil [%] PI negativer und FITC-PNA positiver Spermien nach dem Auftauen (Zp.3)

	Gesamtwertung (n= 23) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$
Sort+AO	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1 <sup>c</sup>	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,3
Sort-Kontrolle	0,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,1 <sup>d</sup>	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,2
TGV+AO	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1 <sup>e</sup>	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,1
TGV-Kontrolle	0,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,1 <sup>f</sup>	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,1

c:f P<0,01

a:b; c:e; d:f P<0,05

#### 4.1.4 Mitochondrienmembranpotential

Zum Zeitpunkt 2 besteht kein Unterschied zwischen den zwei inkubierten Gruppen (Sort+AO & Sort-Kontrolle) bzw. zwischen den nicht inkubierten Gruppen (TGV+AO & TGV-Kontrolle) im Bezug auf den Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential. Die Werte sind für die inkubierten Gruppen fast identisch und liegen auch bei den zwei nicht inkubierten Gruppen nah beieinander. Die nicht inkubierte Gruppe mit

AO-Zusatz (TGV+AO) zeigt zu diesem Zeitpunkt einen signifikant geringeren Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential im Vergleich zu den Halteproben (s. Tabelle 27). Hengst 2 (s. Tabelle 27) zeigt einen signifikant höheren Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential in der inkubierten Kontrollgruppe (Sort-Kontrolle) im Vergleich zu den nicht inkubierten Gruppen (TGV+AO/-Kontrolle).

Nach dem Auftauen (s. Tabelle 28) zeigt sich für alle drei Hengste ein sehr unterschiedliches Bild zwischen den sortierten und unsortierten Werten. Während in der Gesamtwertung kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Probengruppen besteht, zeigt sich für jeden der drei Hengste ein sehr individuelles Muster. Bei Hengst 1 liegen alle Werte dicht beieinander. Bei Hengst 2 liegen die Werte der unsortierten Probengruppen (TGV+AO & TGV-Kontrolle) signifikant über denen der sortierten (Sort+AO & Sort-Kontrolle). Außerdem liegen bei diesem Hengst, sowohl bei den sortierten als auch bei den unsortierten Gruppen, die jeweilige Gruppe mit AO-Zusatz etwa 2% über der jeweiligen Kontrollgruppe. Allerdings sind diese Unterschiede nicht signifikant. Bei Hengst 3 wiederum ist der Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential bei der sortierten Gruppe mit AO-Zusatz (Sort+AO) um ca. 6% größer als bei der sortierten Kontrollgruppe (Sort-Kontrolle) und 4,6% größer als bei beiden unsortierten Gruppen (TGV+AO/-Kontrolle). Auch dieser Unterschied war allerdings nicht im signifikanten Bereich.

Tabelle 27: Anteil [%] an Spermien mit hohem MMP zum Zeitpunkt 2

	Gesamtwertung (n= 31) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n= 8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n= 11) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 (n= 8) $\bar{x} \pm SD$
Halteprobe	40,0 ± 10,4 <sup>a</sup>	45,0 ± 7,2	40,0 ± 13,7	31,6 ± 4,8
Sort+AO	37,6 ± 13,4	37,9 ± 12,2	37,1 ± 15,7	31,2 ± 11,9
Sort-Kontrolle	37,0 ± 15,4	39,2 ± 18,6	48,8 ± 14,0 <sup>c</sup>	23,1 ± 8,7
TGV+AO	31,1 ± 10,8 <sup>b</sup>	34,0 ± 9,7	27,5 ± 12,5 <sup>d</sup>	27,0 ± 7,1
TGV-Kontrolle	32,9 ± 9,3	36,8 ± 10,0	30,2 ± 8,5 <sup>d</sup>	28,1 ± 7,0

a:b; c:d      P<0,05

Tabelle 28: Anteil [%] an Spermien mit hohem MMP nach dem Auftauen (Zp.3)

	Gesamtwertung (n= 23) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$
Sort+AO	19,6 ± 7,7	18,6 ± 8,9	19,1 ± 7,5 <sup>a</sup>	23,6 ± 6,5
Sort-Kontrolle	16,5 ± 4,9	18,2 ± 5,8	17,1 ± 3,0 <sup>b</sup>	17,6 ± 1,1
TGV+AO	24,8 ± 10,9	20,1 ± 7,8	37,6 ± 7,3 <sup>c</sup>	19,0 ± 6,0
TGV-Kontrolle	25,8 ± 11,5	23,1 ± 10,1	35,9 ± 10,5 <sup>c</sup>	19,0 ± 9,5

b:c P&lt;0,01

a:c P&lt;0,05

## 4.1.5 Spermienchromatinstruktur

### 4.1.5.1 DNA-Fragmentationsindex

Zum Zeitpunkt 2 ist der DFI-Wert für die inkubierte Gruppe mit AO-Zusatz (Sort+AO) signifikant geringer als für die nicht inkubierten Gruppen (TGV+AO/-Kontrolle).

Die DFI-Werte der sortierten Gruppen (Sort+AO & Sort-Kontrolle) unterscheiden sich nach dem Auftauen hochsignifikant von denen der unsortierten Gruppen (s. Tabelle 30). Auch bei den einzelnen Hengsten liegen die DFI-Werte der sortierten Gruppen unter denen der unsortierten (s. Tabelle 30).

Tabelle 29: DFI-Werte zum Zeitpunkt 2

	Gesamtwertung (n= 31) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n= 8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n= 11) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 (n= 8) $\bar{x} \pm SD$
Halteprobe	11,3 ± 4,4	11,5 ± 3,8	7,7 ± 1,6	15,1 ± 4,1
Sort+AO	8,9 ± 5,0 <sup>a</sup>	10,2 ± 6,2	5,2 ± 1,4	12,8 ± 3,6
Sort-Kontrolle	13,1 ± 9,8	20,5 ± 14,6	4,5 ± 0,8	14,7 ± 7,0
TGV+AO	14,2 ± 5,1 <sup>b</sup>	16,3 ± 4,1	8,9 ± 2,9	17,8 ± 4,1
TGV-Kontrolle	13,9 ± 5,2 <sup>b</sup>	14,8 ± 4,5	9,1 ± 2,8	17,4 ± 4,6

a:b P&lt;0,05

Tabelle 30: DFI-Werte nach dem Auftauen (Zp.3)

	Gesamtwertung (n= 23) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 3 (n= 7) $\bar{x} \pm SD$
Sort+AO	$3,8 \pm 1,6^a$	$4,0 \pm 2,0^c$	$4,1 \pm 2,1^g$	$3,8 \pm 0,8^k$
Sort-Kontrolle	$2,7 \pm 3,0^a$	$5,3 \pm 5,3^d$	$1,4 \pm 0,9^h$	$2,2 \pm 0,6^k$
TGV+AO	$17,4 \pm 6,1^b$	$19,2 \pm 4,8^e$	$10,1 \pm 2,5^i$	$20,9 \pm 3,7^l$
TGV-Kontrolle	$16,1 \pm 6,4^b$	$17,6 \pm 4,5^f$	$8,8 \pm 2,1^j$	$20,9 \pm 3,9^l$

a:b; c:e; h:i,j; k:l      P<0,001

d:e,f; c:f; g:i          P<0,01

g:h                          P<0,05

## 4.2 2.Versuchsteil

### 4.2.1 Morphologie

#### 4.2.1.1 Morphologisch unveränderte Spermien

Nach dem Sortierprozess, jedoch vor der Kühlung auf +4°C (Zp.2) ist der Anteil an morphologisch unveränderten Spermien für beide Auffangmedien signifikant größer als beim Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (s. Tabelle 31). Für Hengst 1 besteht diese Signifikanz nur für die Liquid Culture-Gruppe (s. Tabelle 31), während sich bei Hengst 2 die sortierten Gruppen signifikant vom Nativsperma zum Zeitpunkt 1 und von der Halteprobe unterscheiden (s. Tabelle 31).

Nach dem Auftauen zeigt sich beim Anteil morphologisch unveränderter Spermien kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Auffangmedien (s. Tabelle 32). Auch zwischen den verschiedenen Einfrierprogrammen ist nach dem Auftauen kein signifikanter Unterschied festzustellen (s. Tabelle 33). Der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zeigt zum Zeitpunkt 3 ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Anteil morphologisch unveränderter Spermien auf (s. Tabelle 34).

Tabelle 31: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien zum Zeitpunkt 2 (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=26) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=13) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=13) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	57,0 ± 15,6 <sup>a</sup>	68,5 ± 6,5 <sup>c</sup>	45,5 ± 13,3 <sup>e</sup>
INRA82 (Zp.2)	69,6 ± 8,2 <sup>b</sup>	73,0 ± 6,3	66,2 ± 8,7 <sup>f</sup>
Liq.Culture (Zp.2)	71,8 ± 9,1 <sup>b</sup>	77,4 ± 5,9 <sup>d</sup>	66,3 ± 8,3 <sup>f</sup>
Halteprobe (Zp.2)	62,4 ± 13,5	73,5 ± 4,8	51,4 ± 9,7 <sup>g</sup>

e:f P<0,001

c:d; f:g P<0,01

a:b P<0,05



Tabelle 32: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Auffangmedien

	Gesamtwertung		Hengst 1		Hengst 2	
	(n=26)		(n=13)		(n=13)	
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$		$\bar{x} \pm \text{SEM}$		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	
INRA82	68,2 ± 1,5		72,0 ± 1,5		64,5 ± 1,9	
Liq.Culture	67,6 ± 1,5		72,8 ± 1,5		62,4 ± 1,9	

Tabelle 33: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Einfrierprogrammen

	Gesamtwertung		Hengst 1		Hengst 2	
	n	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	n	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
	Programm 1	28	67,0 ± 1,4	14	70,5 ± 1,4	14
Programm 2	24	68,8 ± 1,5	12	74,3 ± 1,5	12	63,4 ± 1,9

Tabelle 34: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen

	Gesamtwertung		Hengst 1		Hengst 2	
	n	$\bar{x} \pm \text{SD}$	n	$\bar{x} \pm \text{SD}$	n	$\bar{x} \pm \text{SD}$
	INRA82, Prog.1	14	66,8 ± 7,4	7	70,4 ± 2,0	7
INRA82, Prog.2	12	69,7 ± 6,5	6	73,5 ± 2,1	6	65,8 ± 5,2
Liq.Culture, Prog.1	14	67,2 ± 6,7	7	70,5 ± 2,0	7	63,9 ± 6,3
Liq.Culture, Prog.2	12	68,0 ± 9,3	6	75,1 ± 2,1	6	60,9 ± 6,6

#### 4.2.1.2 NAR-Spermien

Der Anteil an NAR-Spermien ist bei den sortierten Gruppen signifikant größer als beim Nativsperma zum Zeitpunkt 1 und als bei der Halteprobe (s. Tabelle 35). Hengst 1 zeigt einen signifikanten Unterschied der sortierten Gruppen zum Nativsperma, der Unterschied zur Halteprobe ist allerdings nur bei der INRA82-Gruppe signifikant (s. Tabelle 35). Der Unterschied zu den sortierten Gruppen ist bei Hengst 2 nur im Falle des Nativspermas signifikant, für die Halteprobe liegt der Unterschied nicht im signifikanten Bereich (s. Tabelle 35).

Bei einem Vergleich der aufgetauten Spermien, welche in den zwei unterschiedlichen Medien (INRA82 bzw. Liquid Culture) aufgefangen wurden, lassen sich keinerlei Unterschiede in den

Anteilen an NAR-Spermien feststellen (s. Tabelle 36). Bei beiden Hengsten sind die Werte für die zwei Auffangmedien nahezu identisch (s. Tabelle 36). Ähnlich wie beim Vergleich der Auffangmedien, zeigt sich auch zwischen den zwei Einfrierprogrammen nach dem Auftauen kein Unterschied (s. Tabelle 37). Dies trifft auch für die beiden Hengste im einzelnen zu. Auch bei Betrachtung der einzelnen Gruppen untereinander lässt sich kein Unterschied im Anteil an NAR-Spermien nach dem Auftauen erkennen (s. Tabelle 38).

Tabelle 35: Anteil [%] NAR-Spermien zum Zeitpunkt 2 im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1

	Gesamtwertung (n=26) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=13) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=13) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	90,6 ± 6,1 <sup>a</sup>	89,3 ± 6,7 <sup>c</sup>	91,9 ± 5,3 <sup>g</sup>
INRA82 (Zp.2)	98,2 ± 1,4 <sup>b</sup>	99,1 ± 1,0 <sup>d</sup>	97,3 ± 1,2 <sup>h</sup>
Liq.Culture (Zp.2)	98,2 ± 1,3 <sup>b</sup>	98,6 ± 1,1 <sup>e</sup>	97,7 ± 1,3 <sup>h</sup>
Halteprobe (Zp.2)	95,7 ± 2,5 <sup>a</sup>	96,5 ± 2,4 <sup>f</sup>	94,8 ± 2,4

g:h P<0,001

a:b; d:c,f; c:e P<0,05

Tabelle 36: Anteil [%] NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Auffangmedien

	Gesamtwertung (n=26) $\bar{x} \pm SEM$	Hengst 1 (n=13) $\bar{x} \pm SEM$	Hengst 2 (n=13) $\bar{x} \pm SEM$
INRA82	92,7 ± 0,7	93,3 ± 1,7	92,1 ± 0,7
Liq.Culture	92,9 ± 0,7	93,8 ± 5,1	91,8 ± 0,7

Tabelle 37: Anteil [%] NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Einfrierprogrammen

	Gesamtwertung		Hengst 1		Hengst 2	
	n	$\bar{x} \pm SEM$	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SEM$
Programm 1	28	92,3 ± 0,7	14	93,2 ± 4,9	14	91,4 ± 0,7
Programm 2	24	92,3 ± 0,6	12	94,0 ± 1,9	12	92,6 ± 0,8

Tabelle 38: Anteil [%] NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen

	Gesamtwertung		Hengst 1		Hengst 2	
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$
INRA82, Prog.1	14	92,9 $\pm$ 2,5	7	93,4 $\pm$ 2,2	7	92,4 $\pm$ 2,8
INRA82, Prog.2	12	92,6 $\pm$ 2,7	6	93,3 $\pm$ 1,2	6	91,8 $\pm$ 3,6
Liq.Culture, Prog.1	14	91,7 $\pm$ 5,0	7	93,1 $\pm$ 6,4	7	90,3 $\pm$ 1,9
Liq.Culture, Prog.2	12	94,0 $\pm$ 2,1	6	94,8 $\pm$ 2,3	6	93,3 $\pm$ 1,9

## 4.2.2 Motilität

Zum Zeitpunkt 3, also nach dem Auftauen, erfolgte eine Bewertung der Motilität über einen Zeitraum von insgesamt drei Stunden in halbstündigen Abständen. Da aber nach drei Stunden keine der Gruppen Motilitätswerte von >10% mehr aufweisen konnte, wurde dieser Zeitpunkt statistisch nicht mehr berücksichtigt. Die statistische Auswertung der Motilitätswerte erfolgte also bis zu 150 Minuten nach dem Auftauen.

### 4.2.2.1 Zeitpunkt 2

Die Auswertung der Motilitätswerte der sortierten Spermien vor dem Kühlprozess auf +4°C (Zp.2) ergibt eine signifikante Abnahme der progressiven Motilität im Vergleich zum Ausgangswert (Nativ, Zp.1). Der Unterschied zur Motilität der Halteprobe ist nur für die Liquid Culture-Probe signifikant (s. Tabelle 39). Die Unterschiede bestehen zwar auch bei den Hengsten im einzelnen, jedoch sind diese nur bei Hengst 1 zwischen den sortierten Proben und der Ausgangsmotilität signifikant (s. Tabelle 39).

Tabelle 39: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien zum Zeitpunkt 2 (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1

	Gesamtwertung	Hengst 1	Hengst 2
	(n=26)	(n=13)	(n=13)
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	76,3 $\pm$ 6,6 <sup>a</sup>	78,8 $\pm$ 3,6 <sup>c</sup>	73,8 $\pm$ 7,9
INRA82 (Zp.2)	69,2 $\pm$ 5,0 <sup>b</sup>	69,2 $\pm$ 5,3 <sup>f</sup>	69,2 $\pm$ 4,9
Liq.Culture (Zp.2)	67,7 $\pm$ 6,5 <sup>c</sup>	67,7 $\pm$ 7,0 <sup>f</sup>	67,7 $\pm$ 6,3
Halteprobe (Zp.2)	73,5 $\pm$ 5,6 <sup>d</sup>	74,6 $\pm$ 5,6	72,3 $\pm$ 5,6

a:b,c; d:c; e:f      P<0,05

#### 4.2.2.2      Zeitpunkt 3:

Weder für die Gesamtwertung, noch für die Hengste im einzelnen kann für den gesamten Zeitverlauf nach dem Auftauen ein signifikanter Unterschied der progressiven Motilität zwischen den Proben der zwei Auffangmedien festgestellt werden. Dies sei zusammenfassend für den gesamten Zeitverlauf nach dem Auftauen an dieser Stelle erwähnt. Eine, zwischen den Auffangmedien vergleichende Auflistung der gesamten Motilitätswerte zu den einzelnen Zeiten nach Auftauen, ist in Tabelle 40 aufgeführt.

Vorab sei außerdem bemerkt, dass aufgeführte signifikante Unterschiede in den Tabelle 41 bis Tabelle 44 nur auf horizontaler Ebene, also für den jeweiligen Messzeitpunkt, gelten.

#### Direkt nach Auftauen (Zp3, 0 Min.):

In der Gesamtwertung lassen sich nach dem Auftauen zwischen den zwei Einfrierprogrammen keine signifikanten Unterschiede in der progressiven Motilität feststellen (s. Tabelle 41). Hengst 2 zeigt allerdings mit einer Differenz von fast 8% bereits direkt nach dem Auftauen eine signifikant höhere Motilität der Proben, welche mit Programm 1 eingefroren worden waren (s. Tabelle 41). Bei Betrachtung der einzelnen Gruppen untereinander zeigt sich direkt nach dem Auftauen für Hengst 1 ein signifikanter Unterschied zwischen den Liquid Culture-Proben zugunsten von Einfrierprogramm 2 (s. Tabelle 43). Für Hengst 2 hingegen gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei INRA82-Gruppen zugunsten von Einfrierprogramm 1 (s. Tabelle 44).

#### 10 Minuten nach Auftauen (Zp3, 10 Min.):

Während die Unterschiede in der progressiven Motilität in der Gesamtwertung und bei Hengst 1 nicht signifikant sind, zeigt Hengst 2 nach 10 Minuten Inkubation, wie schon direkt nach dem Auftauen, einen sehr signifikanten Unterschied zwischen den zwei Einfrierprogrammen (s. Tabelle 41). Dabei liegt die progressive Motilität der Proben die mit Programm 1 eingefroren worden waren etwa 13% über denen, welche mit Programm 2 eingefroren wurden. Ein Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zeigt 10 Minuten nach dem

Auftauen lediglich für Hengst 2 signifikante Unterschiede. Bei diesem Hengst ist die progressive Motilität der mit Programm 1 eingefrorenen INRA82-Gruppe (INRA82, Prog.1) signifikant höher als bei beiden Probengruppen, die mit Programm 2 eingefroren wurden (s. Tabelle 44).

#### 30 Minuten nach Auftauen:

Wie bei den vorausgehenden Motilitätswerten ist auch 30 Minuten nach Auftauen nur für Hengst 2 ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der beiden Einfrierprogramme vorhanden (s. Tabelle 41). Die progressive Motilität der Programm 1-Gruppe liegt im Vergleich ca. 10% höher.

Auch der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zeigt 30 Minuten nach Auftauen, etwa die gleichen Signifikanzen wie zum vorhergehenden Zeitpunkt. Hengst 2 zeigt den höchsten Motilitätswert für die, mit INRA82 aufgefangenen und mit Programm 1 eingefrorene Probengruppe. Die Werte liegen signifikant über denen der INRA82-Gruppe, die mit Programm 2 eingefroren wurde und der Liquid Culture-Gruppe, welche mit Programm 1 eingefroren wurde (s. Tabelle 44). Für die Gesamtwertung und Hengst 1 können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (s. Tabelle 41, Tabelle 42 & Tabelle 43).

#### 60 Minuten nach Auftauen:

Während Hengst 2 auch nach einer Stunde Inkubation der aufgetauten Proben immer noch eine sehr signifikant höhere Motilität ( $P < 0,001$ ) der Gruppe zeigt, welche mit Programm 1 eingefroren wurde, zeigt Hengst 1 eine signifikant höhere Motilität ( $P < 0,05$ ) der Gruppe aus Einfrierprogramm 2 (s. Tabelle 41).

Ein Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander ergibt nur für Hengst 2 signifikante Werte (s. Tabelle 44). Die höchsten Motilitätswerte haben die Gruppen, die mit Programm 1 eingefroren wurden. Sowohl die INRA82- als auch die Liquid Culture-Gruppe aus dem Programm 1 haben signifikant höhere Motilitätswerte, als die INRA82-Gruppe, welche mit Programm 2 eingefroren wurde.

#### 90 Minuten nach Auftauen:

Wie bereits bei den vorausgehenden Zeitpunkten ist, auch 1,5 Stunden nach dem Auftauen, nur für Hengst 2 ein signifikanter Unterschied zwischen den Motilitätswerten der zwei verschiedenen Einfrierprogramme vorhanden (s. Tabelle 41). Nach 1,5 Stunden Inkubation der aufgetauten Proben läßt sich, bei Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander, wiederum nur für Hengst 2 ein signifikanter Unterschied in der progressiven Motilität feststellen (s. Tabelle 44). Die zwei INRA82-Gruppen unterscheiden sich signifikant zugunsten der mit Programm 1 eingefrorenen Gruppe, welche ca. 12% über der aus Programm 2 liegt.

#### 120 Minuten nach Auftauen:

Auch nach zwei Stunden ist der Unterschied zwischen den zwei Einfrierprogrammen für Hengst 2 noch signifikant (s. Tabelle 41). Wie bei den vorherigen Zeitpunkten zeigt sich für die Gesamtwertung und für Hengst 1 kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (s. Tabelle 42 & Tabelle 43). Hengst 2 zeigt nach zwei Stunden Inkubation, wie bereits zuvor, signifikant höhere Werte für beide Programm 1-Gruppen (INRA82, Prog.1 & Liq.Culture, Prog.1) im Vergleich zur Gruppe der Proben, welche mit INRA82 aufgefangen wurden und mit Programm 2 eingefroren wurden (s. Tabelle 44).

#### 150 Minuten nach Auftauen:

Die Unterschiede zwischen den Motilitätswerten der zwei Einfrierprogramme sind ähnlich signifikant wie nach 90 und 120 Minuten. Wie zuvor zeigt Hengst 2 eine signifikant höhere Motilität für das Einfrierprogramm 1 (s. Tabelle 41). 2,5 Stunden nach dem Auftauen tendieren die Motilitäten zu Werten unter 10%. Wie schon bei den vorhergehenden Zeitpunkten zeigt nur Hengst 2 signifikante Unterschiede. Beide Programm 1-Gruppen weisen bei diesem Hengst noch Motilitäten von über 10% aus und unterscheiden sich signifikant von der, mit Programm 2 eingefrorenen INRA82-Gruppe (s. Tabelle 44).

Zusammenfassung:

In Tabelle 40 sind die Motilitätswerte, vergleichend zwischen den Auffangmedien aufgeführt. Signifikanten Unterschiede zwischen den Auffangmedien konnten für die einzelnen Zeitpunkte jedoch nicht festgestellt werden.

Tabelle 41 stellt die Motilitätswerte für die zwei unterschiedlichen Einfrierprogramme zu den jeweiligen Zeitpunkten gegenüber. Die deutlichsten Signifikanzen zeigt Hengst 2, der über den gesamten Zeitverlauf signifikant höhere Motilitäten für die Proben des Einfrierprogramm 1 zeigt. Zwar sind die durchschnittlichen Werte der Gesamtwertung durchgehend größer für die mit Programm 1 eingefrorenen Proben, jedoch ist dieser Unterschied über den gesamten Zeitverlauf nicht signifikant. Hengst 1 zeigt, im Vergleich zu Hengst 2, eine etwas gegenläufige Tendenz. Die Mittelwerte sind zwar durchgehend höher für die mit Programm 2 eingefrorenen Proben, jedoch ist ein signifikanter Unterschied ( $P < 0,05$ ) nur zu einem Zeitpunkt (Zp.3, 60min) vorhanden.

Tabelle 42, Tabelle 43 und Tabelle 44 stellen die einzelnen Gruppen gegenüber. Im Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander, kann in der Gesamtwertung zu keinem der Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Gleiches gilt für Hengst 1, mit Ausnahme des Zeitpunktes direkt nach Auftauen (Zp.3, 0min). Dort zeigt sich eine signifikant höhere Motilität für die INRA82-Gruppe des Einfrierprogramms 2 im Vergleich zur INRA82-Gruppe des Einfrierprogramms 1. Hengst 2 zeigt die deutlichsten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die durchschnittlich höchsten Motilitätswerte erzielt bei diesem Hengst die mit INRA82 aufgefangene und mit Programm 1 eingefrorene Gruppe (INRA82, Prog.1). Diese Werte sind zu jedem Zeitpunkt signifikant höher als die, der INRA82-Gruppe, die mit Programm 2 eingefroren wurde. Auch die Liquid Culture-Gruppe, die mit Programm 1 eingefroren wurde, zeigt zumeist signifikant höhere Motilitäten, als die zuvor genannte Gruppe (s. Tabelle 44).

Tabelle 40: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardfehler (SEM) der Anteile [%] progressiv motiler Spermien im Zeitverlauf nach dem Auftauen, vergleichend zwischen den Auffangmedien

Minuten nach Auftauen	Gesamtwertung		Hengst 1		Hengst 2	
	INRA82	Liquid Culture	INRA82	Liquid Culture	INRA82	Liquid Culture
	(n=26)	(n=26)	(n=13)	(n=13)	(n=13)	(n=13)
0	30,7 ± 2,7	30,5 ± 2,7	40,8 ± 3,1	39,5 ± 3,1	20,7 ± 1,9	21,4 ± 1,9
10	30,1 ± 2,5	29,1 ± 2,5	37,3 ± 3,1	36,4 ± 3,1	23,0 ± 2,2	21,7 ± 2,2
30	23,9 ± 1,9	24,7 ± 1,9	29,6 ± 2,1	29,2 ± 2,1	18,2 ± 2,1	20,2 ± 2,1
60	18,0 ± 1,5	19,1 ± 1,5	22,0 ± 1,8	21,1 ± 1,8	14,1 ± 1,7	17,0 ± 1,7
90	15,7 ± 1,4	16,5 ± 1,4	17,7 ± 1,6	19,4 ± 1,6	13,8 ± 1,9	13,7 ± 1,9
120	12,4 ± 1,3	12,0 ± 1,3	14,2 ± 7,0	12,7 ± 6,0	10,7 ± 1,5	11,0 ± 1,5
150	8,7 ± 5,8	7,9 ± 5,1	9,3 ± 1,5	7,4 ± 1,5	7,7 ± 1,3	8,3 ± 1,3

Tabelle 41: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardfehler (SEM) der Anteile [%] progressiv motiler Spermien im Zeitverlauf nach dem Auftauen, vergleichend zwischen den Einfrierprogrammen

Minuten nach Auftauen	Gesamtwertung		Hengst 1		Hengst 2	
	Prog. 1	Prog. 2	Prog. 1	Prog. 2	Prog. 1	Prog. 2
	(n=28)	(n=24)	(n=14)	(n=12)	(n=14)	(n=12)
0	31,6 ± 2,6	29,6 ± 2,8	38,2 ± 3,0	42,1 ± 3,3	25,0 ± 1,9 <sup>c</sup>	17,1 ± 2,0 <sup>d</sup>
10	32,1 ± 2,4	27,1 ± 2,6	35,4 ± 3,0	38,3 ± 3,2	28,9 ± 2,1 <sup>e</sup>	15,8 ± 2,3 <sup>f</sup>
30	25,7 ± 1,8	22,9 ± 2,0	27,1 ± 2,0	31,7 ± 2,2	24,3 ± 2,1 <sup>c</sup>	14,2 ± 2,2 <sup>d</sup>
60	20,0 ± 1,5	17,1 ± 1,6	18,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	24,2 ± 1,8 <sup>b</sup>	21,1 ± 1,6 <sup>e</sup>	10,0 ± 1,7 <sup>f</sup>
90	17,7 ± 1,3	14,6 ± 1,4	17,5 ± 1,5	19,6 ± 1,6	17,9 ± 1,8 <sup>a</sup>	9,6 ± 1,9 <sup>b</sup>
120	13,4 ± 1,2	11,0 ± 1,3	11,8 ± 6,1	15,4 ± 6,6	15,0 ± 1,4 <sup>c</sup>	6,7 ± 1,5 <sup>d</sup>
150	9,1 ± 5,1	7,3 ± 5,7	6,8 ± 1,4	10,0 ± 1,5	11,4 ± 1,2 <sup>c</sup>	4,6 ± 1,3 <sup>d</sup>

e:f P<0,001

c:d P<0,01

a:b P<0,05



Tabelle 42: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) der Anteile [%] progressiv motiler Spermien im Zeitverlauf nach dem Auftauen, vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen (Gesamtwertung)

Minuten nach Auftauen	Gesamtwertung			
	INRA82	INRA82	Liquid Culture	Liquid Culture
	Prog. 1	Prog. 2	Prog. 1	Prog. 2
	(n=14)	(n=12)	(n=14)	(n=12)
0	36,4 ± 14,7	25,0 ± 15,1	26,8 ± 8,9	34,2 ± 15,8
10	35,7 ± 11,4	24,6 ± 16,3	28,6 ± 9,3	29,6 ± 12,9
30	27,9 ± 7,8	20,0 ± 12,1	23,6 ± 8,2	25,8 ± 10,6
60	21,4 ± 6,9	14,6 ± 9,6	18,6 ± 7,2	19,6 ± 7,5
90	18,9 ± 5,3	12,5 ± 7,5	16,4 ± 6,9	16,6 ± 8,1
120	15,7 ± 5,8	9,2 ± 8,2	11,1 ± 5,9	12,9 ± 5,8
150	10,0 ± 4,3	7,1 ± 6,9	8,2 ± 5,8	7,5 ± 4,5

Tabelle 43: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) der Anteile [%] progressiv motiler Spermien im Zeitverlauf nach dem Auftauen, vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen (Hengst 1)

Minuten nach Auftauen	Hengst 1			
	INRA82	INRA82	Liquid Culture	Liquid Culture
	Prog. 1	Prog. 2	Prog. 1	Prog. 2
	(n=7)	(n=6)	(n=7)	(n=6)
0	45,7 ± 13,0	35,8 ± 14,6	30,7 ± 8,9 <sup>a</sup>	48,3 ± 6,8 <sup>b</sup>
10	37,9 ± 11,5	36,7 ± 14,4	32,9 ± 9,9	40,0 ± 8,4
30	29,3 ± 8,4	30,0 ± 6,3	25,0 ± 7,1	33,3 ± 8,2
60	21,4 ± 6,9	22,5 ± 6,9	16,4 ± 6,9	25,8 ± 3,8
90	17,9 ± 3,9	17,5 ± 6,9	17,1 ± 6,4	21,7 ± 5,2
120	14,3 ± 6,1	14,2 ± 8,6	9,3 ± 5,3	16,7 ± 4,1
150	7,9 ± 4,9	10,8 ± 7,4	5,7 ± 4,5	9,2 ± 3,8

a:b P<0,05

Tabelle 44: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) der Anteile [%] progressiv motiler Spermien im Zeitverlauf nach dem Auftauen, vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen (Hengst 2)

Minuten nach Auftauen	Hengst 2			
	INRA82	INRA82	Liquid Culture	Liquid Culture
	Prog. 1	Prog. 2	Prog. 1	Prog. 2
	(n=7)	(n=6)	(n=7)	(n=6)
0	27,1 ± 9,9 <sup>a</sup>	14,2 ± 2,0 <sup>b</sup>	22,9 ± 7,6	20,0 ± 4,5
10	33,6 ± 11,8 <sup>a,e</sup>	12,5 ± 5,2 <sup>f</sup>	24,3 ± 6,7	19,2 ± 5,8 <sup>b</sup>
30	26,4 ± 7,5 <sup>c</sup>	10,0 ± 6,3 <sup>d,b</sup>	22,1 ± 9,5 <sup>a</sup>	18,3 ± 6,8
60	21,4 ± 7,5 <sup>c</sup>	6,7 ± 2,6 <sup>d</sup>	20,7 ± 7,3 <sup>c</sup>	13,3 ± 4,1
90	20,0 ± 6,5 <sup>a</sup>	7,5 ± 4,2 <sup>b</sup>	15,7 ± 7,9	11,7 ± 7,5
120	17,1 ± 5,7 <sup>c</sup>	4,2 ± 3,8 <sup>d,b</sup>	12,9 ± 6,4 <sup>a</sup>	9,2 ± 4,9
150	12,1 ± 2,7 <sup>a</sup>	3,3 ± 4,1 <sup>b</sup>	10,7 ± 6,1 <sup>a</sup>	5,8 ± 4,9

e:f P<0,001

c:d P<0,01

a:b P<0,05

### 4.2.3 Spermienchromatinstruktur

#### 4.2.3.1 DNA-Fragmentationsindex

Nach dem Sortierprozess und vor der Kühlung auf +4°C (Zp.2) ist der mittlere DFI-Wert der Spermien bei beiden Hengsten, jeweils für beide Auffangmedien signifikant vermindert im Vergleich zur Halteprobe und zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (s. Tabelle 45). Nach dem Auftauen (Zp.3) zeigen die Spermien der INRA82-Gruppe einen niedrigeren mittleren DFI-Wert, als die Spermien der Gruppe, in der EquiPro<sup>®</sup> Liquid Culture als Auffangmedium verwendet wurde (s. Tabelle 46). Dieser Unterschied ist für Hengst 2 und in der Gesamtwertung signifikant. Die Proben zeigen keinen signifikanten Unterschied der DFI-Werte zwischen den Einfrierprogrammen (s. Tabelle 47).

Beim Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zum Zeitpunkt 3, zeigt sich kein signifikanter Unterschied, lediglich zum Nativsperma zeigen alle Gruppen signifikant niedrigere DFI-Werte (s. Tabelle 48). Einzige Ausnahme ist die Liquid Culture-Gruppe aus

dem Tiefgefrierprogramm 2 des zweiten Hengstes. In diesem Fall reicht der Unterschied nicht für eine Signifikanz aus.

Aufgeführte Signifikanzen beziehen sich in Tabelle 45 bis Tabelle 48 immer nur auf die jeweilige Spalte.

Tabelle 45: **DFI-Werte zum Zeitpunkt 2** (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=26) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=13) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=13) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	8,0 ± 3,5 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,9 <sup>a</sup>	10,2 ± 4,2 <sup>a</sup>
INRA82 (Zp.2)	1,9 ± 2,0 <sup>b</sup>	2,3 ± 2,8 <sup>b</sup>	1,4 ± 0,7 <sup>b</sup>
Liq.Culture (Zp.2)	2,3 ± 2,7 <sup>b</sup>	3,1 ± 3,6 <sup>b</sup>	1,5 ± 1,0 <sup>b</sup>
Halteprobe (Zp.2)	9,8 ± 5,0 <sup>a</sup>	9,0 ± 6,8 <sup>a</sup>	10,5 ± 2,3 <sup>a</sup>

a:b P<0,05

Tabelle 46: **DFI-Werte nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Auffangmedien**

	Gesamtwertung (n=26) $\bar{x} \pm SEM$	Hengst 1 (n=13) $\bar{x} \pm SEM$	Hengst 2 (n=13) $\bar{x} \pm SEM$
INRA82	1,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,6 ± 0,4	1,5 ± 0,3 <sup>a</sup>
Liq.Culture	2,4 ± 0,3 <sup>b</sup>	2,2 ± 0,4	2,6 ± 0,3 <sup>b</sup>

a:b P<0,05

Tabelle 47: **DFI-Werte nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Einfrierprogrammen**

	Gesamtwertung		Hengst 1		Hengst 2	
	n	$\bar{x} \pm SEM$	n	$\bar{x} \pm SEM$	n	$\bar{x} \pm SEM$
Programm 1	28	1,7 ± 0,3	14	1,7 ± 0,4	14	1,7 ± 0,3
Programm 2	24	2,2 ± 0,3	12	2,0 ± 0,4	12	2,4 ± 0,3

Tabelle 48: DFI-Werte nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen ( & zum Nativperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung		Hengst 1		Hengst 2	
	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$	n	$\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	26	$8,0 \pm 3,5^c$	13	$6,2 \pm 0,9^a$	13	$10,2 \pm 4,2^c$
INRA82, Prog.1 (Zp.3)	14	$3,7 \pm 8,1^d$	7	$1,8 \pm 1,1^b$	7	$1,3 \pm 0,3^d$
INRA82, Prog.2 (Zp.3)	12	$1,6 \pm 0,8^d$	6	$1,4 \pm 0,8^b$	6	$1,8 \pm 0,8^d$
Liq.Culture, Prog.1 (Zp.3)	14	$1,9 \pm 1,4^d$	7	$1,6 \pm 1,3^b$	7	$2,2 \pm 1,5^d$
Liq.Culture, Prog.2 (Zp.3)	12	$2,8 \pm 2,0^d$	6	$2,6 \pm 2,3^b$	6	$3,0 \pm 0,3$

a:b P<0,001

c:d P<0,05

### 4.3 3.Versuchsteil

Angegebene Signifikanzen beziehen sich in diesem Versuchsteil nur auf die jeweilige Spalte, gelten also nur in vertikaler Richtung.

#### 4.3.1 Morphologie

##### 4.3.1.1 Morphologisch unveränderte Spermien

Nach der PureSperm<sup>®</sup>-Dichtegradientenzentrifugation (Zp.2) zeigen besonders das Pellet (PS-Pellet), aber auch die zweite Phase (PS, 2.Phase) des Zentrifugats einen sehr signifikant höheren Anteil an morphologisch unveränderten Spermien, im Vergleich zur Kontrollgruppe (KMT-Kontrolle) und zum Nativsperma (s. Tabelle 49).

Tabelle 49: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach der Dichtegradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle) und zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=14) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=7) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	54,7 ± 13,1 <sup>a</sup>	66,5 ± 4,8 <sup>a</sup>	42,9 ± 4,9 <sup>a</sup>
PS-Pellet (Zp.2)	85,3 ± 5,2 <sup>b</sup>	87,6 ± 2,7 <sup>b</sup>	83,1 ± 6,3 <sup>b</sup>
PS, 2.Phase (Zp.2)	76,4 ± 16,0 <sup>b</sup>	86,3 ± 6,7 <sup>b</sup>	66,6 ± 16,9 <sup>c</sup>
KMT-Kontrolle (Zp.2)	54,6 ± 13,8 <sup>a</sup>	65,0 ± 3,2 <sup>a</sup>	44,3 ± 12,4 <sup>a</sup>

a:b P<0,001

a:c P<0,01

##### 4.3.1.2 NAR-Spermien

Der Anteil an NAR-Spermien ist, im Vergleich zum Nativsperma, sowohl im Pellet (PS-Pellet), als auch in der zweiten Phase (PS, 2.Phase) signifikant größer. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (KMT-Kontrolle) unterscheidet sich nur das Pellet signifikant (s. Tabelle 50). Für Hengst 1 besteht ein hochsignifikanter Unterschied der zwei Fraktionen des Zentrifugats (PS-Pellet & PS, 2.Phase) zum Nativsperma. Weniger deutlich, aber doch signifikant, zeigt dieser Hengst auch einen Unterschied zwischen der Kontrolle (KMT-Kontrolle) und dem

Nativsperma (s. Tabelle 50). Hengst 2 zeigt nur für das Pellet einen signifikant höheren Anteil an NAR-Spermien im Vergleich zum Nativsperma (s. Tabelle 50).

Tabelle 50: Anteil [%] NAR-Spermien nach der Dichtgradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle) und zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=14) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=7) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	89,7 ± 4,9 <sup>a</sup>	89,6 ± 5,3 <sup>a</sup>	89,7 ± 4,9 <sup>b</sup>
PS-Pellet (Zp.2)	97,5 ± 2,1 <sup>b</sup>	98,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	96,1 ± 2,2 <sup>d</sup>
PS, 2.Phase (Zp.2)	95,4 ± 3,1 <sup>c</sup>	97,4 ± 2,2 <sup>b</sup>	93,4 ± 2,5
KMT-Kontrolle (Zp.2)	93,0 ± 3,6 <sup>d</sup>	94,9 ± 2,8 <sup>e</sup>	91,1 ± 3,6

a:b,c P<0,001

b:d P<0,01

a:e P<0,05

#### 4.3.2 Motilität

Tabelle 51 zeigt, dass der Anteil progressiv motiler Spermien im Pellet (PS-Pellet) in etwa der Ausgangsmotilität zum Zeitpunkt 1 entspricht. Sowohl die Ausgangsmotilität (s. Nativ, Zp.1) als auch die Motilitätswerte des Pellets und der zweiten Phase (PS, 2.Phase) liegen, in der Gesamtwertung und für Hengst 1, signifikant über der Motilität der Kontrollgruppe. Während sich bei Hengst 2 zwar die zentrifugierten Gruppen (PS-Pellet & PS,2.Phase) signifikant von der Kontrolle (KMT-Kontrolle) unterscheiden, ist der Unterschied zwischen der Ausgangsmotilität und der Kontrollgruppe nicht signifikant.

Tabelle 51: Anteil [%] progressiv motiler Spermien nach der Dichtgradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle) und zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=14) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=7) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=7) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	76,1 ± 10,8 <sup>a</sup>	82,9 ± 6,4 <sup>c</sup>	69,3 ± 10,2
PS-Pellet (Zp.2)	76,4 ± 6,9 <sup>a</sup>	80,7 ± 4,5 <sup>c</sup>	72,1 ± 6,4 <sup>a</sup>
PS, 2.Phase (Zp.2)	72,8 ± 3,8 <sup>a</sup>	74,3 ± 4,5 <sup>d</sup>	71,4 ± 2,4 <sup>a</sup>
KMT-Kontrolle (Zp.2)	60,0 ± 9,2 <sup>b</sup>	60,7 ± 11,0 <sup>e</sup>	59,3 ± 7,9 <sup>b</sup>

c:e P<0,001  
 d:e P<0,01  
 a:b P<0,05

### 4.3.3 Vitalität & Akrosomenintegrität

#### 4.3.3.1 PI positive Spermien

In der Gesamtwertung scheint es, als ob sich die zwei Fraktionen des Zentrifugats (PS-Pellet & PS, 2.Phase) im Anteil PI-positiver Spermien, nicht von der Kontrolle unterscheiden. Betrachtet man die Hengste im einzelnen, so scheinen sie unterschiedlich auf die Zentrifugation zu reagieren. Hengst 2 zeigt etwas höhere Anteile an PI-positiven Spermien für die zwei Fraktionen des Zentrifugats im Vergleich zur Kontrolle. Für diesen Unterschied konnte jedoch keine Signifikanz aufgezeigt werden. Hengst 1 hingegen zeigt eine signifikante Abnahme der PI-positiven Spermien für beide Fraktionen des Zentrifugats im Vergleich zur Kontrolle (s. Tabelle 52).

Tabelle 52: Anteil [%] PI-positiver Spermien nach der Dichtegradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle))

	Gesamtwertung (n=12) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=6) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=6) $\bar{x} \pm SD$
PS-Pellet	38,4 ± 17,9	26,9 ± 7,6 <sup>a</sup>	49,8 ± 18,2
PS, 2.Phase	35,0 ± 12,3	26,8 ± 6,2 <sup>a</sup>	43,2 ± 18,2
KMT-Kontrolle	38,0 ± 4,3	36,7 ± 2,5 <sup>b</sup>	39,4 ± 5,6

a:b P<0,05

#### 4.3.3.2 PI negative & FITC-PNA negative Spermien

Ähnlich wie beim Anteil an PI-positiven Spermien, reagieren die Hengste auch beim Anteil an PI- und FITC-PNA-negativen Spermien. Signifikante Unterschiede findet man hier jedoch auch nur für Hengst 1. Beide Fraktionen des Zentrifugats (PS-Pellet & PS, 2.Phase) weisen einen signifikant größeren Anteil an PI- und FITC-PNA-negativen Spermien auf, als die Kontrollgruppe (s. Tabelle 53).

Tabelle 53: Anteil [%] PI negativer und FITC-PNA negativer Spermien nach der Dichtegradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle))

	Gesamtwertung (n=12) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=6) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=6) $\bar{x} \pm SD$
PS-Pellet	61,6 ± 17,9	73,0 ± 7,6 <sup>a</sup>	50,1 ± 18,2
PS, 2.Phase	65,0 ± 12,3	73,2 ± 6,2 <sup>a</sup>	56,7 ± 11,4
KMT-Kontrolle	61,9 ± 4,4	63,2 ± 2,6 <sup>b</sup>	60,5 ± 5,6

a:b P<0,05

#### 4.3.3.3 PI negative & FITC-PNA positive Spermien

Die Anteile der PI-negativen und FITC-PNA-positiven Spermien unterscheiden sich in den zwei Fraktionen des Zentrifugats nicht signifikant von der Kontrollgruppe (s. Tabelle 54).

Tabelle 54: Anteil [%] PI-negativer & FITC-PNA-positiver Spermien nach der Dichtegradientenzentrifugation (Zp.2) im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle)

	Gesamtwertung (n=12) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=6) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=6) $\bar{x} \pm SD$
PS-Pellet	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,06	0,07 ± 0,03
PS, 2.Phase	0,07 ± 0,04	0,05 ± 0,03	0,10 ± 0,03
KMT-Kontrolle	0,10 ± 0,06	0,08 ± 0,06	0,12 ± 0,06

#### 4.3.4 Mitochondrienmembranpotential

In Tabelle 55 zeigt die Gesamtwertung für das Pellet (PS-Pellet) den höchsten Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (MMP). Sowohl das Pellet, als auch die zweite Phase (PS, 2.Phase) des Zentrifugats zeigen einen signifikant größeren Anteil an Spermien mit hohem MMP im Vergleich zur Kontrollgruppe.



Tabelle 55: Anteil [%] an Spermien mit hohem MMP nach der Dichtegradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle))

	Gesamtwertung (n=12) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=6) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=6) $\bar{x} \pm SD$
PS-Pellet	65,7 ± 17,0 <sup>a</sup>	76,2 ± 14,4 <sup>a</sup>	55,1 ± 12,8
PS, 2.Phase	61,0 ± 13,4 <sup>b</sup>	63,7 ± 12,0	58,3 ± 15,3
KMT-Kontrolle	46,8 ± 9,9 <sup>c</sup>	51,0 ± 5,6 <sup>c</sup>	42,7 ± 12,0

a:c P<0,01

b:c P<0,05

## 4.4 4.Versuchsteil

Angegebene Signifikanzen beziehen sich, wie schon im vorhergehenden Versuchsteil, mit Ausnahme von Tabelle 63, nur auf die jeweilige Spalte, gelten also nur in vertikaler Richtung.

### 4.4.1 Morphologie

#### 4.4.1.1 Morphologisch unveränderte Spermien

Zum Zeitpunkt 2 (s. Abbildung 8, S.66) zeigt die Gruppe der PS-zentrifugierten und sortierten Proben (Sort-PureSperm) die höchsten Anteile an morphologisch unveränderten Spermien. Dieser Unterschied ist sowohl zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1, als auch zur sortierten Kontrollgruppe (Sort-Kontrolle) signifikant (s. Tabelle 56). Auch die sortierte Kontrollgruppe weist einen, in der Gesamtwertung und für Hengst 2, signifikanten Unterschied zum Nativsperma auf (s. Tabelle 56).

Nach dem Auftauen (Zp.3) zeigen die sortierten Probengruppen untereinander und zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 ähnliche Verhältnisse. Sowohl die PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe (Sort-PureSperm) als auch die Kontrollgruppe (Sort-Kontrolle) zeigen, auch nach dem Auftauen noch signifikant größere Anteile an morphologisch unveränderten Spermien im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (s. Tabelle 57). Zum Teil ist auch der Unterschied

zwischen PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe und Kontrollgruppe noch signifikant, mit höheren Werten für die PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe (s. Tabelle 57).

Tabelle 56: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Sortiervorgang und vor der Kühlung auf +4°C (Zp.2) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=16) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=8) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	56,1 ± 12,3 <sup>a</sup>	65,2 ± 4,5 <sup>c</sup>	46,9 ± 10,5 <sup>a</sup>
Sort-PureSperm (Zp.2)	84,9 ± 5,7 <sup>b</sup>	83,9 ± 7,4 <sup>b</sup>	85,9 ± 3,6 <sup>b</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.2)	68,7 ± 6,2 <sup>c</sup>	71,9 ± 4,9 <sup>c</sup>	65,5 ± 5,9 <sup>c</sup>

a:b,c; c:b            P<0,001

Tabelle 57: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=16) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=8) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	56,1 ± 12,3 <sup>a</sup>	65,3 ± 4,5 <sup>a</sup>	46,9 ± 10,5 <sup>a</sup>
Sort-PureSperm (Zp.3)	82,3 ± 6,2 <sup>b</sup>	79,7 ± 6,7 <sup>b</sup>	94,9 ± 2,0 <sup>b</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.3)	72,6 ± 5,6 <sup>c</sup>	71,4 ± 6,1 <sup>d</sup>	93,9 ± 3,0 <sup>b</sup>

a:b,c            P<0,001

b:c            P<0,01

b:d            P<0,05

#### 4.4.1.2 NAR-Spermien

Der Anteil an NAR-Spermien zeigt nach dem Sortieren und vor der Kühlung auf +4°C (Zp.2) keinen Unterschied zwischen der PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe und der Kontrolle. Beide sortierten Gruppen zeigen aber signifikant größere Anteile an NAR-Spermien im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (s. Tabelle 58).

Der Anteil an NAR-Spermien zeigt auch nach dem Auftauen (Zp.3) keinen Unterschied zwischen der PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe und der Kontrolle. Beide sortierten Gruppen zeigen auch zu diesem Zeitpunkt größere Anteile an NAR-Spermien im Vergleich zum Nativsperma zum

Zeitpunkt 1. Für Hengst 1 liegen diese Unterschiede jedoch nicht im signifikanten Bereich (s. Tabelle 59).

Tabelle 58: Anteil [%] an NAR-Spermien nach dem Sortiervorgang und vor der Kühlung auf +4°C (Zp.2) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=16) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=8) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	90,4 ± 3,0 <sup>c</sup>	91,1 ± 3,2 <sup>c</sup>	89,6 ± 2,9 <sup>a</sup>
Sort-PureSperm (Zp.2)	99,2 ± 0,8 <sup>d</sup>	99,4 ± 0,5 <sup>d</sup>	98,9 ± 1,0 <sup>b</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.2)	98,8 ± 0,9 <sup>d</sup>	99,3 ± 0,5 <sup>d</sup>	98,3 ± 1,0 <sup>b</sup>

a:b P<0,001

c:d P<0,05

Tabelle 59: Anteil [%] NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=16) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=8) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	90,4 ± 3,0 <sup>a</sup>	91,1 ± 3,2	89,6 ± 2,9 <sup>c</sup>
Sort-PureSperm (Zp.3)	94,0 ± 2,2 <sup>b</sup>	93,1 ± 2,2	94,9 ± 2,0 <sup>d</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.3)	94,1 ± 2,6 <sup>b</sup>	94,3 ± 2,4	93,9 ± 3,0 <sup>e</sup>

a:b P<0,001

c:d P<0,01

c:e P<0,05

#### 4.4.2 Motilität

Zum Zeitpunkt 2 liegt die Motilität der sortierten Gruppen signifikant unter der Ausgangsmotilität (s. Tabelle 60). Für Hengst 2 ist der Unterschied der PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe (Sort-PureSperm) zur Ausgangsmotilität allerdings nicht signifikant. Bei beiden Hengsten liegt die Motilität der PureSperm<sup>®</sup>-Gruppen über der, der sortierten Kontrollen (Sort-Kontrolle). Für Hengst 2 ist dieser Unterschied signifikant und zeigt eine Differenz der Mittelwerte von über 30% (s. Tabelle 60).

Da der Unterschied der Motilitäten beider Probengruppen (Sort-PureSperm & Sort-Kontrolle), direkt nach Auftauen (Zp.3, 0min) und nach 10 Minuten Inkubation bei +38°C (Zp.3, 10min), bereits hochsignifikant ( $P < 0,001$ ) unter der Ausgangsmotilität (s. Nativ, Zp.1) lagen und die Motilitätswerte mit der Zeit kontinuierlich abnahmen, wurde auf einen weiteren Vergleich zur Ausgangsmotilität ab 30 Minuten nach dem Auftauen verzichtet. Da außerdem nach 180 Minuten Inkubation beide Probengruppen Motilitätswerte von unter 10% aufwiesen, wurde dieser letzte Messzeitpunkt statistisch nicht mehr berücksichtigt (s. Tabelle 63). Tabelle 63 stellt den Verlauf der Motilität vergleichend zwischen den zwei sortierten Gruppen, von 0 bis 150 Minuten nach dem Auftauen zusammenfassend dar.

Direkt nach dem Auftauen (Zp.3, 0min) und auch nach 10 Minuten Inkubation bei +38°C (Zp.3, 10min) liegt die Motilität der sortierten Gruppen (Sort-PureSperm & Sort-Kontrolle) hochsignifikant unter der Ausgangsmotilität (s. Tabelle 61 & Tabelle 62). Hengst 1 zeigt bereits nach 10 Minuten Inkubation fast identische Motilitätswerte der sortierten Probengruppen. Hengst 2 hingegen zeigt bereits direkt nach Auftauen höhere Motilitätswerte für die PureSperm<sup>®</sup>-Probe, welche sich jedoch erst nach 10 Minuten Inkubation signifikant von der sortierten Kontrollprobe unterscheiden (s. Tabelle 62).

In der zusammenfassenden Darstellung der Motilitäten nach dem Auftauen (s. Tabelle 63) zeigt Hengst 2 keinerlei signifikante Unterschiede. Die Motilitätswerte der PureSperm<sup>®</sup>- und der Kontrollgruppe sind über den gesamten Zeitverlauf nahezu identisch. Hengst 1 zeigt bis 90 Minuten nach Auftauen deutlich größere Mittelwerte für die Motilität der PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe, doch ist der Unterschied zur Kontrollgruppe nur 10 Minuten nach Auftauen signifikant.

Tabelle 60: Anteil [%] progressiv motiler Spermien nach dem Sortiervorgang und vor der Kühlung auf +4°C (Zp.2) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=16) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=8) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	79,7 ± 9,6 <sup>a</sup>	85,0 ± 7,1 <sup>a</sup>	74,4 ± 9,0 <sup>a</sup>
Sort-PureSperm (Zp.2)	66,6 ± 9,8 <sup>b</sup>	63,8 ± 11,3 <sup>c</sup>	69,4 ± 7,8 <sup>c</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.2)	45,3 ± 22,9 <sup>b</sup>	54,4 ± 12,1 <sup>d</sup>	36,3 ± 28,1 <sup>d</sup>

a:d P<0,001

a:c; e:d P<0,01

a:b P<0,05

Tabelle 61: Anteil [%] progressiv motiler Spermien direkt nach dem Auftauen (Zp.3, 0min) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=16) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=8) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	79,7 ± 9,6 <sup>a</sup>	85,0 ± 7,1 <sup>a</sup>	74,4 ± 9,0 <sup>a</sup>
Sort-PureSperm (Zp.3, 0min)	39,1 ± 16,0 <sup>b</sup>	36,3 ± 16,9 <sup>b</sup>	41,9 ± 15,8 <sup>b</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.3, 0min)	27,2 ± 19,6 <sup>b</sup>	30,0 ± 22,4 <sup>b</sup>	24,4 ± 17,4 <sup>b</sup>

a:b P<0,001

Tabelle 62: Anteil [%] progressiv motiler Spermien 10 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 10min) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)

	Gesamtwertung (n=16) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=8) $\bar{x} \pm SD$
Nativ (Zp.1)	79,7 ± 9,6 <sup>a</sup>	85,0 ± 7,1 <sup>a</sup>	74,4 ± 9,0 <sup>a</sup>
Sort-PureSperm (Zp.3, 10min)	37,8 ± 14,4 <sup>b</sup>	31,9 ± 16,0 <sup>b</sup>	43,8 ± 10,3 <sup>b</sup>
Sort-Kontrolle (Zp.3, 10min)	28,4 ± 19,0 <sup>b</sup>	31,2 ± 21,5 <sup>b</sup>	25,6 ± 17,2 <sup>c</sup>

a:b,c P<0,001

b:c P<0,05

Tabelle 63: Anteil [%] **progressiv motiler Spermien nach dem Auftauen** (vergleichend zwischen PureSperm<sup>®</sup>-Probe und Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten)

Minuten nach Auftauen	Gesamtwertung		Hengst 1		Hengst 2	
	Sort- PureSperm	Sort- Kontrolle	Sort- PureSperm	Sort- Kontrolle	Sort- PureSperm	Sort- Kontrolle
	(n=16)	(n=16)	(n=8)	(n=8)	(n=8)	(n=8)
	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
0	39,1 ± 16,0	27,2 ± 19,6	36,3 ± 16,9	30,0 ± 22,4	41,9 ± 15,8	24,4 ± 17,4
10	37,8 ± 14,4	28,4 ± 19,0	31,9 ± 16,0	31,3 ± 21,5	43,8 ± 10,3 <sup>a</sup>	25,6 ± 17,2 <sup>b</sup>
30	32,5 ± 14,8	25,0 ± 18,4	26,9 ± 12,5	26,3 ± 18,1	38,1 ± 15,6	23,8 ± 20,0
60	27,2 ± 12,4	22,8 ± 13,4	21,3 ± 8,8	23,1 ± 11,9	33,1 ± 13,1	22,5 ± 15,6
90	20,0 ± 11,3	19,7 ± 12,2	11,9 ± 5,3	20,0 ± 12,5	28,1 ± 9,6	19,4 ± 12,7
120	12,9 ± 8,3	14,1 ± 11,5	8,3 ± 4,3	11,4 ± 9,7	17,5 ± 8,9	16,9 ± 13,1
150	5,4 ± 6,0	8,3 ± 10,1	1,9 ± 2,0	6,1 ± 6,3	8,9 ± 6,8	10,5 ± 12,9

a:b P<0,05

### 4.4.3 Vitalität & Akrosomenintegrität

#### 4.4.3.1 PI positive Spermien

Nach dem Auftauen (Zp.3) ist der Anteil an PI-positiven Spermien in der PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe signifikant geringer, als in der Kontrollgruppe (s. Tabelle 64).

Tabelle 64: Anteil [%] **PI-positiver Spermien nach dem Auftauen (Zp.3)**

	Gesamtwertung (n=16) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=8) $\bar{x} \pm SD$
Sort-PureSperm	68,5 ± 9,0 <sup>a</sup>	66,2	70,8 ± 10,6 <sup>c</sup>
Sort-Kontrolle	76,7 ± 7,2 <sup>b</sup>	72,3	81,8 ± 4,5 <sup>d</sup>

a:b P<0,01

c:d P<0,05

#### 4.4.3.2 PI negative & FITC-PNA negative Spermien

Tabelle 65 zeigt einen signifikant größeren Anteil der PI- und FITC-PNA-negativen Spermien in der PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe für Hengst 2 und in der Gesamtwertung. Der Unterschied ist bei Hengst 1 zwar ebenfalls vorhanden, reicht aber nicht für eine Signifikanz.

Tabelle 65: Anteil [%] PI- & FITC-PNA-negativer Spermien nach dem Auftauen (Zp.3)

	Gesamtwertung (n=16) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=8) $\bar{x} \pm SD$
Sort-PureSperm	31,3 ± 9,0 <sup>a</sup>	33,7 ± 7,0	29,0 ± 10,5 <sup>c</sup>
Sort-Kontrolle	23,1 ± 7,2 <sup>b</sup>	27,6 ± 6,8	18,7 ± 4,5 <sup>d</sup>

a:b P<0,01

c:d P<0,05

#### 4.4.3.3 PI negative & FITC-PNA positive Spermien (Zp.3)

Der Anteil der PI-negativen und FITC-PNA-positiven Spermien zeigt nach dem Auftauen keine signifikanten Unterschiede zwischen der PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe und der Kontrollgruppe (s. Tabelle 66).

Tabelle 66: Anteil [%] PI-negativer & FITC-PNA-positiver Spermien nach dem Auftauen (Zp.3)

	Gesamtwertung (n=16) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 1 (n=8) $\bar{x} \pm SD$	Hengst 2 (n=8) $\bar{x} \pm SD$
Sort-PureSperm	0,18 ± 0,15	0,12 ± 0,05	0,23 ± 0,20
Sort-Kontrolle	0,14 ± 0,07	0,13 ± 0,09	0,15 ± 0,04

## 5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, die Kryokonservierung von geschlechtsspezifisch sortierten Hengstpermien durch Modifikation einzelner Behandlungsschritte und verwendeter Medien zu verbessern und diese durch aktuelle spermatologische Untersuchungsverfahren zu beurteilen. Da sowohl das Sortierverfahren, als auch die Kryokonservierung belastend auf die Spermien wirken, wurden für die Versuche ausschließlich Hengste ausgewählt, die sich in der routinemäßigen, kommerziellen Kryokonservierung als Landbeschäler am Niedersächsischen Landgestüt in Celle bewährt hatten. Durch Vorversuche wurden insgesamt fünf Hengste für die vorliegenden Untersuchungen ausgewählt, die sich neben einer guten Kryokonservierbarkeit zusätzlich durch eine gute Sortierbarkeit auszeichneten.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Versuchsreihen zur Tiefgefrierung geschlechtsspezifisch sortierter Hengstpermien durchgeführt. In den einzelnen Versuchsreihen erfolgte eine Modifikation des Kryokonservierungsverfahrens zum einen durch den Einsatz von Antioxidantien zu den Verdünnermedien, sowie durch Einsatz verschiedener Auffangmedien. Zum anderen wurden verschiedene Temperaturverlaufskurven während der Tiefgefrierung verwendet und ein spezielles Dichtegradientenzentrifugationsverfahren eingesetzt. Als Beurteilungskriterien zur Bestimmung der Spermaqualität im Bezug auf die Befruchtungsfähigkeit, wurden die Spermaparameter Morphologie, Motilität und, je nach Versuchsreihe, Akrosomenintegrität und Vitalität, sowie das Mitochondrienmembranpotential und die Spermienchromatinstrukturintegrität bestimmt.

Die Trächtigkeitsergebnisse aus Besamungen mit geschlechtsspezifisch getrenntem, kryokonserviertem Sperma sind von diversen Faktoren abhängig. Dazu zählen u.a. Samenqualität, die Spermienanzahl pro Besamungsdosis, der Besamungszeitpunkt, der genaue Ort der Samendeponierung im weiblichen Reproduktionstrakt und individuelle Effekte der verwendeten Vatiertiere (KLINC 2005). Der wichtigste Aspekt ist jedoch die Befruchtungsfähigkeit der sortierten Spermien (G. E. SEIDEL et al. 1996; VAZQUEZ et al. 2003). Um die BSST für eine bestimmte Tierart in der Besamung zu etablieren, ist es nötig, die Widerstandsfähigkeit der sortierten Spermien zu erhöhen und somit die Lebensspanne der



Spermien zu erweitern (KLINC 2005). In verschiedenen Studien wurde die schädigende Wirkung radikaler Sauerstoffspezies auf Hengstspermien untersucht (BALL et al. 2001; BAUMBER et al. 2003; ALMEIDA u. BALL 2005). Die Schädigung der Spermien durch radikale Sauerstoffspezies hat eine negative Wirkung auf deren Motilität und führt zu einer Lipidperoxidation der Spermienmembranen (DE LAMIRANDE u. GAGNON 1992; ICHIKAWA et al. 1999). BAUMBER et al. (2003) berichten außerdem von einer erhöhten DNA-Fragmentation der Hengstspermien, sowohl durch die Kryokonservierung als auch durch den Sortierprozess. Nachdem KLINC (2005) Antioxidantien erfolgreich zur Sortierung und Kryokonservierung von Bullenspermien eingesetzt hat und damit die Motilität und Morphologie der Spermien signifikant verbessern konnte, wurden die verwendeten Antioxidantien in den entsprechenden Konzentrationen für diese Arbeit übernommen. Durch Bestimmung von Morphologie, Motilität, Akrosomenintegrität und Vitalität, sowie des Mitochondrienmembranpotentials, als auch der Spermienchromatinstrukturintegrität wurde versucht die Qualität der Spermien anhand diverser Parameter möglichst genau zu bestimmen. Da Hengstspermien jedoch deutlich anfälliger auf schädigende Einflüsse durch die Kryokonservierung und den Sortierprozess reagieren, als Bullenspermien (SQUIRES 2005), war eine Beurteilung der sortierten Spermien im Thermoresistenztest lediglich für 10 Minuten möglich. Dabei zeigten sich zwischen sortierten und nicht sortierten Probengruppen zum Teil signifikante Unterschiede. Es ergab sich mitunter der Fall, dass die sortierten Probengruppen für einen Untersuchungsparameter signifikant besser waren, als die unsortierten und für einen anderen Parameter signifikant schlechter. So hatten die sortierten Spermien nach dem Auftauen hochsignifikant ( $P < 0,001$ ) niedrigere DFI-Werte und einen signifikant ( $P < 0,05$ ) größeren Anteil an Spermien mit normalem akrosomalen Rand als die unsortierten Spermien. Auf der anderen Seite war die Motilität der sortierten Spermien nach dem Auftauen ebenso wie der Anteil vitaler, nicht akrosomenreagerter (PI- & FITC-PNA-negativ) Spermien signifikant ( $P < 0,05$  bzw.  $P < 0,01$ ) niedriger und der Anteil membrangeschädigter (= PI-positiver) Spermien signifikant ( $P < 0,01$ ) höher als bei den unsortierten Spermien. Diese Ergebnisse betonen die Notwendigkeit einer breitgefächerten Analyse verschiedener Spermienparameter zur Bestimmung der Qualität im Bezug auf die Befruchtungsfähigkeit der untersuchten Spermien (COLENBRANDER et al. 2003). Die Überlegenheit der sortierten Spermien bezüglich der DFI-Werte und des akrosomalen Rands scheint ein Resultat der

Selektion auf Vitalität durch den Farbstoff FD#40 während des Sortierprozesses zu sein, da sich die DFI-Werte nach der Inkubation und vor dem Sortierprozess bei keinem der Hengste von den, nicht zur Sortierung vorgesehenen Spermengruppen unterscheiden. Durch diese Selektion der Spermien während des Sortierprozesses werden DNA-Schäden, die während des Sortierprozesses entstehen (BAUMBER et al. 2003), vermutlich mehr als kompensiert. Das heißt, dass wahrscheinlich durch die Selektion wesentlich mehr Spermien mit DNA-Schäden von der Sortierung ausgeschlossen werden, als neue Spermien durch den Sortierprozess DNA-geschädigt werden.

Durch die Zugabe von Antioxidantien bedingte potentielle positive Effekte bezüglich der Spermienmorphologie werden durch die Selektion mittels FD#40 verdeckt, da Spermien mit morphologischen Abweichungen, welche zur ungenügenden Ausrichtung der Spermien zum Zeitpunkt der Fluoreszenzexcitation führen, nicht sortiert werden. Aus diesem Grunde wurde die Morphologie zum Zeitpunkt nach der Inkubation und vor dem Sortierprozess kontrolliert. Ein signifikanter Effekt der Antioxidantien konnte jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass im Gegensatz zu Studien, die den Einsatz von Antioxidantien an frischem (BALL et al. 2001; ALMEIDA u. BALL 2005) oder kryokonserviertem (BAUMBER et al. 2003) Sperma testeten, bei dieser Studie bereits eine Selektion der Hengste vorab geschah und Hengste minderer Spermaqualität von vornherein von dieser Studie ausgeschlossen wurden. Ein signifikanter Unterschied aufgrund der Zugabe von Antioxidantien wurde zwischen den sortierten Spermengruppen nicht gefunden. Vermutlich wirken sich weitere Einflüsse, wie mechanische Kräfte in Verbindung mit der Passage durch den Zellsortierer und der Projektion in die Auffanggefäße, sowie Laserbestrahlung, hohe Verdünnung und Druckdifferenzen derart auf die Spermien aus, dass eine Verminderung des oxidativen Stresses bei den, im Verhältnis zu Bullenspermien durchaus sensiblen Hengstspermien, allein nicht ausreicht, um eine deutliche Verbesserung zu erzielen (MAXWELL u. JOHNSON 1999). Auch BALL et al. (2001) konnten nach Zugabe verschiedener Antioxidantien, wie Vitamin E, Butylhydroxytoluen und Katalase zu frisch gekühlten Hengstspermien keine signifikanten Verbesserungen der Motilität feststellen.

Im Gegensatz zu den sortierten Spermien konnte bei den unsortierten Spermien durch Zusatz von Antioxidantien eine signifikante Verbesserung der Motilität erzielt werden. Allerdings zeigte sich dieser signifikante Unterschied erst im Zeitraum von 90 bis 120 Minuten nach

Auftauen. Da die Motilität der sortierten Proben bereits nach 30 Minuten sehr niedrig war und keine statistische Auswertung zu den Folgezeitpunkten mehr erfolgte, konnte auch ein möglicher zeitverzögerter Effekt der Antioxidantien nicht gefunden werden. Auch in der Studie von KLINC (2005) zeigte sich der positive Effekt der Antioxidantien an sortierten Bullenspermien durch einen signifikant größeren Anteil membranintakter Spermien erst nach 12 Stunden Inkubation. Die positiven Ergebnisse der unsortierten Spermien in dieser Versuchsreihe entsprechen den Ergebnissen von BAUMBER et al (2000; 2003) an frischen Hengstspermien, sowie den Ergebnissen von KLINC (2005) an sortierten Bullenspermien.

BAUMBER et al. (2000) untersuchten die Motilität, die Vitalität, die Akrosomenintegrität, das Mitochondrienmembranpotential und die Lipidperoxidation der Membranen von Hengstspermien nach dreißigminütiger Inkubation mit einem "Xanthin-Xanthinoxidase System" und verschiedenen Antioxidantien, wie Katalase, Superoxid-Dismutase und Glutathion. Lediglich Katalase zeigte signifikant verbesserte Ergebnisse. Diese waren jedoch auf die Motilität beschränkt. Nach BAUMBER et al. (2000) tritt eine durch radikale Sauerstoffspezies verursachte Abnahme der Motilität ohne erkennbare Abnahme der Vitalität, der Akrosomenintegrität, sowie des Mitochondrienmembranpotentials auf. Diese Aussage wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit gestützt. Nach den positiven Ergebnissen im vierten Versuchsteil, wäre eine kombinierte Anwendung der PureSperm<sup>®</sup>-Dichtegradientenzentrifugation und der Antioxidantienzugabe zur Kryokonservierung sortierter Hengstspermien, eine Möglichkeit positive Effekte der Antioxidantien, welche erst im Verlauf der Zeit nach dem Auftauen auftreten, zu beurteilen. Da die protektiven Effekte der Antioxidantien mitunter auch von deren Konzentrationen in den Verdünnermedien abhängen (PENA et al. 2003; ROCA et al. 2004), diese in der vorliegenden Studie jedoch konstant waren, bleibt in nachfolgenden Untersuchungen zu klären, ob durch eine Modifikation der Konzentrationen der Effekt moduliert und gegebenenfalls optimiert werden kann. Da in der vorliegenden Versuchsreihe keine signifikanter Effekt der Antioxidantien auf die sortierten Spermien aufgedeckt werden konnte, ist in weitergehenden Untersuchungen außerdem die Wirkung der verwendeten Antioxidantien bei alleiniger Gabe zu klären. Für frisch inkubierte Hengstspermien gilt bisher lediglich die positive Wirkung von Katalase auf die Motilität frischer Spermien als gesichert (BAUMBER et al. 2000). Der bedeutende Unterschied zum ersten Versuchsteil der vorliegenden Arbeit ist jedoch, dass in den

entsprechenden Untersuchungen der oxidative Stress in vitro durch ein „Xanthin-Xanthinoxidase System“ künstlich erhöht wurde. Eine potentielle Wirkung der Antioxidantien kann sich daher früher zeigen und fällt signifikanter aus, als bei Untersuchungen ohne zusätzlich induzierten oxidativen Stress. Über die antioxidative Wirkung der zwei übrigen Substanzen bei sortierten Hengstspermien, liegen ausserhalb der vorliegenden Arbeit keine weiteren Ergebnisse vor. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um zu klären ob die einzelnen Substanzen für sich ohne antioxidative Wirkung im Bezug auf sortierte Hengstspermien sind, oder ob es Interaktionen zwischen den Substanzen gibt, durch welche ein möglicher positiver Effekt eines Antioxidants neutralisiert wird. So stellten ALMEIDA u. BALL (2005) z.B. fest, dass es bei Zugabe von dl-Alpha-Tocopherolsuccinat zu einer Unterdrückung der Motilität frisch gelagerter Hengstspermien, im Vergleich zur alleinigen Gabe von dl-Alpha-Tocopherol kam.

Auffangmedien sind jene Verdünnermedien, in welchen die sortierten Spermien direkt nach dem Sortierprozess aufgefangen werden. Sie haben für die Dauer eines Sortierprozesses (ca. 45 min) maßgeblichen und nachhaltigen Einfluss auf die Qualität der Spermien. Daher ist diesem Medium, nicht zuletzt aufgrund der sehr großen Verdünnung, die sortierte Spermien in diesem Medium erfahren, besondere Bedeutung zu zumessen. Der Unterschied zu herkömmlichen Verdünnermedien, welche zur Spermaaufbereitung verwendet werden und welche nach und nach dem Sperma zugegeben werden, besteht darin, dass den Auffangmedien hingegen die Spermien einzeln zugegeben werden. Es wird also nicht das Medium dem Sperma zugeben, sondern die Spermien dem Medium. Das bedeutet, dass die ersten Spermien in einem Sortiervorgang in den Auffangmedien in unendlicher Verdünnung vorliegen. Zudem müssen die als Auffangmedien verwendeten Verdünnermedien nicht nur den speziellen Ansprüchen sortierter Spermien generell genügen, sondern sind außerdem speziesspezifisch (MAXWELL et al. 2004). Die bisher zur Sortierung von Hengstspermien verwendeten Auffangmedien, wurden zum einen aus etablierten Sortierprotokollen für Bullenspermien übernommen (BUSS 2005), zum anderen verwendete man Verdünnermedien die sich in der routinemäßigen Verarbeitung von Hengstsperma bewährt hatten (BUCHANAN et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden ein neu entwickelter Fertigverdünner für Hengstsperma (Equi Pro<sup>®</sup> Liquid Culture, Fa. Minitüb, Tiefenbach) und INRA82 ohne Magermilchanteil verwendet. Beiden Medien wurde 10% Seminalplasma

zugesetzt. Es konnten für die Zeit nach dem Auftauen zwar signifikant geringere DFI-Werte der INRA82-Gruppe festgestellt werden, da die Werte beider Gruppen jedoch ohnehin weit unter den DFI-Werten des unsortierten Spermias lagen, ist die Bedeutung wohl eher untergeordnet. Die sehr klare Konsistenz des INRA82-Verdünners bot jedoch den Vorteil, dass das Pellet nach Zentrifugation sehr gut vom Überstand abgegrenzt werden konnte. Bei der ohnehin geringen Anzahl von etwa  $8-9 \times 10^6$  Spermien pro Durchgang kann die Gefahr des Spermienverlusts beim Verwerfen des Überstandes auf diese Weise effizient reduziert werden.

Bereits BUSS (2005) versuchte die Auftauqualität sortierter Hengstspermien, durch Modifikation des Kryokonservierprozesses, zu optimieren. Beim Vergleich zweier Tiefgefriersysteme konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Da sich in der Literatur die Meinungen und Ergebnisse zur Kühlrate im Bereich der Eiskristallbildung unterscheiden (BWANGA et al. 1991; CHECK et al. 1994; MAZUR u. KOSHIMOTO 2002; CHAVEIRO et al. 2006; MORRIS 2006), wurden im zweiten Versuchsteil zwei Tiefgefrierprogramme verglichen, die sich lediglich im Bereich von  $+5^{\circ}\text{C}$  bis  $-6^{\circ}\text{C}$  in ihrer Kühlrate unterschieden. Während zum einen die Meinung besteht, dass die Spermien im Temperaturbereich um die Eiskristallbildung eine gewisse Zeit benötigen um eingeschlossenes Wasser aus dem Intrazellularraum zu entfernen (MAZUR u. KOSHIMOTO 2002), um so Schäden durch intrazelluläre Eiskristallbildung zu minimieren, wird zum anderen die Meinung vertreten, dass gleiches Ziel durch eine sehr hohe Kühlrate und somit kurze Aufenthaltszeit in diesem Temperaturbereich erreicht werden kann (CHECK et al. 1994). Zurzeit sind im Bereich der Kryokonservierung von Hengstspermien einheitliche Gefrierarten für den gesamten Einfrierprozess üblich (VIDAMENT et al. 2000; VIDAMENT 2005). Verschiedene Studien zeigten zwar, dass Gefrierarten im Bereich von 20 bis  $130^{\circ}\text{C}/\text{min}$  zu besseren Auftauergebnissen bei Hengstspermien führen als niedrigere Gefrierarten (DEVIREDDY et al. 2002; VIDAMENT 2005), jedoch erfolgte bisher nur ein Vergleich einheitlicher Raten für den gesamten Einfrierprozess, nicht jedoch ein segmentierter Temperaturverlauf. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein segmentierter Temperaturverlauf zur Kryokonservierung sortierter Hengstspermien eingesetzt. Das Programm, welches anfangs mit einer Rate von  $6^{\circ}\text{C}/\text{min}$  kühlte, zeigte insgesamt bessere Motilitätswerte. Dieser Unterschied war jedoch nur für Hengst 2 deutlich

und signifikant ausgeprägt. Hengst 1 zeigte tendenziell etwas bessere Motilitätswerte für das nicht segmentierte Programm, welches mit 60°C/min durchkühlte. Insgesamt zeigte Hengst 1 für beide Programme bessere Auftaumotilitäten als Hengst 2, welcher jedoch durch die Wahl des entsprechenden Tiefgefrierprogramms mit segmentiertem Temperaturverlauf deutlich verbessert werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit Ergebnissen von BWANGA et al. (1991), dass ein segmentierter Temperaturverlauf mit niedrigerer Gefriertrate im Temperaturbereich um die Eiskristallbildung zu einer Verbesserung der Auftauergebnisse führen kann. Besonders bei Hengsten mit mäßiger Tiefgefrierfähigkeit kann ein derartiges Tiefgefrierprogramm helfen die Auftauergebnisse sortierter Spermien zu verbessern. Weitergehende Untersuchungen mit einer größeren Hengstzahl sind notwendig, um das Befruchtungspotential der auf diese Weise aufbereiteten Proben zu klären.

Gerade im Bezug auf die Verwendung zur geschlechtsspezifischen Sortierung ist eine Separation der qualitativ hochwertigen Spermienpopulation vom übrigen Ejakulat bereits vor dem eigentlichen Sortierprozess von besonderer Bedeutung. Spermien minderer Qualität verringern die Sortiertrate und verschlechtern die Qualität der sortierten Spermienfraktionen, da sie den diversen Noxen während des Sortiervorgangs nicht im gleichen Maße standhalten können. Durch den Ausschluss qualitativ minderwertiger Spermien vor dem Sortierprozess, wird gewährleistet, dass nur die besten Spermien den Sortierprozess durchlaufen. Auf diese Weise kann die Anzahl korrekt orientierter Spermien pro Zeiteinheit erhöht und somit die gewonnene Menge sortierter Spermien optimiert werden. Durch diese Optimierung kann effektiv Zeit bis zur Kryokonservierung eingespart werden, da die erforderlichen Spermienmengen schneller erreicht werden. Herkömmliche Verfahren, wie Verdünnung und Zentrifugation dienen der Aufbereitung des gewonnenen Spermas. Diese Techniken eignen sich jedoch nicht zur Selektion der qualitativ hochwertigsten Spermien eines Ejakulats (SIEME et al. 2003). Zu diesem Zweck kam im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Dichtegradientenzentrifugation bei der Aufbereitung von Hengstsperma zur geschlechtsspezifischen Sortierung zum Einsatz. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Dichtegradientenzentrifugation über einem diskontinuierlichen PureSperm<sup>®</sup>-Gradienten sehr gut zur Selektion progressiv motiler und morphologisch unveränderter Spermien aus einem Ejakulat eignet. Beide Hengste zeigten einen hochsignifikanten Anstieg des Anteils morphologisch unveränderter Spermien im Pellet im Vergleich zur Kontrolle und zum

Nativsperma. Im Vergleich zur Percoll-DGZ (WALTER 1992) zeigte sich bei der PureSperm<sup>®</sup>-DGZ auch bezüglich der progressiven Motilität und der Akrosomenmorphologie eine positive Selektion. Da es sich sowohl bei Percoll als auch bei PureSperm<sup>®</sup> um beschichtete Kieselsäuregelpartikel handelt, sprechen diese Ergebnisse für die Theorie von AVERY u. GREVE (1995), welche die negativen Effekte von Percoll auf frei vorliegendes Polyvinylpyrrolidon (PVP) zurückführen. PVP wird zur Beschichtung der Kieselsäuregelpartikel bei Percoll verwendet, während bei PureSperm<sup>®</sup> Silane zu diesem Zweck verwendet werden. Würden diese negativen Effekte durch die Kieselsäuregelpartikel hervorgerufen (MORTIMER 1994), so wären derartige Effekte auch bei der PureSperm<sup>®</sup>-DGZ zu erwarten. Der Vergleich der Spermienfraktion im Pellet mit der Fraktion in der höherliegenden Phase zeigte für beide Hengste einen Anstieg, sowohl des Anteils morphologisch unveränderter Spermien, als auch des Anteils an Spermien mit normalem akrosomalen Rand und des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien zugunsten des Pellets. Die in diesem Versuchsteil gewonnenen Ergebnisse veranschaulichen die selektive Wirkung der PureSperm<sup>®</sup>-DGZ. Diese selektive Wirkung zeigte sich auch durch den signifikant erhöhten Anteil an Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential im Zentrifugat. Auch wenn beide Hengste für die genannten Parameter gleiche Tendenzen zeigten, so waren die Unterschiede für Hengst 1 wesentlich deutlicher. Bezüglich des Anteils membran-geschädigter, also PI-positiver Spermien zeigte Hengst 1 signifikant bessere Werte im Zentrifugat, verglichen mit der Kontrolle. Bei Hengst 2 war der Anteil PI-positiver Spermien im Zentrifugat größer als in der Kontrolle, wenn auch nicht signifikant. Gleiches zeigte sich für den Anteil vitaler, nicht akrosomenreagierter Spermien. Ob dieser Effekt durch das PureSperm<sup>®</sup>-Medium verursacht wurde, oder lediglich Folge unpassender Zentrifugationszeit und/oder g-Zahl für Hengst 2 ist, muss in weitergehenden Untersuchungen an einer größeren Hengstzahl geklärt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die PureSperm<sup>®</sup>-DGZ im Vergleich zu anderen Separationsmethoden wie das Transmigrationsverfahren ein schnelles und sehr effizientes Verfahren darstellt, um die Population morphologisch unveränderter, progressiv motiler Spermien von den übrigen Spermien, sowie den übrigen Ejakulatbestandteilen zu separieren. Die PureSperm<sup>®</sup>-DGZ bietet im Gegensatz zur Percoll-DGZ zudem den Vorteil, dass die Spermien suspensionen nach Zentrifugation nicht gewaschen werden müssen, um das Medium zu entfernen. Der Grund dafür könnte sein, dass

bei PureSperm<sup>®</sup>, anstelle von PVP, welches bei Percoll zur Beschichtung der Kieselsäuregelpartikel dient, Siliane zur Beschichtung eingesetzt werden.

Der vierte Versuchsteil diente dem Vergleich der PureSperm<sup>®</sup>-DGZ mit der herkömmlichen Zentrifugation bei der Spermaaufbereitung zur geschlechtsspezifischen Sortierung mit anschließender Kryokonservierung. Es konnte gezeigt werden, dass durch Einsatz der PureSperm<sup>®</sup>-DGZ der Anteil morphologisch unveränderter Spermien in den aufgetauten, geschlechtsspezifisch sortierten Samenproben, im Vergleich zur herkömmlichen Methode signifikant gesteigert werden kann. Auch die Motilitätswerte waren nach dem Auftauen im Vergleich zur Kontrolle verbessert, zeigten aber nur zum Teil einen signifikanten Unterschied zur herkömmlichen Methode. Der Anteil PI-positiver Spermien lag nach dem Auftauen für die PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe signifikant unter dem der Kontrolle. Ebenso zeigte die PureSperm<sup>®</sup>-Gruppe eine signifikante Verbesserung im Anteil vitaler, nicht akrosomenreagerter Spermien im Vergleich zur Kontrolle. Durch den Einsatz der PureSperm<sup>®</sup>-DGZ bei der Spermaaufbereitung zur geschlechtsspezifischen Sortierung mit anschließender Kryokonservierung konnte ein deutlicher Qualitätsgewinn der aufgetauten Proben im Bezug auf Morphologie, Motilität, sowie Vitalität und Akrosomenintegrität im Vergleich zur herkömmlichen Methode erreicht werden. Als Nachteile dieser Methode sind der Zeitaufwand bei der Anrichtung der Gradienten, der hohe Materialaufwand zur Erlangung ausreichender Spermienmengen, sowie Spermienverluste von 40-50% und der hohe Preis des PureSperm<sup>®</sup>-Mediums zu nennen. Durch die in dieser Arbeit getesteten Modifikationen konnte die Kryokonservierung sortierter Hengstspermien an einigen Stellen des Prozesses optimiert werden. Ob das Befruchtungspotential der auf diese Weise aufbereiteten Proben ausreicht, um zufriedenstellende Trächtigkeitsraten zu erhalten, ist in nachfolgenden Besamungsversuchen zu klären. Trotz der Optimierung des Verfahrens ist die Ausgangsqualität des Spermias von essentieller Bedeutung für eine erfolgreiche Sortierung und nachfolgende Kryokonservierung der Spermien.



## 6 Zusammenfassung

Peter Heer (2007): Anpassung der Konservierungsprozesse für Hengstsperma an die Beltsville Sperm Sexing Technology

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Kryokonservierungsverfahren für geschlechtsspezifisch sortiertes Hengstsperma durch verschiedene Modifikationen zu verbessern und durch aktuelle spermatologische Untersuchungsverfahren zu beurteilen. Zu diesem Zweck wurden vier Versuchsreihen durchgeführt. Im ersten Versuchsteil wurde der Einsatz verschiedener Antioxidantien bewertet. Der zweite Versuchsteil diente dem Vergleich zweier Auffangmedien und zweier Temperaturverläufe während der Kryokonservierung. Im dritten und vierten Versuchsteil wurde ein neues Dichtegradientenzentrifugationsverfahren getestet und mit der herkömmlichen Zentrifugation verglichen. Die Beurteilung der sortierten Spermien und der jeweiligen Kontrollen erfolgte anhand der Morphologie und der progressiven Motilität. Zudem wurden je nach Versuchsteil verschiedene flowzytometrische Verfahren zur Beurteilung der Vitalität und Akrosomenintegrität, des Mitochondrienmembranpotentials und der Spermienchromatinstrukturintegrität eingesetzt.

Bei den im ersten Versuchsteil verwendeten Antioxidantien (AO) handelte es sich um Natriumpyruvat, Katalase und bovines Serumalbumin (BSA). Diese Substanzen wurden den Inkubationsmedien, den Auffangmedien und den Tiefgefriermedien zugegeben. Die Ejakulate wurde in folgende fünf Gruppen aufgeteilt: (1) sortiert mit AO, (2) sortiert ohne AO, (3) unsortiert mit AO, (4) unsortiert ohne AO, (5) Halteprobe. Im Zeitraum vom Auftauen bis 10 Minuten nach dem Auftauen war zwischen den sortierten Gruppen kein signifikanter Unterschied der progressiven Motilitäten vorhanden. Zwischen 10 und 30 Minuten nach dem Auftauen sank die Motilität der sortierten Gruppen derart stark ab, dass eine Auswertung nur noch für die unsortierten Gruppen erfolgte. Diese zeigten im Zeitraum von 90 bis 120 Minuten nach dem Auftauen signifikant höhere Motilitäten für die Gruppe mit Antioxidantien. Der Anteil PI-positiver Spermien war für die sortierten Gruppen nach dem Auftauen signifikant erhöht im Vergleich zu den unsortierten Gruppen. Der Anteil PI- und FITC-PNA-negativer Spermien, sowie die DFI-Werte waren für die sortierten Gruppen im

Vergleich zu den unsortierten Gruppen signifikant erniedrigt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den sortierten bzw. unsortierten Gruppen war für die flowzytometrischen Parameter jedoch nicht vorhanden.

Im zweiten Versuchsteil wurden zwei unterschiedliche Temperaturverläufe zur Kryokonservierung und zwei verschiedene Auffangmedien miteinander verglichen. Die Temperaturverläufe unterschieden sich lediglich im Bereich von +5°C bis -6°C. Während das erste Tiefgefrierprogramm im Bereich von +5°C bis -6°C mit einer Kühlrate von 6°C/min kühlte und im Bereich von -6°C bis -155°C auf eine Kühlrate von 60°C/min umschaltete, kühlte das zweite Tiefgefrierprogramm über den gesamten Temperaturbereich von -6°C bis -155°C mit einer Kühlrate von 60°C/min. Bei den zwei Auffangmedien handelte es sich zum einen um INRA82-Verdünermedium ohne Magermilchanteil und zum anderen um Equi Pro<sup>®</sup> Liquid Culture-Verdünermedium. Die beiden Hengste zeigten sehr unterschiedliches Verhalten bezüglich des Temperaturverlaufs. Hengst 2 zeigte für das erste Tiefgefrierprogramm signifikant bessere Motilitätswerte im Thermoresistenztest bis zu 150 Minuten nach dem Auftauen, während Hengst 1 kaum einen Unterschied zwischen den Programmen erkennen ließ. Zwischen den Auffangmedien zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Im dritten Versuchsteil erfolgte die Untersuchung der Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) über einem diskontinuierlichen PureSperm<sup>®</sup>-Gradienten zur Eignung bei der Selektion qualitativ hochwertiger Hengstspermien. In diesem Versuchsteil zeigte sich eine signifikant verbesserte Morphologie, sowie signifikant höhere Motilitätswerte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ebenso war das Mitochondrienmembranpotential der Spermien im Zentrifugat im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht.

Im vierten Versuchsteil erfolgte der Einsatz der im dritten Versuchsteil getesteten DGZ bei der Aufbereitung von Hengstspermien zur geschlechtsspezifischen Sortierung mit anschließender Kryokonservierung. Es erfolgte ein Vergleich mit der herkömmlichen Aufbereitungsmethode. Die Proben, welche mittels der PureSperm<sup>®</sup>-DGZ aufbereitet worden waren, zeigten nach dem Auftauen einen signifikant höheren Anteil morphologisch unveränderter Spermien, einen signifikant niedrigeren Anteil membrangeschädigter Spermien, sowie einen signifikant höheren Anteil vitaler, nicht akrosomenreagerter Spermien im Vergleich zu jenen Proben, welche in herkömmlicher Weise aufbereitet worden waren.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch einige der untersuchten Modifikationen am Verfahren zur geschlechtsspezifischen Sortierung von Hengstspermien mit anschließender Kryokonservierung eine Verbesserung der Qualität sortierter und kryokonservierter Hengstspermien erzielt werden. Während zur Zugabe von Antioxidantien und zum segmentierten Temperaturverlauf während der Kryokonservierung weitere Untersuchungen zur genauen Bestimmung des Nutzens dieser Modifikationen erforderlich sind, konnte durch die PureSperm<sup>®</sup>-DGZ ein deutlicher Qualitätsgewinn der sortierten und kryokonservierten Spermien erreicht werden. Durch die Anwendung der PureSperm<sup>®</sup>-DGZ im Verfahren zur geschlechtsspezifischen Sortierung mit anschließender Kryokonservierung kann die Spermienqualität im Vergleich zur herkömmlichen Methode effektiv verbessert werden.

## 7 Summary

Peter Heer (2007): Adjustment of the cryopreservation of stallion spermatozoa to the Beltsville Sperm Sexing Technology

The objective of this study was to improve the cryopreservation for sex sorted stallion spermatozoa through various modifications and to evaluate these by use of current sperm analyzing methods. For this reason four test series were performed. In the first trial the use of three different antioxidants was evaluated. The second trial compared two different freezing programs and two different collection media. In both the third and the last trial a new density gradient centrifugation technique was applied and compared to common centrifugation as a tool in the preparation of stallion spermatozoa for the sex sorting process. Evaluation of sorted spermatozoa and the respective control was performed by examination of classical semen quality parameters such as morphology and progressive motility and by different flow cytometric spermatozoal quality assessments, which included protocols to determine viability and acrosome integrity, mitochondrial membrane potential and sperm chromatin structure integrity.

Applied antioxidative substances (AO) of the first trial were sodium pyruvate, catalase and bovine serum albumin (BSA). These substances were added to the incubation and collection

media and also to the freezing extender. Ejaculates in this trial was divided into five groups: (1) sorted with AO, (2) sorted without AO, (3) not sorted with AO, (4) not sorted without AO, (5) holding sample. Regarding the time between thawing and 10 minutes of subsequent incubation there was no significant difference in progressive motility between both frozen-thawed, sorted groups. However, motility of frozen-thawed, sorted samples decreased tremendously between 10 and 30 minutes of incubation. For this reason, only the frozen-thawed, non-sorted groups were statistically analyzed from 30 until 180 minutes of incubation. Those samples extended and frozen with antioxidants added to their media showed a significantly higher progressive motility between 90 and 120 minutes of incubation compared to those which were frozen without antioxidants. The percentage of membrane damaged spermatozoa was significantly higher and additionally the percentage of viable, non-acrosome reacted spermatozoa significantly lower for sorted, frozen-thawed samples compared to non-sorted, frozen-thawed samples. However, the DNA fragmentation indices (DFI) were significantly lower for sorted, frozen-thawed samples compared to non-sorted frozen-thawed samples. Regarding flow cytometric results of frozen-thawed samples, there were no significant differences between sorted groups on the one hand or between non-sorted groups on the other.

In the second trial, two different freezing programs, which only varied by their cooling rates in the range from +5°C to -6°C, and two different collection media were compared. Whereas the first program cooled with a rate of 6°C/min from +5°C to -6°C and then decreased with a rate of 60°C/min down to -155°C, the second program used a single cooling rate of 60°C/min for the whole temperature range from +5°C to -155°C. Additionally, INRA82 extender without skimmed milk and Equi Pro<sup>®</sup> Liquid Culture extender were compared for their suitability as collection media. Although there was no significant difference between the two collection media, the two stallions used in this trial showed a very different reaction to the applied cooling rates. Whereas stallion 2 showed a significantly better progressive motility tested by a thermo resistance test for up to 150 minutes, for those frozen-thawed samples that were frozen by the first program, stallion 1 did only show very little difference between both programs.

In the third trial an examination of a density gradient centrifugation by the use of a discontinuous PureSperm<sup>®</sup> gradient was performed to validate this technique as a method to

select stallion spermatozoa of high quality from the rest of the ejaculate. Results proved the PureSperm<sup>®</sup> treated samples to have higher percentages of morphologically normal spermatozoa and progressively motile spermatozoa, compared to the untreated control. Additionally, mitochondrial membrane potential was also significantly higher in PureSperm<sup>®</sup> treated samples, compared to the untreated control.

The fourth trial of this study was performed to assess the suitability of the PureSperm<sup>®</sup> density gradient centrifugation technique for improving the preparation of stallion spermatozoa for the sex sorting process with subsequent cryopreservation. The new technique was compared to conventional centrifugation. Frozen-thawed samples prepared by PureSperm<sup>®</sup> density gradient centrifugation showed a significantly higher percentage of morphologically normal spermatozoa and viable, non-acrosome reacted spermatozoa as well as a significantly lower percentage of dead spermatozoa compared to samples that were prepared in the conventional way.

In the present study, some of the evaluated modifications throughout the process of sex sorting of stallion spermatozoa with subsequent cryopreservation resulted in further improvement of the process by benefitting the quality of frozen-thawed, sex-sorted spermatozoa. While antioxidant supplementation and specific segmented cooling rates require further investigation to appoint their specific potential for an improvement of the process, the PureSperm<sup>®</sup> density gradient centrifugation technique resulted into an obvious gain in quality of frozen-thawed, sex sorted spermatozoa. This technique has proven to be applicable for implementation into the process of sex sorting of stallion spermatozoa with subsequent cryopreservation.

## 8 Literaturverzeichnis

AKERLUND, H. E. (1984):

An apparatus for counter-current distribution in a centrifugal acceleration field.  
J Biochem Biophys Methods 9, 133-141

ALAMO, D., M. BATISTA, F. GONZALEZ, N. RODRIGUEZ, G. CRUZ, F. CABRERA u.  
A. GRACIA (2005):

Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of -152 degrees C as a viable  
alternative to liquid nitrogen.  
Theriogenology 63, 72-82

ALLEN, W. R. (2005):

The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding.  
Reprod Domest Anim 40, 310-329

ALMEIDA, J. u. B. A. BALL (2005):

Effect of alpha-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine  
spermatozoa.  
Anim Reprod Sci 87, 321-337

AMANN, R. P. (1989):

Treatment of sperm to predetermine sex.  
Theriogenology 31, 49-60

AMANN, R. P. (1999):

Issues affecting commercialization of sexed sperm.  
Theriogenology 52, 1441-1457

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

Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric  
assessment.  
J Androl 10, 439-448

AVERY, B. u. T. GREVE (1995):

Impact of Percoll(R) on bovine spermatozoa used for in vitro insemination.  
Theriogenology 44, 871-878

BALL, B. A., V. MEDINA, C. G. GRAVANCE u. J. BAUMBER (2001):

Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine  
spermatozoa during storage at 5 degrees C.  
Theriogenology 56, 577-589

- BALLACHEY, B. E., W. D. HOHENBOKEN u. D. EVENSON (1987):  
Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to fertility of bulls.  
Biol Reprod 36, 915-925
- BALLACHEY, B. E., R. G. SAACKE u. D. EVENSON (1988):  
The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate tests of sperm quality and heterospermic performance of bulls.  
J Androl 9, 109-115
- BARKER, C. A. u. J. C. C. GANDIER (1957):  
Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa.  
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 21, 47
- BARLOW, P. u. C. G. VOSA (1970):  
The Y chromosome in human spermatozoa.  
Nature 226, 961-962
- BAUMBER, J., B. A. BALL, C. G. GRAVANCE, V. MEDINA u. M. C. DAVIES-MOREL (2000):  
The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation.  
J Androl 21, 895-902
- BAUMBER, J., B. A. BALL, J. J. LINFOR u. S. A. MEYERS (2003):  
Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa.  
J Androl 24, 621-628
- BEAL, W. E., L. M. WHITE u. D. L. GARNER (1984):  
Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient.  
J Anim Sci 58, 1432-1436
- BECONI, M., C. R. FRANCA, N. MORA u. M. A. AFFRANCHINO (1993):  
Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation.  
Theriogenology 40, 841-851
- BEDFORD, J. M. (1970):  
Sperm capacitation and fertilization in mammals.  
Biol Reprod 2, Suppl 2:128-158
- BEERNINK, F. J., W. P. DMOWSKI u. R. J. ERICSSON (1993):  
Sex preselection through albumin separation of sperm.  
Fertil Steril 59, 382-386

- BENARON, D. A., J. W. GRAY, B. L. GLEDHILL, S. LAKE, A. J. WYROBEK u. I. T. YOUNG (1982):  
Quantification of mammalian sperm morphology by slit-scan flow cytometry.  
Cytometry 2, 344-349
- BILODEAU, J. F., S. BLANCHETTE, N. CORMIER u. M. A. SIRARD (2002):  
Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase.  
Theriogenology 57, 1105-1122
- BLECHER, S. R., R. HOWIE, S. LI, J. DETMAR u. L. M. BLAHUT (1999):  
A new approach to immunological sexing of sperm.  
Theriogenology 52, 1309-1321
- BLOTTNER, S., I. WEGNER, H. ROELANTS u. K. JEWGENOW (1998):  
Durchflusszytometrische Bestimmung des akrosomalen Status von Bullen- und Hengstpermien nach Markierung mit FITC-konjugiertem PNA.  
Tierärztl. Umschau 53, 441-447
- BOCHENEK, M., Z. SMORAG u. J. PILCH (2001):  
Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination.  
Theriogenology 56, 557-567
- BONGSO, A., A. K. JARINA, J. HO, S. C. NG u. S. S. RATNAM (1993):  
Comparative evaluation of three sperm-washing methods to improve sperm concentration and motility in frozen-thawed oligozoospermic and normozoospermic samples.  
Arch Androl 31, 223-230
- BRINSKO, S. u. D. VARNER (1992):  
Artificial insemination and preservation of semen.  
Vet.Clin.North Am.Equine Pract. 8, 205-218
- BUCHANAN, B. R., G. E. SEIDEL, JR., P. M. MCCUE, J. L. SCHENK, L. A. HERICKHOFF u. E. L. SQUIRES (2000):  
Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa.  
Theriogenology 53, 1333-1344
- BUSS, H. (2005):  
Verbesserung der Tiefgefrierfähigkeit geschlechtsspezifisch sortierter Hengstpermien.  
Diss., Tierärztl.Hochschule, Hannover, Germany
- BUTTLER, W. J. u. T. K. ROBERTS (1975):  
Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or cooling.  
J. Reprod. Fertil. 43, 183-187



- BWANGA, C. O., S. EINARSSON u. H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (1991):  
Cryopreservation of boar semen. II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags.  
*Acta Vet Scand* 32, 455-461
- CARTWRIGHT, E. J., P. M. HARRINGTON, A. COWIN u. P. T. SHARPE (1993):  
Separation of bovine X and Y sperm based on surface differences.  
*Mol Reprod Dev* 34, 323-328
- CATT, S. L., D. SAKKAS, D. BIZZARO, P. G. BIANCHI, W. M. MAXWELL u. G. EVANS (1997):  
Hoechst staining and exposure to UV laser during flow cytometric sorting does not affect the frequency of detected endogenous DNA nicks in abnormal and normal human spermatozoa.  
*Mol Hum Reprod* 3, 821-825
- CHAVEIRO, A., L. MACHADO, A. FRIJTERS, B. ENGEL u. H. WOELDERS (2006):  
Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports.  
*Theriogenology* 65, 1875-1890
- CHECK, M. L., D. J. CHECK, J. H. CHECK, R. LONG u. M. PRESS (1994):  
Effect of shortened exposure time to the critical period for ice crystal formation on subsequent post-thaw semen parameters from cryopreserved sperm.  
*Arch Androl* 32, 63-67
- CHENG, F. P., A. FAZELI, W. F. VOORHOUT, A. MARKS, M. M. BEVERS u. B. COLENBRANDER (1996):  
Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa.  
*J Androl* 17, 674-682
- CHRISTANELLI, M. J., E. L. SQUIRES, R. P. AMANN u. B. W. PICKETT (1984):  
Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure.  
*Theriogenology* 22, 39-45
- CHRISTENSEN, P., Z. GUO, K. M. PEDERSEN, I. R. KORSGAARD u. J. JENSEN (2000):  
Use of flow cytometry for routine assessment of semen quality in A.I. stations.  
Proceed. of Congr. about Application of flow cytometry in semen processing centers, Alta, Garnwerd, NL
- CLEMENT, F., M. MAGISTRINI u. M. VIDAMENT (1995):  
Spermiogrammes chez l'étalon normal et dans une population d'étalons infertils.  
*Andrologie* 5, 167-174

- COCHRAN, J. D., R. P. AMANN, E. L. SQUIRES u. B. W. PICKETT (1983):  
Fertility of frozen-thawed stallion semen extended in lactose-EDTA-egg yolk extender and packaged in 1.0 ml straws.  
*Theriogenology* 20, 735-741
- COLENBRANDER, B., B. M. GADELLA u. T. A. STOUT (2003):  
The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility.  
*Reprod Domest Anim* 38, 305-311
- COSSARIZZA, A., M. BACCARANI-CONTRI, G. KALASHNIKOVA u. C. FRANCESCO (1993):  
A new method for the cytofluorimetric 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 Commun* 197, 40-45
- COSSARIZZA, A., D. CECCARELLI u. A. MASINI (1996):  
Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level.  
*Exp. Cell. Res.* 222, 84-94
- CRAN, D. G., L. A. JOHNSON, N. G. MILLER, D. COCHRANE u. C. POLGE (1993):  
Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilisation.  
*Vet Rec* 132, 40-41
- CROCKETT, E. C., J. K. GRAHAM, J. E. BRUEMMER u. E. L. SQUIRES (2001):  
Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results.  
*Theriogenology* 55, 793-803
- DAWSON, G. R., G. W. WEBB, J. A. PRUITT, T. M. LOUGHLIN u. M. J. ARNS (1999):  
Effect of different processing techniques on motility and acrosomal integrity of cold-stored stallion spermatozoa.  
*Proc. ENPS* 77-82
- DE LAMIRANDE, E. u. C. GAGNON (1992):  
Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes.  
*J Androl* 13, 368-378
- DEAN, P. N., D. PINKEL u. M. L. MENDELSON (1978):  
Hydrodynamic orientation of sperm heads for flow cytometry.  
*Biophys J* 23, 7-13

DEVIREDDY, R. V., D. J. SWANLUND, T. OLIN, W. VINCENTE, M. H. TROEDSSON, J. C. BISCHOF u. K. P. ROBERTS (2002):

Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry.

Biol Reprod 66, 222-231

DIGRASSIE, W. A. (2000):

Evaluation of stallion frozen-thawed semen using conventional and flow cytometric assays  
Vet. Med. Diss., Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg

DOWSETT, K. F. u. W. A. PATTIE (1982):

Characteristics and fertility of stallion semen.

J. Reprod. Fertil. Suppl.32, 1-8

DOYLE, S. P., G. E. SEIDEL, J. L. SCHENK, L. A. HERICKHOFF, D. G. CRAN u. R. D. GREEN (1999):

Artificial insemination of lactating Angus cows with sexed semen.

Proc. Western Section Am. Soc. Anim. Sci. 50, 203-205

DURAND, R. E. u. P. L. OLIVE (1982):

Cytotoxicity, Mutagenicity and DNA damage by Hoechst 33342.

J Histochem Cytochem 30, 111-116

ENGELMANN, U., F. KRASSNIGG, H. SCHATZ u. W. B. SCHILL (1988):

Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis.

Gamete Res 19, 151-160

ERICSSON, R. J., C. N. LANGEVIN u. M. NISHINO (1973):

Isolation of fractions rich in human Y sperm.

Nature 246, 421-424

EVENSON, D. (1999):

Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects.

Reproduction, Fertility and Development 11, 1-15

EVENSON, D. u. L. JOST (2000):

Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.

Methods Cell Sci 22, 169-189

EVENSON, D., L. JOST, R. K. BAER, T. W. TURNER u. S. M. SCHRADER (1991):

Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay.

Reprod. Toxicol. 5, 115-125

- EVENSON, D., L. JOST, M. CORZETT u. R. BALHORN (2000a):  
Effect of elevated body temperature on human sperm chromatin structure.  
J Androl 21 (5), 739-746
- EVENSON, D., L. JOST u. D. VARNER (2000b):  
Stallion sperm nuclear protamine - SH status and susceptibility to DNA denaturation are not strongly correlated.  
J Fert Reprod Suppl 52
- EVENSON, D., K. LARSON u. L. JOST (2002):  
Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.  
J Androl 23, 25-43
- EVENSON, D., L. THOMPSON u. L. JOST (1994):  
Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility.  
Theriogenology 41, 637-651
- FISER, P. (1990):  
Interactions of cooling velocity, warming velocity and glycerol concentration on the survival of frozen-thawed boar semen.  
Reprod Domest Anim 1 (Suppl.), 123-137
- FUGGER, E. F., S. H. BLACK, K. KEYVANFAR u. J. D. SCHULMAN (1998):  
Births of normal daughters after MicroSort sperm separation and intrauterine insemination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection.  
Hum Reprod 13, 2367-2370
- GARNER, D. L. (2001):  
Sex-Sorting mammalian sperm: concept to application in animals.  
J Androl 22, 519-526
- GARNER, D. L. (2006):  
Flow cytometric sexing of mammalian sperm.  
Theriogenology 65, 943-957
- GARNER, D. L., B. L. GLEDHILL, D. PINKEL, S. LAKE, D. STEPHENSON, M. A. VAN DILLA u. L. A. JOHNSON (1983):  
Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry.  
Biol Reprod 28, 312-321

- GARNER, D. L. u. L. A. JOHNSON (1995):  
Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide.  
*Biol Reprod* 53, 276-284
- GARNER, D. L., L. A. JOHNSON, S. T. YUE, B. L. ROTH u. R. P. HAUGLAND (1994):  
Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide.  
*J Androl* 15, 620-629
- GARNER, D. L. u. C. A. THOMAS (1999):  
Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm.  
*Mol Reprod Dev* 53, 222-229
- GARNER, D. L., C. A. THOMAS, C. H. ALLEN, P. L. SENGER u. R. G. SASSER (1997a):  
Effect of cryopreservation on bovine sperm viability as determined by dual DNA staining  
*Reprod. Domest. Anim.* 32, 279-283
- GARNER, D. L., C. A. THOMAS, C. G. GRAVANCE, C. E. MARSHALL, J. M. DEJARNETTE u. C. H. ALLEN (2001):  
Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm.  
*Theriogenology* 56, 31-40
- GARNER, D. L., C. A. THOMAS, H. W. JOERG, J. M. DEJARNETTE u. C. E. MARSHALL (1997b):  
Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.  
*Biol Reprod* 57, 1401-1406
- GIL, J., L. LUNDEHEIM, L. SÖDERQUIST u. H. RODRIGUEZ MARTINEZ (2003):  
Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen.  
*Theriogenology* 59, 1241-1255
- GILLAN, L., G. EVANS u. W. M. MAXWELL (2005):  
Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential.  
*Theriogenology* 63, 445-457
- GOOLSBY, H. A., J. R. BLANTON, P. Z. COTTER u. S. D. PRIEN (2004):  
Preliminary trial: motility comparisons of a unique freezing technology (UFT) to liquid nitrogen mist methodology for cryopreservation of porcine spermatozoa.  
*Reprod Domest Anim* 39, 328-332

- GRAHAM, J. K. (1996):  
Cryopreservation of stallion spermatozoa.  
Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 131-147
- GRAVANCE, C. G., D. L. GARNER, J. BAUMBER u. B. A. BALL (2000):  
Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1.  
Theriogenology 53 (9), 1691-1703
- GROSSFELD, R., P. KLINC, B. SIEG u. D. RATH (2005):  
Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique.  
Theriogenology 63, 2269-2277
- GUTHRIE, H. D., L. A. JOHNSON, W. M. GARRETT, G. R. WELCH u. J. R. DOBRINSKY (2002):  
Flow cytometric sperm sorting: effects of varying laser power on embryo development in swine.  
Mol Reprod Dev 61, 87-92
- GUYER, M. F. (1910):  
Accessory chromosomes in man.  
Biological Bulletin of Marine Biology Laboratory, Woods Hole 19, 219-234
- HALAMKA, J., J. W. GRAY, B. L. GLEDHILL, S. LAKE u. A. J. WYROBEK (1984):  
Estimation of the frequency of malformed sperm by slit scan flow cytometry.  
Cytometry 5, 333-338
- HAMMERSTEDT, R. H. u. J. K. GRAHAM (1992):  
Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol.  
Cryobiology 29, 26-38
- HEITLAND, A. V., D. J. JASKO, E. L. SQUIRES, J. K. GRAHAM, B. W. PICKETT u. C. HAMILTON (1996):  
Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa.  
Equine vet. J. 28, 47-53
- HENDRIKSEN, P. J. (1999):  
Do X and Y spermatozoa differ in proteins?  
Theriogenology 52, 1295-1307
- HENRIC-PETRI, U. (1993):  
Beeinflussung der Motilität und Morphologie von Hengstsamen durch drei Verfahren der Spermatozoenselektion zu verschiedenen Zeitpunkten der Lagerung.  
Diss., Tierärztl.Hochschule, Hannover, Germany

- HERRMANN, B. G., B. KOSCHORZ, K. WERTZ, K. J. MCLAUGHLIN u. A. KISPERS (1999):  
A protein kinase encoded by the t complex responder gene causes non-mendelian inheritance.  
Nature 402, 141-146
- HOLLINSHEAD, F. K., L. GILLAN, J. K. O'BRIEN, G. EVANS u. W. M. MAXWELL (2003):  
In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing.  
Reprod Fertil Dev 15, 351-359
- HOLLINSHEAD, F. K., J. K. O'BRIEN, L. HE, W. M. C. MAXWELL u. G. EVANS (2001):  
Pregnancies after insemination of ewes with sorted, cryopreserved ram spermatozoa.  
Proc Soc Reprod Biol 32, 20
- HOPPE, P. C. u. G. C. KOO (1984):  
Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized in vitro.  
J Reprod Immunol 6, 1-9
- HOWES, E. A., N. G. MILLER, C. DOLBY, A. HUTCHINGS, G. W. BUTCHER u. R. JONES (1997):  
A search for sex-specific antigens on bovine spermatozoa using immunological and biochemical techniques to compare the protein profiles of X and Y chromosome-bearing sperm populations separated by fluorescence-activated cell sorting.  
J Reprod Fertil 110, 195-204
- HYNE, R. V., A. STOJANOFF, G. N. CLARKE, A. LOPATA u. W. I. JOHNSTON (1986):  
Pregnancy from in vitro fertilization of human eggs after separation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation.  
Fertil Steril 45, 93-96
- ICHIKAWA, T., T. OEDA, H. OHMORI u. W. B. SCHILL (1999):  
Reactive oxygen species influence the acrosome reaction but not acrosin activity in human spermatozoa.  
Int J Androl 22, 37-42
- IJAZ, A. u. R. DUCHARME (1995):  
Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C.  
Theriogenology 44, 1039-1050
- ISHIJIMA, S. A., M. OKUNO, H. ODAGIRI, T. MOHRI u. H. MOHRI (1992):  
Separation of X- and Y-chromosome-bearing murine sperm by free-flow electrophoresis: evaluation of separation using PCR.  
Zoolog Sci 9, 601-606

- JASKO, D. J., T. V. LITTLE, D. H. LEIN u. R. H. FOOTE (1992):  
Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions.  
*J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200, 979-985
- JASKO, D. J., D. M. MORAN, M. E. FARLIN u. E. L. SQUIRES (1991):  
Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen.  
*Theriogenology* 35, 1059-1067
- JEYENDRAN, R. S., H. H. VAN DER VEN, M. PEREZ-PELAEZ, B. G. GRABO u. L. J. ZANEVELD (1984):  
Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.  
*J. Reprod. Fertil.* 70, 219-225
- JOHNSON, L. A. (1991):  
Sex selection in swine. Altering sex ratios in offspring following surgical insemination with flow sorted X- and Y-bearing sperm.  
*Reprod Domest Anim* 26, 195-204
- JOHNSON, L. A. (2000):  
Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art.  
*Anim Reprod Sci* 60-61, 93-107
- JOHNSON, L. A. u. R. N. CLARKE (1988):  
Flow sorting of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm: activation and pronuclear development of sorted bull, boar, and ram sperm microinjected into hamster oocytes.  
*Gamete Res* 21, 335-343
- JOHNSON, L. A., J. P. FLOOK u. H. W. HAWK (1989):  
Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting.  
*Biol Reprod* 41, 199-203
- JOHNSON, L. A., J. P. FLOOK u. M. V. LOOK (1987a):  
Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342.  
*Gamete Res* 17, 203-212
- JOHNSON, L. A., J. P. FLOOK, M. V. LOOK u. D. PINKEL (1987b):  
Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations.  
*Gamete Res* 16, 1-9



JOHNSON, L. A., H. D. GUTHRIE, P. FISER, W. M. C. MAXWELL, G. R. WELCH u. W. M. GARRETT (2000):

Cryopreservation of flow cytometrically sorted boar sperm: effects on in vivo embryo development.

J. Anim. Sci. 78 (Suppl. 1), 198 (Abstract)

JOHNSON, L. A. u. D. PINKEL (1986):

Modification of a laser-based flow cytometer for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa.

Cytometry 7, 268-273

JOHNSON, L. A., D. RATH, J. M. VAZQUEZ, W. M. MAXWELL u. J. R. DOBRINSKY (2005):

Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application.

Theriogenology 63, 615-624

JOHNSON, L. A., G. R. WELCH u. W. RENS (1999):

The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI.

J Anim Sci 77 Suppl 2, 213-220

KANEKO, S., S. OSHIO, T. KOBAYASHI, R. IIZUKA u. H. MOHRI (1984):

Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content.

Biochem Biophys Res Commun 124, 950-955

KENNEY, R. M., R. V. BERGMAN, W. L. COOPER u. G. W. MORSE (1975):

Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings

Proc. Am Assoc Equine Pract 21, 327-335

KIRK, E. S., E. L. SQUIRES u. J. K. GRAHAM (2005):

Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa.

Theriogenology 64, 1422-1439

KLINC, P. (2005):

Improved Fertility of Flowcytometrically Sex Selected Bull Spermatozoa.

KLINC, P., M. KOSEC u. G. MAJDIC (2005):

Freezability of equine semen after glass beads column separation.

Equine Vet J 37, 43-47

KLOPPE, L. H., D. VARNER, R. G. ELMORE, K. N. BRETZLAFF u. J. W. SHULL (1988):  
Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa.

Theriogenology 29, 429-440

KLUG, E. u. H. SIEME (2003):  
Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis.  
Verlag M.&H. Schaper, Alfeld

KNOP, K., N. HOFFMANN, D. RATH u. H. SIEME (2005):  
Effects of cushioned centrifugation technique on sperm recovery and sperm quality in stallions with good and poor semen freezability.  
Anim Reprod Sci 89, 294-297

KRIENKE, M. (2003):  
Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstsperma.  
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany

KRÖGER, B. (1991):  
Das Swim-up-Verfahren als Beurteilungskriterium für Hengstsamen.  
Diss., Tierärztl.Hochschule, Hannover, Germany

LARSON, K., C. DEJONGE, A. BARNES, L. JOST u. D. EVENSON (2000):  
Relationship between assisted reproductive techniques (ART) outcome and status of chromatin integrity as measured by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA).  
Hum Reprod 15 (8), 1717-1722

LE LANNOU, D. u. Y. BLANCHARD (1988):  
Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure.  
J. Reprod. Fertil. 84, 551-556

LEHNINGER, A. L., D. L. NELSON u. M. M. COX (1994):  
Oxidative Phosphorylierung und Photophosphorylierung.  
In: LEHNINGER, A.L., D.L. NELSON und M.M. COX: Prinzipien der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 644-647

LEVINSON, G., K. KEYVANFAR, J. C. WU, E. F. FUGGER, R. A. FIELDS, G. L. HARTON, F. T. PALMER, M. E. SISSON, K. M. STARR, L. DENNISON-LAGOS u. ET AL. (1995):  
DNA-based X-enriched sperm separation as an adjunct to preimplantation genetic testing for the prevention of X-linked disease.  
Hum Reprod 10, 979-982

- LINDSEY, A. C., J. E. BRUEMMER u. E. L. SQUIRES (2001):  
Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm.  
*Anim Reprod Sci* 68, 279-289
- LINDSEY, A. C., L. H. MORRIS, W. R. ALLEN, J. L. SCHENK, E. L. SQUIRES u. J. E. BRUEMMER (2002a):  
Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa.  
*Equine Vet J* 34, 128-132
- LINDSEY, A. C., J. L. SCHENK, J. K. GRAHAM, J. E. BRUEMMER u. E. L. SQUIRES (2002b):  
Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa.  
*Equine Vet J* 34, 121-127
- LOVE, C. u. R. M. KENNEY (1994):  
Relationship of sperm chromatin to fertility in the stallion.  
Proceedings of the 40th Annual Convention AAEP 21-22
- LOVE, C. C., J. A. THOMPSON, S. P. BRINSKO, S. L. RIGBY, T. L. BLANCHARD, V. K. LOWRY u. D. D. VARNER (2003):  
Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry.  
*Theriogenology* 60, 1127-1138
- MADRID-BURY, N., J. F. PEREZ-GUTIERREZ, S. PEREZ-GARNELO, P. MOREIRA, B. PINTADO SANJUANBENITO, A. GUTIERREZ-ADAN u. J. DE LA FUENTE MARTINEZ (2005):  
Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa.  
*Theriogenology* 64, 232-241
- MAKLER, A., O. MURILLO, G. HUSZAR, B. TARLATZIS, A. DECHERNEY u. F. NAFTOLIN (1984):  
Improved techniques for separating motile spermatozoa from human semen. II. An atraumatic centrifugation method.  
*Int J Androl* 7, 71-78
- MARTINSSON, G. (1995):  
Morphofunktionelle und volumetrische Charakterisierung von unterschiedlich aufbereitetem Hengstperma.  
Diss., Tierärztl.Hochschule, Hannover, Germany

- MAXWELL, W. M., G. EVANS, F. K. HOLLINSHEAD, R. BATHGATE, S. P. DE GRAAF, B. M. ERIKSSON, L. GILLAN, K. M. MORTON u. J. K. O'BRIEN (2004):  
Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox.  
Anim Reprod Sci 82-83, 79-95
- MAXWELL, W. M., G. EVANS, S. T. MORTIMER, L. GILLAN, E. S. GELLATLY u. C. A. MCPHIE (1999):  
Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma.  
Reprod Fertil Dev 11, 123-126
- MAXWELL, W. M. u. L. A. JOHNSON (1999):  
Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma.  
Theriogenology 52, 1353-1362
- MAXWELL, W. M., C. R. LONG, L. A. JOHNSON, J. R. DOBRINSKY u. G. R. WELCH (1998):  
The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma.  
Reprod Fertil Dev 10, 433-440
- MAXWELL, W. M. u. T. STOJANOV (1996):  
Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants.  
Reprod. Fertil. Dev. 8, 1013-1020
- 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 Fertil Dev 8, 1165-1178
- MAZUR, P. (1980):  
Fundamental aspects of the freezing of cells, with the emphasis on mammalian ova and embryos.  
Proc.9th Int.Congr.on Anim.Reprod.and A.I., Madrid 431-434
- MAZUR, P. (1985):  
Basic concepts in freezing cells.  
Proceedings of 1st Int.Conf.on Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala
- MAZUR, P. u. C. KOSHIMOTO (2002):  
Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates?  
Biol Reprod 66, 1485-1490

- MERKIES, K., T. CHENIER, C. PLANTE u. M. M. BUHR (2000):  
Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis.  
*Theriogenology* 54, 1215-1224
- MORRELL, J. M. u. D. W. DRESSER (1989):  
Offspring from inseminations with mammalian sperm stained with Hoechst 33342, either with or without flow cytometry.  
*Mutat Res* 224, 177-183
- MORRELL, J. M., K. D. KEELER, D. E. NOAKES, N. M. MACKENZIE u. D. W. DRESSER (1988):  
Sexing of sperm by flow cytometry.  
*Vet Rec* 122, 322-324
- MORRIS, G. J. (2006):  
Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation.  
*Hum Reprod* 21, 2075-2083
- MORTIMER, D. (1994):  
Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity.  
*Reprod Fertil Dev* 6, 25-31
- MORTIMER, D. (2000):  
Sperm separation methods.  
*J Androl* 21, 357-366
- NEILD, D. M., B. M. GADELLA, M. G. CHAVES, M. H. MIRAGAYA, B. COLENBRANDER u. A. AGUERO (2003):  
Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation.  
*Theriogenology* 59, 1693-1705
- OETTLE, E. E. u. K. WISWEDEL (1989):  
Changes in sperm motility, morphology and concentration induced by the swim-up procedure.  
*S Afr Med J* 75, 22-23
- OLLERO, M., R. PEREZ-PE, I. GARGALLO, S. MORLANES, J. OSADA, T. MUINO-BLANCO u. J. A. CEBRIAN-PEREZ (2000):  
Separation of ram spermatozoa bearing X and Y chromosome by centrifugal countercurrent distribution in an aqueous two-phase system.  
*J Androl* 21, 921-928

OTTO, F. J., U. HACKER, J. ZANTE, J. SCHUMANN, W. GOHDE u. M. L. MEISTRICH (1979):

Flow cytometry of human spermatozoa.

Histochemistry 61, 249-254

PALMER, E. u. M. MAGISTRINI (1992):

Automated analysis of stallion semen post-thaw.

Acta vet. scand. Suppl.88, 137

PAQUIGNON, M. (1985):

Freezing and thawing extenders for boar spermatozoa.

Proceedings of 1st Int.Conf.on Deep Freezing of Boar Semen 129-145

PARKS, J. E. u. J. K. GRAHAM (1992):

Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes.

Theriogenology 38, 209-222

PARRILLA, I., J. M. VAZQUEZ, C. CUELLO, M. A. GIL, J. ROCA, D. DI BERARDINO u. E. A. MARTINEZ (2004):

Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa.

Reproduction 128, 615-621

PASCUAL, M. L., T. MUINO-BLANCO, J. A. CEBRIAN-PEREZ u. M. J. LOPEZ-PEREZ (1992):

Management of sedimentation in centrifugal counter-current distribution of sperm cells in an aqueous 2-phase system.

J Biochem Biophys Methods 24, 275-284

PENA, F. J., A. JOHANNISSON, M. WALLGREN u. H. RODRIGUEZ MARTINEZ (2003):

Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate.

Anim Reprod Sci 78, 85-98

PICKETT, B. W., J. J. SULLIVAN, W. W. BYERS, M. M. PACE u. E. E. REMMENGA (1975):

Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa.

Fertil Steril 26, 167-174

PINKEL, D., S. LAKE, B. L. GLEDHILL, M. A. VAN DILLA, D. STEPHENSON u. G. WATCHMAKER (1982):

High resolution DNA content measurements of mammalian sperm.

Cytometry 3, 1-9

POTTS, R. J., C. J. NEWBURY, G. SMITH, L. J. NOTARIANNI u. T. M. JEFFERIES (1999):

Sperm chromatin damage associated with male smoking.  
Mutat Res 423

PROBST, S. u. D. RATH (2003):

Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes.  
Theriogenology 59, 961-973

PURSEL, V. G. u. C. S. PARKS (1985):

Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa.  
Proceedings of 1st Int.Conf.on Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala 1985 147-166

QUINN, P. J., P. Y. W. CHOW u. L. G. WHITE (1980):

Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa for cold shock at a plasma membranes site.  
J. Reprod. Fertil. 60, 403-407

RATH, D., C. R. LONG, J. R. DOBRINSKY, G. R. WELCH, L. L. SCHREIER u. L. A. JOHNSON (1999):

In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer.  
J Anim Sci 77, 3346-3352

RATH, D. u. H. NIEMANN (1997):

In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars.  
Theriogenology 47, 785-793

RATH, D., S. RUIZ u. B. SIEG (2003a):

Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen.  
Vet Rec 152, 400-401

RATH, D., B. SIEG, J. LEIGH, P. KLINC, M. BESSELING u. C. KRÜGER (2003b):

Current perspectives of sperm sorting in domestic farm animals.  
Proceedings of the 19th Meeting of the Assoc. Europeenne de Transfert Embryonnaire 125-128

RATH, D. u. H. SIEME (2003):

Sexing of Stallion Semen.  
Pferdeheilkd. 19 (6), 675-676

- RATHI, R., B. COLENBRANDER, M. M. BEVERS u. B. M. GADELLA (2001):  
Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa.  
Biol Reprod 65, 462-470
- REERS, M., T. W. SMITH u. L. B. CHEN (1991):  
J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential.  
Biochem. 30, 4480-4486
- RENS, W., G. R. WELCH, D. W. HOUCK, C. H. VAN OVEN u. L. A. JOHNSON (1996):  
Slit-scan flow cytometry for consistent high resolution DNA analysis of X- and Y-chromosome bearing sperm.  
Cytometry 25, 191-199
- RENS, W., G. R. WELCH u. L. A. JOHNSON (1998):  
A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X and Y chromosome-bearing sperm.  
Cytometry 33, 476-481
- ROCA, J., M. A. GIL, M. HERNANDEZ, I. PARRILLA, J. M. VAZQUEZ u. E. A. MARTINEZ (2004):  
Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene.  
J Androl 25, 397-405
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., B. LARSSON u. H. PERTOFT (1997):  
Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up.  
Reprod Fertil Dev 9, 297-308
- SCHEMBRI, M. A., D. A. MAJOR, J. J. SUTTIE, W. M. MAXWELL u. G. EVANS (2002):  
Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process.  
Reprod Fertil Dev 14, 225-233
- SCHENK, J. L. u. D. L. DEGROFFT (2003):  
Insemination of cow elk with sexed frozen semen.  
Theriogenology 59, 514 (abstract)
- SCHENK, J. L., T. K. SUH, D. G. CRAN u. G. E. SEIDEL, JR. (1999):  
Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa.  
Theriogenology 52, 1375-1391



- SCHMID, R. L., H. KATO, L. HERICKHOFF, J. L. SCHENK, P. M. MCCUE, Y. G. CHUNG u. E. L. SQUIRES (2000):  
Effects of follicular fluid or progesterone on in vitro maturation of equine oocytes before intracytoplasmic sperm injection with non-sorted and sex-sorted spermatozoa.  
J Reprod Fertil 56, 519-525
- SCHNORR, B. (1996):  
Embryologie der Haustiere.  
Enke Verlag, Stuttgart 35
- SEIDEL, G. E., L. A. JOHNSON, C. A. ALLEN, G. R. WELCH, M. D. HOLLAND, Z. BRINK u. M. B. CATTELL (1996):  
Artificial insemination with X- and Y-bearing bovine sperm.  
Theriogenology 45, 309
- SEIDEL, G. E., JR. u. D. L. GARNER (2002):  
Current status of sexing mammalian spermatozoa.  
Reproduction 124, 733-743
- SEIDEL, G. E., JR., J. L. SCHENK, L. A. HERICKHOFF, S. P. DOYLE, Z. BRINK, R. D. GREEN u. D. G. CRAN (1999):  
Insemination of heifers with sexed sperm.  
Theriogenology 52, 1407-1420
- SELEVAN, S. G., L. BORKOVEC, V. L. SLOTT, Z. ZUDOVA, J. RUBES, D. EVENSON u. S. D. PERREAULT (2000):  
Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution.  
(submitted)
- SIEME, H., T. CORDES, E. KLUG u. H. O. HOPPEN (2001):  
Relationship between sexual hormones, seminal characteristics and fertility in stallions.  
Proceedings of 3rd Int.Symposium on Stallion Reprod., Colorado State University, Fort Collins, Co, USA
- SIEME, H., E. KLUG u. H. BADER (1997):  
[Separation techniques to achieve vital and reproduction competent equine spermatozoa populations--a survey].  
Dtsch Tierarztl Wochenschr 104, 298-302
- SIEME, H., G. MARTINSSON, H. RAUTERBERG, K. WALTER, C. AURICH, R. PETZOLDT u. E. KLUG (2003):  
Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen.  
Reprod Domest Anim 38, 134-140

- SPANO, M., A. H. KOLSTAD, S. B. LARSEN, E. CORDELLI, G. LETER, A. GIWERCMAN u. J. P. BONDE (1998):  
The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies.  
Hum Reprod 13 (9), 2495-2505
- SQUIRES, E. L. (2005):  
Integration of future biotechnologies into the equine industry.  
Anim Reprod Sci 89, 187-198
- SQUIRES, E. L., S. L. KEITH u. J. K. GRAHAM (2004):  
Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa.  
Theriogenology 62, 1056-1065
- SUH, T. K., J. L. SCHENK u. G. E. SEIDEL, JR. (2005):  
High pressure flow cytometric sorting damages sperm.  
Theriogenology 64, 1035-1048
- THOMAS, C. A., D. L. GARNER, C. A. BURNER, P. L. SENGER, M. S. JOHNSON, R. G. SASSER u. C. H. ALLEN (1996):  
Fluorescent viability staining and the fertility of cryopreserved bovine sperm.  
Proceedings of 13th Int. Congr. Anim. Reprod., Sydney, Australia 22-24
- THOMAS, C. A., D. L. GARNER, J. M. DEJARNETTE u. C. E. MARSHALL (1997):  
Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa.  
Biol Reprod 56, 991-998
- THORMÄHLEN (1973):  
Dichtegradientenzentrifugation von Samenzellen und Beeinflussung des Geschlechtes von Nachkommen des Kanninchens.  
Tierärztliche Hochschule, Hannover Diss.
- THURSTON, L. M., W. V. HOLT u. P. F. WATSON (2003):  
Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison.  
Theriogenology 60, 101-113
- TUBMAN, L. M., Z. BRINK, T. K. SUH u. G. E. SEIDEL, JR. (2004):  
Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting.  
J Anim Sci 82, 1029-1036
- VAN MUNSTER, E. B. (2002):  
Interferometry in flow to sort unstained X- and Y-chromosome-bearing bull spermatozoa.  
Cytometry 47, 192-199

- VAN MUNSTER, E. B., J. STAP, R. A. HOEBE, G. J. TE MEERMAN u. J. A. ATEN (1999a):  
Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: potentials and limitations.  
Theriogenology 52, 1281-1293
- VAN MUNSTER, E. B., J. STAP, R. A. HOEBE, G. J. TE MEERMAN u. J. A. ATEN (1999b):  
Difference in volume of X- and Y-chromosome-bearing bovine sperm heads matches difference in DNA content.  
Cytometry 35, 125-128
- VAZQUEZ, J. M., E. A. MARTINEZ, I. PARRILLA, J. ROCA, M. A. GIL u. J. L. VAZQUEZ (2003):  
Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa.  
Theriogenology 59, 1605-1614
- VIDAMENT, M. (2005):  
French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen.  
Anim Reprod Sci 89, 115-136
- VIDAMENT, M., P. ECOT, P. NOUE, C. BOURGEOIS, M. MAGISTRINI u. E. PALMER (2000):  
Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa.  
Theriogenology 54, 907-919
- VOSS, J. L., B. W. PICKETT u. E. L. SQUIRES (1981):  
Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility.  
J. Am. Vet. Med. Assoc. 178, 287-289
- 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
- WALTER, K. (1992):  
Einfluss verschiedener Verfahren zur Spermatozoenselektion auf Motilität, Vitalität und Morphologie von Hengstspemien sowie deren diagnostische Bedeutung.  
Diss., Tierärztl.Hochschule, Hannover, Germany
- WATSON, P. F. (2000):  
The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.  
Anim Reprod Sci 60-61, 481-492

WEITZE, K. F. (2001):

Assistierte Techniken: Prinzipien der Verdünnung und Konservierung.

Veterinärmedizinische Andrologie, Verlag Schattauer, Stuttgart 511-517

WILHELM, K. M., J. K. GRAHAM u. 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

## 9 Anhang

### 9.1 Stallion Sheath Fluid

Inhaltsstoffe	Einheit	
Aqua bidest.	[l]	1
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	[g]	0,14
KCl	[g]	0,37
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	[g]	0,1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	[g]	0,03
NaCl	[g]	6,54
Na-Pyruvat	[g]	0,02
Lactic acid (60%)	[ml]	3,51
HEPES	[g]	2,38
NaHCO <sub>3</sub>	[g]	0,42
Penicillin G	[g]	0,058
Streptomycin Sulfat	[g]	0,05

pH 7,2

## 9.2 INRA 82

Inhaltstoffe	Einheit	Menge
INRA 82 = Französischer Verdünner:		
Aqua bidest.	[l]	1
Glucose	[g]	50
Lactose-Monohydrat	[g]	3
Raffinose x 5H <sub>2</sub> O	[g]	3
Na Citrat x 2 H <sub>2</sub> O	[g]	0,5
K Citrat x H <sub>2</sub> O	[g]	0,82
HEPES	[g]	9,52
Penicillin	[g]	1
Gentamycin	[g]	1
Magermilch (0,3% Fett)	[l]	1
Für den TG-Verdünner:		
INRA 82	[ml]	935
Eidotter *	[ml]	40
Glycerin		2,5 % bzw. 5 % ≅ 25 ml bzw. 50 ml

\* Eidotter und Aqua bidest. 1:1 verdünnen und 10 min. bei 15.000\*g zentrifugieren. Daraus den Überstand verwenden.

\* Zur Verwendung als Auffangmedium wurde keine Magermilch zugesetzt. Es erfolgte in dem Falle allerdings eine Zugabe von 10% Seminalplasma.

## 9.3 Hancock-Lösung

### Verwendete Medien:

1. 2,9g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat mit Aqua bidest auf 100ml auffüllen
2. 37%iges Formaldehyd

### Herstellung:

96 Teile von 1. und 4 Teile von 2. vermischen

## 9.4 Tyrode-Medium

Inhaltstoffe	Einheit	Menge
NaCl	[g]	0,5844
KCl	[g]	0,0231
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	[g]	0,0294
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	[g]	0,0081
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	[g]	0,0061
NaHCO <sub>3</sub>	[g]	0,2100
Na-Lactat (Sirup)	[g]	0,2421
Na-Pyruvat	[g]	0,0110
Hepes	[g]	0,2383
Heparin	[g]	0,0010
Gentamycin-Sulfat	[g]	0,0050
BSA	[g]	0,6000
Ad 100 ml Aqua bidest.		
pH auf 7,4 einstellen		

## 9.5 KMT

Inhaltstoffe	Einheit	Menge
--------------	---------	-------

---

### Modified Tyrode for KMT

NaCl	[g]	4,200
KCl	[g]	1,870
NaHCO <sub>3</sub>	[g]	2,100
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	[g]	0,050
Lactic acid (60%)	[ml]	3,10
CaCl <sub>2</sub>	[g]	0,290
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	[g]	0,170
Hepes	[g]	2,380
Na-Pyruvat	[g]	0,110

Ad 1 l Aqua bidest.

pH 6,9

Sterilfiltration

---

### EZ Mixin

Glucose	[g]	49,00
Fettfreies	[g]	24,00

Trockenmilchpulver

Ad 1 l Aqua bidest.

---

### KMT-Verdüner:

65% EZ Mixin

35% modified Tyrode for KMT

Penicillin 0,050 g/l

Streptomycin 0,058 g/l



## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Funktionsprinzips eines Flowzytometers zum Sortieren von Hengstpermien -----	19
Abbildung 2: Punktwolkendiagramm nach KRIENKE (2003) -----	49
Abbildung 3: Punktwolkendiagramm nach KRIENKE (2003) -----	50
Abbildung 4: Ablaufdiagramm, Versuchsteil I-----	59
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Temperaturverlaufs der Einfrierprogramme ----	61
Abbildung 6: Ablaufdiagramm, Versuchsteil II-----	62
Abbildung 7: Ablaufdiagramm, Versuchsteil III-----	64
Abbildung 8: Ablaufdiagramm, Versuchsteil IV -----	66

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mindestanforderungen an Hengstperma (modifiziert nach den Richtlinien des Instituts für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover).....	44
Tabelle 2: Auswertungsschema zur Erfassung morphologischer Veränderungen.....	46
Tabelle 3: Anlegen einer Reihe von Konzentrationen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 .....	53
Tabelle 4: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach 1,5 Stunden Inkubation (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Gesamtwertung) .....	69
Tabelle 5: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach 1,5 Stunden Inkubation (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Hengste einzeln) .....	70
Tabelle 6: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Gesamtwertung) .....	70
Tabelle 7: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Hengste einzeln).....	70

Tabelle 8: Anteil [%] an NAR-Spermien nach 1,5 Stunden Inkubation (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Gesamtwertung) .....	71
Tabelle 9: Anteil [%] an NAR-Spermien nach 1,5 Stunden Inkubation (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Hengste einzeln) .....	72
Tabelle 10: Anteil [%] an NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Gesamtwertung) .....	72
Tabelle 11: Anteil [%] an NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 (Hengste einzeln) .....	72
Tabelle 12: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien zum Zeitpunkt 2 (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 .....	73
Tabelle 13: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien direkt nach dem Auftauen (Zp.3, 0min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 .....	74
Tabelle 14: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 10 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 10min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 .....	74
Tabelle 15: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 30 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 30min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 .....	75
Tabelle 16: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 60 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 60min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 .....	76
Tabelle 17: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 90 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 90min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 .....	76
Tabelle 18: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 120 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 120min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 .....	77
Tabelle 19: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 150 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 150min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 .....	78
Tabelle 20: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien 180 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 180min) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 .....	78
Tabelle 21: Anteil [%] PI positiver Spermien zum Zeitpunkt 2 .....	79
Tabelle 22: Anteil [%] PI positiver Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) .....	80
Tabelle 23: Anteil [%] PI negativer und FITC-PNA negativer Spermien zum Zeitpunkt 2 ....	81

Tabelle 24: Anteil [%] PI negativer und FITC-PNA negativer Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) .....	81
Tabelle 25: Anteil [%] PI negativer und FITC-PNA positiver Spermien zum Zeitpunkt 2.....	82
Tabelle 26: Anteil [%] PI negativer und FITC-PNA positiver Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) .....	82
Tabelle 27: Anteil [%] an Spermien mit hohem MMP zum Zeitpunkt 2 .....	83
Tabelle 28: Anteil [%] an Spermien mit hohem MMP nach dem Auftauen (Zp.3).....	84
Tabelle 29: DFI-Werte zum Zeitpunkt 2 .....	84
Tabelle 30: DFI-Werte nach dem Auftauen (Zp.3).....	85
Tabelle 31: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien zum Zeitpunkt 2 (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1).....	86
Tabelle 32: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Auffangmedien .....	87
Tabelle 33: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Einfrierprogrammen.....	87
Tabelle 34: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen .....	87
Tabelle 35: Anteil [%] NAR-Spermien zum Zeitpunkt 2 im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 .....	88
Tabelle 36: Anteil [%] NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Auffangmedien.....	88
Tabelle 37: Anteil [%] NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Einfrierprogrammen .....	88
Tabelle 38: Anteil [%] NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen.....	89
Tabelle 39: Anteil [%] der progressiv motilen Spermien zum Zeitpunkt 2 (Zp.2) im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1 .....	89
Tabelle 40: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardfehler (SEM) der Anteile [%] progressiv motiler Spermien im Zeitverlauf nach dem Auftauen, vergleichend zwischen den Auffangmedien ...	94

Tabelle 41: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardfehler (SEM) der Anteile [%] progressiv motiler Spermien im Zeitverlauf nach dem Auftauen, vergleichend zwischen den Einfrierprogrammen .....	94
Tabelle 42: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) der Anteile [%] progressiv motiler Spermien im Zeitverlauf nach dem Auftauen, vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen (Gesamtwertung) .....	95
Tabelle 43: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) der Anteile [%] progressiv motiler Spermien im Zeitverlauf nach dem Auftauen, vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen (Hengst 1) .....	95
Tabelle 44: Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichungen (SD) der Anteile [%] progressiv motiler Spermien im Zeitverlauf nach dem Auftauen, vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen (Hengst 2) .....	96
Tabelle 45: DFI-Werte zum Zeitpunkt 2 (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1) ..	97
Tabelle 46: DFI-Werte nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Auffangmedien .....	97
Tabelle 47: DFI-Werte nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den Einfrierprogrammen .....	97
Tabelle 48: DFI-Werte nach dem Auftauen (Zp.3), vergleichend zwischen den einzelnen Gruppen ( & zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1) .....	98
Tabelle 49: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach der Dichtgradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle) und zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1) .....	99
Tabelle 50: Anteil [%] NAR-Spermien nach der Dichtgradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle) und zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1) ....	100
Tabelle 51: Anteil [%] progressiv motiler Spermien nach der Dichtgradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle) und zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1) .....	100
Tabelle 52: Anteil [%] PI-positiver Spermien nach der Dichtgradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle)) .....	101
Tabelle 53: Anteil [%] PI negativer und FITC-PNA negativer Spermien nach der Dichtgradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle)) ..	102
Tabelle 54: Anteil [%] PI-negativer & FITC-PNA-positiver Spermien nach der Dichtgradientenzentrifugation (Zp.2) im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle) ..	102

Tabelle 55: Anteil [%] an Spermien mit hohem MMP nach der Dichtegradientenzentrifugation (Zp.2) (im Vergleich zur Kontrollprobe (KMT-Kontrolle))	103
Tabelle 56: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Sortiervorgang und vor der Kühlung auf +4°C (Zp.2) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)	104
Tabelle 57: Anteil [%] morphologisch unveränderter Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)	104
Tabelle 58: Anteil [%] an NAR-Spermien nach dem Sortiervorgang und vor der Kühlung auf +4°C (Zp.2) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)	105
Tabelle 59: Anteil [%] NAR-Spermien nach dem Auftauen (Zp.3) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)	105
Tabelle 60: Anteil [%] progressiv motiler Spermien nach dem Sortiervorgang und vor der Kühlung auf +4°C (Zp.2) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)	107
Tabelle 61: Anteil [%] progressiv motiler Spermien direkt nach dem Auftauen (Zp.3, 0min) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)	107
Tabelle 62: Anteil [%] progressiv motiler Spermien 10 Minuten nach dem Auftauen (Zp.3, 10min) (im Vergleich zum Nativsperma zum Zeitpunkt 1)	107
Tabelle 63: Anteil [%] progressiv motiler Spermien nach dem Auftauen (vergleichend zwischen PureSperm <sup>®</sup> -Probe und Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten)	108
Tabelle 64: Anteil [%] PI-positiver Spermien nach dem Auftauen (Zp.3)	108
Tabelle 65: Anteil [%] PI- & FITC-PNA-negativer Spermien nach dem Auftauen (Zp.3)	109
Tabelle 66: Anteil [%] PI-negativer & FITC-PNA-positiver Spermien nach dem Auftauen (Zp.3)	109

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern für ihren Zuspruch, ihre Geduld und nicht zuletzt für ihre finanzielle Unterstützung, ohne die die Anfertigung dieser Dissertation überhaupt nicht möglich gewesen wäre, von ganzem Herzen danken.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Rath danke ich herzlich für die Überlassung dieser interessanten Arbeit und für die konstruktive Kritik bei deren Durchführung und Gestaltung. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Sieme für die lustige und lehrreiche Zeit am Landgestüt und den selbstlosen Einsatz bei diversen Komplikationen wochenendlicher SCSA-Messungen. Ganz besonderer Dank gilt den „Drei Damen vom Sorter“. Danke Birgit, Antje und Christina für euren unermüdlichen Einsatz und eure aufmunternden Worte.

Uli Taylor danke ich ganz herzlich für ihre Hilfe am Flowzytometer, ohne die so manch ein Versuchstag hätte wiederholt werden müssen und für ihre Gesellschaft und die gute Unterhaltung während der gemeinsamen Kaffeepausen.

Curly K, Joe, Ali und Elastigirl danke ich für ihren Einsatz an unzähligen Versuchstagen und für zwei arbeitsintensive, aber wunderbare Sommer am Landgestüt in Celle. Außerdem danke ich Steffi, Claudia, Daphne und Jutta für ihre selbstlose Hilfe und ihr Durchhaltevermögen bei diversen, meist sonntäglichen SCSA-Messungen.

Allen Mitarbeitern des Niedersächsischen Landgestüts und besonders Obersattelmeister Ulrich Müller, Obersattelmeister Henning Steinhoff und Gestütswart Mike Bollendorf möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit am Landgestüt danken.

Lothar Schindler und Hans-Hermann Döpke danke ich für ihre Hilfe bei technischen Problemen jeder Art. Immaculada Parrilla danke ich außerdem für ihren Einsatz und ihre Hilfe im letzten Versuchsteil, sowie Herrn Dr. Baulain für die freundliche Beratung in jeglichen Fragen der Statistik. Außerdem möchte ich an dieser Stelle ein Lob und Dank an alle Mitarbeiter der Abteilung Biotechnologie im Institut für Tierzucht für das angenehme Arbeitsklima richten.

Ebenso danke ich Uwe Müller für seine ständige Verfügbarkeit und die Beantwortung all jener Fragen, die Ela nicht beantworten konnte.

Außerdem möchte mich abschließend, aber nicht zuletzt bei meiner Freundin Ela von ganzem Herzen für ihre kompetente Beratung in allen computertechnischen Fragen und ihre Unterstützung, Aufmunterung und ihr Verständnis in dieser Zeit bedanken.