

Aus dem Institut für Tierzucht Mariensee  
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig  
und dem Niedersächsischen Landgestüt Celle

---

**Vergleich verschiedener Aufbereitungsverfahren  
zur Kryokonservierung von Hengstejakulaten**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer  
DOKTORIN DER VETERINÄRMEDIZIN  
(Dr. med. vet.)  
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von  
Katharina Anne Knop  
aus Bremen

**Hannover 2006**

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. D. Rath

1. Gutachter: Prof. Dr. D. Rath
2. Gutachter: PD Dr. med. vet. C. Wrenzycki

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2006

## **Meinen Eltern**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Literatur .....</b>	<b>13</b>
2.1 Tiefgefrierung von Hengstsperma .....	13
2.2 Aufbereitungsverfahren für die Tiefgefrierung von Hengstsperma.....	15
2.2.1 Zentrifugation.....	15
2.2.1.1 Das Seminalplasma- Bestandteile und Funktion.....	15
2.2.1.2 Einfluss des Seminalplasmas auf die Motilität und Fertilität.....	16
2.2.1.3 Einfluss der Zentrifugation auf Motilität und Fertilität.....	18
2.2.1.4 Einfluss verschiedener Verdünnermedien auf die Zentrifugation.....	20
2.2.1.5 Verschiedene Zentrifugationsverfahren .....	21
2.2.2 Resuspension.....	25
2.2.2.1 Einfluss des Tiefgefrierverdünners auf die Samenqualität.....	25
2.2.2.2 Einfluss der Samenzellkonzentration auf die Qualität von Hengstsperma .....	28
2.2.3 Kühlregime.....	30
2.2.3.1 Veränderung der Samenzellen durch den Abkühlungsprozess-Kälteschock .....	30
2.2.3.2 Einfluss der Abkühlungsgeschwindigkeit .....	32
2.2.3.3 Auswirkung der Lagerungsdauer .....	33
2.3 Konfektionierungsform.....	34
2.4 Einfrier- und Auftauvorgang.....	36
2.5 Einfluss weiterer Faktoren auf die Kryokonservierung von Hengstsperma .....	39
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.1 Allgemeine Angaben zu Material und Methoden.....	41
3.1.1 Versuchstiere.....	41
3.1.2 Gewinnung der Ejakulate .....	42
3.1.3 Untersuchung des Nativsamens .....	42
3.1.4 Aufbereitung der Ejakulate .....	43
3.1.5 Kühlung vor der Tiefgefrierung und Konfektionierung.....	43
3.1.6 Kryokonservierung der Samenproben.....	44
3.2 Versuchsspezifische Angaben.....	44
3.2.1 Versuchsaufbau .....	44
3.2.2 Versuchsreihe I: Zentrifugation .....	49
3.2.2.1 Verdünnung und Aufbereitung.....	49
3.2.2.2 Zentrifugation .....	49

3.2.2.3 Resuspension und Tiefgefrierung.....	50
3.2.3 Versuchsreihe II: Zentrifugation und Lagerungsdauer .....	50
3.2.3.1 Verdünnung .....	50
3.2.3.2 Zentrifugation .....	51
3.2.3.3 Resuspension und Tiefgefrierung.....	51
3.2.4 Versuchsreihe III: Abkühlungsgeschwindigkeit.....	51
3.2.4.1 Verdünnung und Zentrifugation .....	52
3.2.4.2 Anpassungszeit vor der Tiefgefrierung .....	52
3.2.5 Versuchsreihe IV: Samenzellkonzentration.....	52
3.2.5.1 Verdünnung und Zentrifugation .....	53
3.2.5.2 Resuspension und Einfrieren.....	53
3.3 Untersuchungsverfahren .....	54
3.3.1 Motilität.....	54
3.3.2 Morphologie.....	55
3.3.3 Durchflusszytometrische Spermauntersuchung .....	56
3.3.3.1 JC-1 und FITC-PNA/SYTO <sup>®</sup> 17/PI-Färbung, Messung und Auswertung.....	56
3.3.3.2 Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA <sup>™</sup> ).....	58
3.4 Statistische Auswertung.....	59
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>61</b>
4.1 Versuchsreihe I: Einfluss der Zentrifugation.....	61
4.1.1 Einfluss der Methoden auf den Spermienverlust .....	61
4.1.2 Einfluss der Methoden auf die Frischsamenqualität .....	62
4.1.3 Einfluss der Methoden auf die Tiefgefriersamenqualität.....	68
4.2 Versuchsreihe II: Einfluss der Zentrifugation und der Lagerungsdauer.....	74
4.2.1 Einfluss der Methoden auf den Spermienverlust .....	74
4.2.2 Einfluss der Methoden auf die Frischsamenqualität .....	76
4.2.3 Einfluss der Methoden auf die Tiefgefriersamenqualität.....	81
4.2.4 Einfluss der Lagerungsdauer.....	87
4.3 Versuchsreihe III: Einfluss der Abkühlungsgeschwindigkeit.....	90
4.4 Versuchsreihe IV: Einfluss der Samenzellkonzentration.....	93
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>97</b>
5.1 Einfluss der Hengste .....	98
5.2 Einfluss der Zentrifugation .....	99
5.3 Einfluss der Lagerungsdauer.....	102
5.4 Einfluss der Abkühlungsgeschwindigkeit.....	103
5.5 Vergleich der Samenzellkonzentrationen .....	104

5.6 Schlussbetrachtung.....	106
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>108</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>111</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>113</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>133</b>
9.1 Abbildungsverzeichnis .....	133
9.2 Tabellenverzeichnis .....	134
9.3 Zusammensetzung der Verdüner .....	137
9.4 Geräteeinstellung Durchflusszytometer .....	138
9.5 Auswertungsschema Morphologie.....	140

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	=Abbildung
Aqua bidest.	=Aqua bidestillata: <lat.> doppelt destilliertes Wasser
bzw.	=beziehungsweise
C	=Celsius
ca.	=circa
CASA	=computer-assisted-sperm-analysis
DFI	=DNA-Fragmentationsindex
DMSO	=Dimethylsulfoxid
d.h.	=das heißt
DNA	=Desoxyribonukleinsäure
EDTA	=Ethylen-Diamin-Tetra-Essigsäure
et al.	=et alii: <lat.> und andere
evtl.	=eventuell
Fa.	=Firma
FITC	=Fluoreszeinisothiocyanat
g	=Erdbeschleunigung
g	=Gramm
HBS	=Hepes buffered saline: <engl.> hepesgepufferte Salzlösung
INRA 82	=Institute Nationale de la Recherche Agronomique
ml	=Milliliter
mm	=Millimeter
mM	=Millimolar
MMP	=Mitochondrienmembranpotential
min.	=Minute
Mio.	=Millionen
mod.	=modifiziert
Mrd.	= Milliarden
mW	=Milliwatt
n	=Anzahl, Gruppengröße
NaCl	=Natriumchlorid
nm	=Nanometer
o.ä.	=oder ähnliche(s)
PBS	=phosphate buffered saline: <engl.> phosphatgepufferte Salzlösung
pH	=Pondus Hydrogenii: <lat.> negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PNA	=Peanut Agglutinin
$p \leq 0,05$ :	=Irrtumswahrscheinlichkeit < 5 %
SCSA <sup>TM</sup>	=Spermienschromatinstrukturanalyse
s.	=siehe
± SD	=standard deviation: <engl.> Standardabweichung
Std.	=Stunde



TG	=Tiefgefrierung
u.a.	=unter anderem
UV	=Ultraviolett
W	=Watt
$\bar{x}$ :	=arithmetischer Mittelwert
z.B.	=zum Beispiel
z.T.	=zum Teil
$\mu\text{g}$	=Mikrogramm
$\mu\text{l}$	=Mikroliter
$\mu\text{m}$	=Mikrometer

## **Veröffentlichungen:**

### **Aus der vorliegenden Dissertation sind folgende Publikationen hervorgegangen:**

KNOP, K., N. HOFFMANN, D. RATH, H. SIEME (2005):

Evaluation of slow cooling after centrifugation and glycerol addition at 22 °C direct freezing of semen in stallions with good and poor sperm longevity.

Anim. Reprod. Sci. 89, 1-4, 299-302

KNOP, K., N. HOFFMANN, D. RATH, 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, 1-4, 294-297

KNOP, K., D. RATH, H. SIEME (2006):

Use of cushioned centrifugation technique prior to cryopreservation in stallion with good and poor semen freezability.

Anim. Reprod. Sci. 41, 1-41, 19

## 1. Einleitung

Für die Pferdezucht hat die Bedeutung der künstlichen Besamung mit Tiefgefriersperma in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Gründe hierfür sind vor allem die unbegrenzte Haltbarkeit des kryokonservierten Samens, die es ermöglicht, Sperma langfristig in der Zucht einzusetzen. Internationaler Handel und die Nutzung von Leistungshengsten zur Zucht, die aufgrund der trainings- und wettkampfbedingten Abwesenheit von der Station keinen Frischsamen während der Zuchtsaison bereitstellen können, stellen einen weiteren Vorteil für den Einsatz von Tiefgefriersperma dar. Im Vergleich zur Besamung mit Frischsperma sind jedoch die Trächtigkeitsraten mit Tiefgefriersperma immer noch unbefriedigend (KLUG 1989). Die Aufbereitung von Hengstsperma zur Kryokonservierung beinhaltet zahlreiche Schritte, von denen jeder einzelne den Erfolg dieses Prozesses beeinflusst. Ziel der vorgelegten Arbeit ist es, eine weitere Verbesserung des Endproduktes durch verfahrenstechnische Anpassungen zu erreichen. Hengstsamen wird routinemässig vor der Kryokonservierung zur Entfernung des Seminalplasmas und zur Samenzellkonzentrierung zentrifugiert. Durch die Zentrifugationskraft und -zeit werden Membranschädigungen hervorgerufen, die die Befruchtungsfähigkeit beeinflussen. Daneben ist auch ein nicht unerheblicher Spermienverlust festzustellen, der besonders bei Hengsten mit geringer Gesamtspermienzahl von Bedeutung ist.

Im ersten Untersuchungsabschnitt wurden verschiedene Zentrifugationsverfahren und ihr Einfluss auf die Rückgewinnungsrate sowie auf die Qualität der anschließend tiefgefrorenen Spermaproben untersucht.

Die Kryokonservierung von Hengstsperma ist nur an Stationen möglich, die den erforderlichen Sachverstand und die notwendige Ausrüstung besitzen und setzt den Transport des jeweiligen Hengstes zu dieser Station voraus. Die Möglichkeit, den Samen am Standort des Hengstes zu gewinnen und den gekühlten Samen zu einer spezialisierten Station zu transportieren, wäre von großem Vorteil.

Im zweiten Untersuchungsabschnitt wurde deshalb der Einfluss des Einfrierprozesses nach 24-stündiger Lagerung bei 5°C mit dem Standardverfahren auf die Qualität des aufgetauten Spermas verglichen.

Generell wird ein Kühlregime vor dem Einfrieren mit einer schnellen Abkühlungsrate von 37°C auf 22°C und einer danach folgenden langsamen Abkühlungsrate auf 5°C empfohlen, um Schäden durch Kälteschocks an Spermien zu verhindern.

Im dritten Untersuchungsabschnitt wurde der Einfluss einer langsamen Abkühlungsrate auf 5°C vor dem Einfrierprozess mit direktem Einfrieren bei 22°C nach dem Zentrifugieren und Glycerinzugabe auf die Qualität von Tiefgefriersperma bei Hengsten verglichen, die aufgrund ihrer Spermaqualität in zwei Gruppen mit guter und schlechter Haltbarkeit aufgeteilt waren.

Um eine optimale Besamungsdosis mit Tiefgefriersperma zu erlangen, wird generell eine Gesamtpermienzahl von  $800 \times 10^6$  Samenzellen/ml mit mindestens 30%-iger Vorwärtsbeweglichkeit nach Auftauen vorgeschlagen, wobei eine Besamungsdosis etwa 8 Pailletten à 0,5 ml entspricht.

Da eine Reduzierung der Anzahl von Pailletten pro Besamungsdosis von Vorteil wäre, wurde im vierten Untersuchungsabschnitt der Einfluss einer erhöhten Samenzellkonzentration in 0,5 ml-Pailletten auf die Qualität von Tiefgefriersperma geprüft.

## 2. Literatur

### 2.1 Tiefgefrierung von Hengstsperma

Das Ziel der Tiefgefrierkonservierung von Samenzellen ist die Erhaltung ihrer Befruchtungsfähigkeit über einen unbegrenzten Zeitraum. Für die Aufrechterhaltung der Befruchtungskompetenz müssen Metabolismus, Motilität, Akrosomintegrität, die im Zellkern gelagerte DNA und die Proteine der Plasmamembran, die die Bindung mit der Eizelle ermöglichen, in ihrer Funktion erhalten bleiben (AMANN u. PICKETT 1987). Ziel der Aufbereitung zur Spermatiefgefrierung ist es, schädliche externe Einflüsse auf die Samenzelle zu minimieren und den Stoffwechsel auf ein minimales Maß zu reduzieren. Während der Tiefgefrierung durchlaufen die Spermien eine Abkühlungs- und eine Gefrierphase über einen Temperaturbereich von 20°C bis -196°C. Dabei kommt es zu intra- und extrazellulärer Eisbildung, deren Formation von der Abkühlungsgeschwindigkeit abhängig ist. Zu schnelle als auch zu langsame Einfrier- und Auftaugeschwindigkeiten wirken sich negativ auf die Zellen aus. Hierbei kommt es z.B. zu einer bleibenden Veränderung der Struktur einiger Phospholipide. AMANN und PICKETT (1987) sehen in dieser Strukturänderung den Grund für eine Destabilisierung der Spermienmembran und einer Beeinträchtigung metabolischer Funktionen. Nach WATSON (2000) überleben generell 40-50% der Hengstspermien die Tiefgefrierung nicht, da sie dem Stress des starken Temperaturwechsels, den osmotischen Änderungen und dem toxischen Stress durch die Kryoprotektiva und der Eisbildung ausgesetzt sind. BALL und VO (2001) heben hervor, dass Samenzellen im Laufe der Tiefgefrierung einem hohen osmotischen Stress ausgesetzt sind. Hierbei kann der osmotische Druck sich stark verändern und zur Beschädigung der Zellstrukturen führen. Zur Kryokonservierung von Hengstsperma sind verschiedene Basisschritte notwendig (BRINSKO u. VARNER 1992). Zunächst wird nach der Samengewinnung das gesamte Ejakulat zur Abtrennung des Seminalplasmas verdünnt und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das Spermienpellet mit dem zur Tiefgefrierung vorgesehenen Verdünner resuspendiert und auf die vorgesehene Konzentration verdünnt. Je nach Verfahren wird das Sperma entweder erst verpackt und dann auf 5°C gekühlt oder erst gekühlt und dann bei 5°C verpackt. Nach abgeschlossenem Kühlvorgang auf 4°C folgt die kontrollierte Tiefgefrierung auf -196°C und anschließende Lagerung im flüssigen Stickstoff. Das Auftauen zur Besamung und die Beurteilung der Spermien erfolgt mit der zum jeweiligen

Einfrierprotokoll entwickelten Auftaumethode (GRAHAM 1996), wobei die Insemination des aufgetauten Spermas unmittelbar erfolgen sollte. Dabei ist ein Inseminationszeitfenster von 24 Std. vor bis 12 Std. nach der Ovulation einzuhalten, um zufriedenstellende Trächtigkeitsergebnisse zu erreichen (KLOPPE et al. 1988; BRINSKO u. VARNER 1992). Obwohl mittlerweile die Tiefgefrierverfahren verbessert wurden, eignet sich auch heute das Sperma vieler Hengste nicht zur Tiefgefrierung (SQUIRES et al. 2004). Für herabgesetzte Trächtigkeitsraten nach künstlicher Besamung mit Tiefgefriersperma werden als Hauptursache die durch die Samenverarbeitung hervorgerufenen Membranschäden angenommen (BLACH et al. 1989; WATSON 2000).

## **2.2 Aufbereitungsverfahren für die Tiefgefrierung von Hengstsperma**

### **2.2.1 Zentrifugation**

Die Zentrifugation wird eingesetzt, um für die Kryokonservierung einheitliche Spermienkonzentrationen durch Reduktion des Seminalplasmaanteils zu erzielen (McLEOD u. McGEE 1950; MEYER 1951; BADER 1968). Der Vorgang der Zentrifugation bleibt nach wie vor ein umstrittenes Thema in der Aufbereitung von Hengstsperma. Bislang ist diese Methode hinsichtlich der starken intra- und interindividuellen Schwankungen bei Volumen und Dichte der equinen Ejakulate (KLUG 1982; MAGISTRINI et al. 1987) jedoch fast die einzige, die zu einer ausreichenden Verdichtung der Samenzellen im Ejakulat führt und die Abtrennung des Seminalplasmas ermöglicht.

#### **2.2.1.1 Das Seminalplasma- Bestandteile und Funktion**

Nach MANN (1975) besteht das Ejakulat des Hengstes aus 3% Spermien und 97% Seminalplasma. Das Seminalplasma des Pferdes setzt sich aus den Sekreten von Hoden, Nebenhoden, Samenleiterampullen, Prostata, Samenblasendrüsen, Bulbourethraldrüsen und Urethraldrüsen zusammen (SETCHELL 1977; COOPER 1997; THOMPSON et al. 1980; LITTLE u. WOODS 1987). Beim Hengst ist der Anteil an Seminalplasma zu den ejakulierten Samenzellen wesentlich größer als bei den anderen Haussäugetieren, wie z.B. beim Bullen oder Ziegenbock (AMANN und SCHANBACHER 1983; ROBERTS 1986). Die Sekrete des Reproduktionstraktes werden beim Hengst in mehreren aufeinander folgenden Fraktionen abgegeben (TISCHNER et al. 1974; MANN 1975; MANN u. LUTWAK-MANN 1981). Die erste Fraktion stammt aus den Urethral- und Bulbourethraldrüsen. Diese auch als Vorsekret bezeichnete Flüssigkeit ist klar, spermienfrei und besitzt einen hohen NaCl-Gehalt. Sie dient der Spülung der Urethra. Die darauf folgende spermienreiche Fraktion zeichnet sich durch eine hohe Konzentration an Samenzellen aus, die in der Hauptsache in Ampullen- und Prostatasekret suspendiert sind. In diesem Ejakulatsteil sind u.a. große Mengen Ergothionein enthalten (TISCHNER et al. 1974), das in den Samenleiterampullen gebildet wird und den Spermien aufgrund reduzierender Eigenschaften Schutz vor oxidierenden

Substanzen bietet (MANN 1975). Die sich anschließende spermienarme Fraktion enthält nur noch wenige Samenzellen. Sie besteht hauptsächlich aus Schleim und den flüssigen Sekreten der Samenblasendrüsen. Nach beidseitiger Entfernung dieser akzessorischen Geschlechtsdrüsen sind nur noch Spuren von Zitronensäure im Ejakulat nachzuweisen, die als  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexbildner und Puffersubstanz dienen. Als letzte Ejakulationsfraktion beschreibt MANN (1975) die sogenannte „tail end portion“. Sie enthält fast keine Spermien und besitzt lediglich geringe Mengen Urethrasekret.

Abgesehen davon, dass das Seminalplasma als Vehikel beim Spermientransport während des Koitus dient (CHANG et al. 1971), ist seine Funktion im Befruchtungsgeschehen nicht vollständig geklärt. So haben beim Bullen Spermien, die dem Nebenhoden entnommen worden und nicht mit Seminalplasma in Berührung gekommen sind, die gleiche Befruchtungskapazität wie ejakulierte Spermien (AMANN u. GRIEL 1974). Diese Spermien zeigen außerdem bei einigen Spezies wie z. B. beim Bulle und beim Eber eine größere Kälteschockresistenz (BERGER u. CLEGG 1985; AALSETH u. SAACKE 1985). Folglich muss bei der qualitativen Beurteilung des Seminalplasmas deutlich zwischen den in vitro Eigenschaften bei der Samenkonservierung und den in vivo Funktionen im weiblichen Genitale unterschieden werden.

In vitro werden dem Seminalplasma sowohl schädigende als auch schützende Eigenschaften zugeschrieben, wobei Ejakulate der jeweiligen Tierarten erhebliche Unterschiede aufweisen (RODGER 1975).

### **2.2.1.2 Einfluss des Seminalplasmas auf die Motilität und Fertilität**

Hengstsamen wird vor der Kryokonservierung routinemäßig zur Entfernung des Seminalplasmas zentrifugiert. Damit werden mögliche negative Effekte des Seminalplasmas auf die Spermien während des Tiefgefrierens gemindert (CORTEEL, 1980; JASKO et al., 1991; SAMPER und MORRIS, 1998). JASKO et al. (1991) zeigten, dass trotz Entfernung des Seminalplasmas die Motilität der Spermien erhalten blieb.

Für die Überlebenszeit der Samenzellen im Seminalplasma stellte GÖTZE (1949) eine Zeitspanne zwischen acht und zwölf Std. bei Zimmertemperatur fest. Demnach besitzen zumindest Anteile des Seminalplasmas einen schädigenden Einfluss auf die Spermien.

Auch SMITH und POLGE vermuteten bereits 1950, dass sich die Entfernung des Seminalplasmas positiv auf die Überlebensrate von Samenzellen auswirkt.



MARDEN und WERTHESSEN (1956) fanden heraus, dass das Seminalplasma einen hemmenden Einfluss auf die Motilität von Hengstsamenzellen ausübt. Sie diskutierten sogar eine dadurch verursachte Herabsetzung der Fertilität.

RAJAMANNAN et al. (1968) beschrieben, dass Hengstsamen, der ohne Seminalplasma eingefroren worden war, nach dem Auftauen höhere Motilitätswerte aufwies als derjenige, der mit Seminalplasma eingefroren worden war.

PICKETT et al. (1975b) fanden heraus, dass durch die Abzentrifugation des Seminalplasmas eine Verlängerung der Lagerungszeit von Hengstsperma erzielt werden kann. HEISKANEN et al. (1987) kamen zu vergleichbaren Ergebnissen.

Darüber hinaus stellten PICKETT et al. (1975b) fest, dass sowohl die Reduktion des Seminalplasmaanteils auf 2% vom Endvolumen als auch dessen Steigerung auf über 20% eine deutliche Spermamotilitätseinschränkung mit sich brachte. Ein Anteil von 10% Seminalplasma in der Endverdünnung erwies sich als förderlich für die Erhaltung der Spermamotilität. Auch JASKO et al. (1991) verglichen die Motilität von Hengstsperma nach kompletter Entfernung des Seminalplasmas mit Proben, welche noch 5-10% Seminalplasma enthielten. Nach 24-stündiger Lagerung bei 5°C führte die komplette Entfernung des Seminalplasmas zu geringeren Motilitätswerten.

BAAS et al. (1983) führten Versuche mit Bullensperma durch, bei denen sie das Ejakulat durch zweimalige Zentrifugation fast vollständig vom Seminalplasma befreiten. Die Samenzellen wurden durch diese Behandlung immotil. Wurde das Seminalplasma wieder zugesetzt, konnte eine Reaktivierung der Spermatozoen erreicht werden. Mit steigender Seminalplasmazugabe hielt diese Eigenschaft jedoch nicht lange an.

AHLEMEYER (1991) zeigte, dass sich mit einem verbleibenden Seminalplasmaanteil von 5 % in der Endverdünnung die besten Resultate bezüglich der Motilität nach dem Auftauen erzielen ließen. Sowohl ein höherer ( 10 % oder 15 %) als auch ein niedrigerer ( 2 %) Prozentsatz führten zu signifikant schlechteren Ergebnissen. Eine erneute Zentrifugation des Überstandes zeigte eine starke negative Wirkung auf Kopfkappenintegrität und Auftaumotilität.

Weiterhin machte WEISS (2004) die unerwartete Beobachtung, dass im aufgetauten Samen bei unterschiedlichen Zentrifugationsmethoden mindestens 70% der Spermien kapazitiert und rund 25% kapazitiert und akrosomenreagiert waren. Sie geht davon aus, dass der erhöhte Anteil

veränderter Spermien nach Zentrifugation ein weiterer Grund für die reduzierte Fruchtbarkeit nach Gefriersamenübertragung sein könnte.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen von SCHEMBRI et al. (2002), die rund 65% kapazitierte und über 30% akrosomenreagierte Spermien im aufgetauten Hengstsamen fanden. Die Autoren zeigten, dass im Frischsamen mehr als 90% nicht kapazitierte Spermien vorhanden waren und dass die nach Kryokonservierung beobachteten Akrosomenveränderungen hauptsächlich auf die Entfernung des Seminalplasmas und anschließende Resuspension des Pellets mit Verdünner zurückzuführen waren. AURICH et al. (1996) konnten durch Zugabe von Seminalplasma von Pferden mit guten Auftaumotilitäten zu Spermien von Pferden mit niedrigen Auftaumotilitäten die Auftauergebnisse hinsichtlich Motilität und Membranintegrität signifikant verbessern. Im umgekehrten Fall kam es zur Verschlechterung der Parameter. Wurde den Pferdespermien mit guten Auftauergebnissen ihr eigenes Seminalplasma wieder zugesetzt, verschlechterten sich ihre Auftauresultate ebenfalls.

Es besteht daher die Vermutung, dass das Plasma neben motilitätsreduzierenden Faktoren auch solche enthält, die sich positiv auf die Motilität auswirken.

Bei der Produktion von Tiefgefriersperma sollte daher nicht der ganze Ejakulatüberstand entfernt werden; doch ist nicht genau bekannt, welche Restmenge im Gefriermedium verbleiben soll. AMANN und PICKETT (1987) empfahlen nach der Zentrifugation rund 90% des Überstandes zu verwerfen.

### **2.2.1.3 Einfluss der Zentrifugation auf Motilität und Fertilität**

Schon 1950 verfolgten McLEOD und McGEE die Idee, die Zentrifugationskraft zur Konzentration von Hengstspermien auszunutzen, stellten aber einen negativen Einfluss auf die Motilität fest. Vergleichbare Befunde wurden auch in Nachfolgeuntersuchungen ermittelt (MEYER, 1951; BUELL, 1963; BADER, 1968).

Etwas positiver stellten HESS et al. (1968) ihre Ergebnisse dar. Um das Ejakulat vom größten Teil des Seminalplasmas zu befreien, zentrifugierten sie unverdünnten Samen für acht Minuten bei 2700 U/min. Nach Entfernung von 75% des Seminalplasmas und anschließender Resuspension mit einem glyzerinhaltigen Verdünner kam es nur zu einer geringgradigen Motilitätsabnahme. BAUMGARTL (1980) fand bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen heraus, dass die Zentrifugation von verdünnten und unverdünnten Samen auch zu einem deutlichen Anstieg von Akrosomschädigungen führt; OETJEN (1988) und HEFFE (1993) bestätigten dies in ihren Untersuchungen. CHAVES

VIEIRA (1980) stellte allerdings fest, dass sich die Akrosinaktivität von zentrifugierten und nicht zentrifugierten Spermatozoen nicht signifikant unterscheidet. Da Akrosin an der inneren Akrosommembran lokalisiert zu sein scheint, nahm CHAVES VIEIRA (1980) an, dass eine Schädigung des Akrosoms nicht unbedingt den Verlust der enzymatischen Aktivität bedingt.

Der Einfluss der Zentrifugation auf die Qualität von Hengstsperma ist abhängig von der Kombination aus Gravitationskraft und Zentrifugationszeit (PICKETT et al. 1975b). Die Autoren gehen davon aus, dass sich niedrige Zentrifugalkräfte nicht negativ auf die Samenzellen auswirken. Sie stellten heraus, dass auch durch geringere Zentrifugalkräfte (400 x g) eine ausreichende Abtrennung des Seminalplasmas zu erreichen ist, und die Lagerungszeit der Samenzellen somit entscheidend verlängert werden kann. Auch BRINSKO et al. (2000) untersuchten die Wirkung von Zentrifugation und teilweiser Entfernung des Seminalplasmas auf die Lagerungszeit des Hengstspermas. Dabei verglichen sie Hengste, deren Ejakulate gute bzw. schlechte Toleranz gegenüber Kühlung und Lagerung besaßen. Die Studie kommt zu dem Schluss, dass Zentrifugation und partielle Reduktion des Seminalplasmas einen positiven Einfluss auf Ejakulate mit besonders schlechter Kältetoleranz besitzen.

HEITLAND et al. (1996) stellten beim Vergleich von zehn verschiedenen Zentrifugationszeiten fest, dass bei Verlängerung der Zentrifugationszeit eine höhere Rückgewinnungsrate erzielt werden kann. Sie vermerkten dabei nur eine geringe Motilitätsdepression bei einer Zentrifugationsdauer von mehr als 20 Minuten. Weiterhin stellten sie fest, dass das Volumen des verdünnten Samens bei der Zentrifugation mit 400 x g als auch mit 650 x g keinen Einfluss auf die progressive Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien hat.

BLACH et al. (1989) und WATSON (2000) gaben wiederum als Nachteile der Zentrifugation Spermienverlust und Membranschädigungen der Samenzellen an. Um das Ausmaß dieser negativen Auswirkungen abzuklären, verglich WEISS (2004) in einer Studie drei verschiedene Zentrifugationsmethoden mit unterschiedlicher Zentrifugalbeschleunigung und -dauer. Ihre Ergebnisse zeigten, dass sowohl der Spermienverlust wie auch die funktionelle Membranintegrität im aufgetauten Samen von der Zentrifugationsmethode signifikant beeinflusst werden. Bei einer Erhöhung der Beschleunigung mit gleichzeitiger Reduktion der Zentrifugationsdauer wird der Spermienverlust erhöht. Daraus kann gefolgert werden, dass bei einer geringeren Zentrifugationsdauer die Beschleunigung noch stärker erhöht werden muss, um den Spermienverlust gering zu halten. In diesem Zusammenhang muss jedoch berücksichtigt werden,

dass mit einer Erhöhung der Zentrifugalbeschleunigung auch die Membranschäden signifikant ansteigen. Nach AITKEN und CLARKSON (1988) sollen die nach der Zentrifugation menschlicher Ejakulate beobachteten Membranschäden irreversibel und auf sogenannte „reactive oxygen species“ (ROS) zurückzuführen sein. Dabei soll die Zentrifugationszeit eine grössere Rolle spielen als die Zentrifugalbeschleunigung (SHEKARRIZ et al., 1995).

#### **2.2.1.4 Einfluss verschiedener Verdünnermedien auf die Zentrifugation**

Nicht nur die Kombination aus Gravitationskraft und Zentrifugationsdauer beeinflusst den Spermienverlust und die Motilität. Zusätzlich spielen hierbei auch das Vorhandensein eines Verdünners vor der Zentrifugation (COCHRAN et al. 1984; MARTIN et al. 1979) als auch die Zusammensetzung des Verdünners, der während und nach der Zentrifugation benutzt wurde (CLAY et al. 1984; PICKETT et al. 1975b), eine Rolle.

Eine Zentrifugation ohne Verdünner war nach BADER (1968) mit erheblicher Beeinträchtigung der Motilität verbunden. Durch die Zugabe eines geeigneten Verdünners bereits vor der Zentrifugation erhofften sich mehrere Autoren eine Minimalisierung der schädigenden Einflüsse (NISHIKAWA 1975; NISHIKAWA u. SHINOMIYAS 1976; OSHIDA et al. 1968). RAJAMANNAN et al. (1968) verdünnte Hengstsamen vor der Zentrifugation im Verhältnis 1:1 mit einer 5% -igen Glukoselösung. Dieses Verdünnungsverhältnis übernahmen MARTIN und KLUG (1979) und verglichen die Auftaumotilitäten von unverdünnt und verdünnt zentrifugiertem Pferdesamen. Eine hypertone Glukose-EDTA-Lösung wurde als Verdünner eingesetzt und eine Zentrifugationsdauer von fünf Minuten bei 1000 x g gewählt. Nach dem Auftauprozess war in den verdünnt zentrifugierten Proben die Motilität der Samenzellen signifikant höher als in den unverdünnt zentrifugierten.

AHLEMEYER (1991) verdünnte Hengstsamen vor der Zentrifugation mit einem EDTA-MERCK-Verdünner. Nach der Zentrifugation bei 1000 x g und 5 Minuten stellte der Autor eine Motilitätssteigerung auf 61,3% gegenüber dem Ausgangsejakulat mit 55,4% fest. Ein gleichzeitiger negativer Einfluss auf die Kopfkappenmorphologie war nicht festzustellen.

COCHRAN et al. (1983) setzten als Zentrifugationsverdünner ein Zitrat-EDTA-Medium ein. Sie unterschichteten den auf 50 Millionen Samenzellen/ml verdünnten Samen mit 0,25ml der hypertonen Glukose-EDTA-Lösung nach MARTIN und KLUG (1979) und setzten die Zentrifugationsstärke auf 400 x g herab. Die Zentrifugationsdauer betrug fünfzehn Minuten. Die

Auftaumotilität der in dieser Weise behandelten Proben übertraf die mit Glukose-EDTA und höherer Beschleunigung zentrifugierten Ejakulate.

VOLKMANN (1987) vereinfachte das Verfahren von COCHRAN et al. (1983), indem er auf die Unterschichtung der Spermien mit dem Glukose-EDTA-Medium verzichtete. Beim Vergleich beider Methoden wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Vorwärtsmotilität nach dem Auftauen, wohl aber ein geringerer Anteil an geschädigten Kopfkappen bei Verwendung der Originalmethode festgestellt.

PADILLA und FOOTE (1991) verglichen den Einsatz zweier Verdüner bei zentrifugierten und nicht zentrifugierten gelagerten Spermaproben. Wurde der originale Magermilchverdünner (KENNEY et al. 1975) verwendet, waren die nicht zentrifugierten den zentrifugierten Samenproben zu jeder Zeit überlegen. Bei Einsatz eines modifizierten Magermilchverdünners mit einem höheren Natrium-Kaliumverhältnis von 4:1 kamen sie zu umgekehrten Ergebnissen. Sie schlossen daraus, dass die Motilität der Samenzellen durch Interaktionen mit Seminalplasma und Elektrolytgehalt des Verdünners beeinflusst wird. Der Zusatz von Eigelb zum Verdünner ohne vorherige Entfernung des Seminalplasmas durch Zentrifugation, führte in Untersuchungen von BEDFORD et al. (1994a,b) zu einer Motilitätsdepression, die sie auf möglicherweise schädigende Wechselwirkungen zwischen Seminalplasma und Eidotter zurückführten.

CLAY et al. (1984) war der Ansicht, dass Makromoleküle wie Polyvinylalkohol (PVA) als ein fördernder Bestandteil eines Verdünnermediums anzusehen sind. Die Zugabe von 5-10 mg/ml von PVA zu einem EDTA-Glukose-Verdünner, der bereits vor der Zentrifugation eingesetzt wurde, konnte den schädigenden Einfluss dieses Vorganges auf die Motilität herabsetzen. HAGEDORN (1992) stellte ähnliche Ergebnisse bei Einsatz eines Eidotter-Glycin-Verdünners mit Zusatz von BSA fest.

### **2.2.1.5 Verschiedene Zentrifugationsverfahren**

Die üblichen Zentrifugationstechniken stellen immer einen Kompromiss zwischen Spermienrückgewinnung und Minimierung der Spermienbelastung dar (BAUMGARTL et al. 1980; PICKETT et al. 1975b). Obwohl Zentrifugation mit geringer Beschleunigung kaum die Motilität und Lebensfähigkeit der Spermien beeinflusst (MAKLER u. JAKOBI, 1981), wäre es möglich, dass ein substanzieller Schaden der Ultrastuktur der Spermien durch den Druck, mit dem sie gegen den harten Boden der Zentrifugengläser gepresst werden, entsteht (JONES u. HOLT, 1974). Ziel

verschiedener Untersuchungen war es, möglichst schonend und effizient die Samenzellen vom Seminalplasma zu trennen und die vorwärtsbeweglichen, morphologisch normalen Samenzellen aus dem Gesamtejakulat zu selektieren. Die Dichtegradientenzentrifugation gilt hierbei als eine Standardtechnik. Die Selektion beruht auf einer Sedimentation in Abhängigkeit von Dichte und Eigenmotilität der Spermien (GORUS u. PIPELEERS, 1981). Verschiedene Dichtegradientenmaterialien, wie z.B. Natrium Metrizoate, Ficoll (HARRISON u. WHITE, 1972), Iohexol in Form von Nycodenz® und Accudenz® (GELLERT-MORTIMER et al. 1988), wurden untersucht. Am häufigsten wurde aber Percoll benutzt. Es handelt sich hierbei um ein polymerisiertes Kieselsäuregel.

Es wird zwischen der Zentrifugation mit einem kontinuierlichen und diskontinuierlichen Gradienten unterschieden (WALTER 1992). Die Samenproben werden über den Gradienten geschichtet und anschließend zentrifugiert. LE LANNOU und BLANCHARD (1988) halten für die Trennung der Spermien den Einsatz des diskontinuierlichen Gradienten 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).

Percoll wurde fast ausschließlich zur Samenaufbereitung für die künstliche Besamung verwendet; aber es bestanden Zweifel hinsichtlich seiner Spermienverträglichkeit. Siliconpartikel ( $\text{SiO}_2$ ) gelten als Irritans, die im Körper entzündliche Prozesse auslösen können. Durch Waschen und zweifache Zentrifugation können die meisten Partikel entfernt werden, aber nach Untersuchungen von ALVAREZ und STOREY (1993) führt mehrfaches Zentrifugieren aufgrund der Kompression der Spermatozoen zu einem dichten Pellet und fügt diesem erhebliche Schäden zu (HARRISON u. WHITE, 1972; JONES u. HOLT, 1974). Die Entstehung eines festen Pellets kann vermieden werden, wenn die unterste Schicht eine größere Dichte als Spermien besitzt, so dass sie sich während der Zentrifugation in der Zwischenlage anreichern. SMITH et al. (1997) benutzten für die Separation von humanen Spermatozoen Iodixanol, einen nichtionischen Dichtegradienten mit relativ niedriger Osmolarität und hoher Dichte. Nach Unterschichtung der Samenprobe mit dieser Substanz konnten sie nach Zentrifugation mit einer Zentrifugationskraft von  $1000 \times g$  und einer Zentrifugationsdauer von 30 min. keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Motilität und Morphologie der Samenzellen zu nicht zentrifugiertem Samen feststellen. Damit bietet Iodixanol eine nichttoxische Alternative zu Percoll. Weiterhin wird vermutet, dass Percoll zu einer

Membranschädigung der Spermatozoen führen kann und Iodixanol sich daher weniger nachteilig auf die Spermatozoen auswirkt als Percoll.

Als eine weitere Technik für die Aufbereitung von Hengstsperma zur Tiefgefrierung steht die Kissenzentrifugationstechnik zur Verfügung. Diese Technik ermöglicht das Arbeiten mit einer hohen Zentrifugationskraft, um eine höhere Rückgewinnungsrate zu erreichen. Gleichzeitig wird der physikalische Schaden durch die Gravidationskräfte und Pelletierung vermindert, indem die Spermien während der Zentrifugation auf einer weichen, kissenähnlichen Flüssigkeit mit hoher Dichte schwimmen (MAKLER et al. 1984).

COCHRAN et al. (1983) verglichen den Einfluss eines Glukose-EDTA-Mediums und eines Zitrat-EDTA-Mediums, das mit Glukose-EDTA unterschichtet war. Die Bildung eines Pellets konnte nicht verhindert werden. Bei der Rückgewinnungsrate beider Verfahren gab es keine Unterschiede, aber im unterschichteten Verfahren zeigte sich nach dem Auftauen eine bessere Motilität. Um festzustellen, welchen Effekt die Zentrifugationsgeschwindigkeit bei Verwendung dieser beiden Medien auf die Motilität hat, wiederholten VOLKMANN u. van ZYL (1987) diesen Versuchsansatz, indem sie das Zitrat-EDTA-Medium als Kontrolle benutzten und für Kontrolle und Unterschichtungsverfahren dieselbe Zentrifugationsstärke und -dauer verwendeten. In diesem Fall war die Kontrolle hinsichtlich der Motilität der Samenzellen nach dem Auftauen dem Unterschichtungsverfahren überlegen. Bezüglich der Fertilität der Samenzellen konnte nach beiden Zentrifugationsverfahren kein Unterschied festgestellt werden. Durch die Unterschichtung konnte somit keine Verbesserung nachgewiesen werden.

HEITLAND et al. (1996) platzierten ein Kissen bestehend aus einem auf Magermilch basierenden Tiefgefrierverdünner unter die Spermisuspension, welche mit einer klaren hepesgepufferten Salzlösung verdünnt war. Sie stellten eine Verbesserung der Motilität nach der Zentrifugationsdauer von 16 min fest.

MAKLER et al. (1984) beschrieben eine einfache und atraumatische Methode, um motile Spermien zu konzentrieren. Anstatt wie in der Dichtegradientenzentrifugationstechnik, in der wasserlösliche Medien mit hoher Dichte wie Percoll oder Ficoll verwendet werden, um Spermien und Zelltrümmer zu trennen (HARRISON 1976; GORUS u. PIPELEERS 1981), benutzten sie eine wasserundurchlässige ölige Substanz (Lipiodol), auf der sich die zentrifugierten Spermatozoen ansammeln, ohne in die schützende Kissensubstanz einzudringen. Sie schichteten 5-10 ml einer verdünnten Spermisuspension auf 1 ml der öligen Kissensubstanz. Nach Zentrifugation bei 300 x

g und 10min war im Gegensatz zu den herkömmlichen Techniken anstatt eines kompakten Pellets am Boden der Zentrifugationsbehältnisse ein spermienreiches Band zwischen den Grenzflächen klar erkennbar. Sie entfernten den Überstand bis auf 0,5 ml und nach Inkubation bei 37°C für 15-20 min fand eine Migration der motilen Spermien in die obere Schicht statt. Die oberen 0,3 ml der Schicht wurden entnommen und untersucht. Es befanden sich dort konzentriert motile Spermatozoen ohne Zelltrümmer und abnormale Formen. PH-Wert und Osmolarität waren ebenso wenig beeinflusst wie die Diffusion von Substanzen aus dem ölhaltigen Kissen in die verdünnte Spermiesuspension.

REVELL et al. (1997) verglichen die Kissenzentrifugationsmethode mit der herkömmlichen Zentrifugation. Dabei zentrifugierten sie im hohen Beschleunigungsbereich, um eine maximale Rückgewinnungsrate sicherzustellen, während durch das Kissen physikalische Membranschäden vermindert werden sollten. Sie benutzten als Verdüner für die Kontrollgruppe INRA-82 mit 2% Eigelb und zentrifugierten bei 600 x g für 10 min. Die Vergleichsgruppe wurde mit dem Verdüner Genus A verdünnt und vor dem Zentrifugieren bei 1000 x g für 20 min mit 3,5 ml einer trägen, dichten und isotonischen Lösung („Genus B“) unterschichtet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 3,5 ml entfernt und mit Tiefgefriererdüner resuspendiert. Bei dem Kissenverfahren war eine spermienreiche Phase zwischen den Grenzflächen erkennbar und es wurde zuerst der Überstand und dann das Kissen entfernt. Als Ergebnis erhielten sie eine signifikant höhere Rückgewinnungsrate bei der Kissenmethode. Bezüglich der Motilität nach dem Auftauen gab es keine signifikanten Unterschiede, trotzdem vermuteten sie eine schonendere Behandlung aufgrund der Tatsache, dass bei Hengsten mit schlechter Samenqualität durch die Kissenzentrifugationstechnik eine bessere Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen nach dem Auftauen erreicht werden kann als bei der herkömmlichen Methode.

Auch MATAS et al. (2005) untersuchten die Wirkung der Kissenzentrifugationstechnik auf die Lebensfähigkeit von Eberspermatozoen. In ihrem Versuch verglichen sie die Standardzentrifugationsmethode 800 x g und 10 min in 50 ml Zentrifugationsbehältern (WESTENDORF et al. 1975) mit einer Kissenzentrifugationstechnik 1000 x g und 20 min mit 45 ml verdünnten Samen unterschichtet mit 5 ml einer isotonischen Iodixanol Lösung (60% w/v Gradient). Sie konnten keinen Unterschied in der Lebensfähigkeit und Funktion der Spermatozoen bei den beiden Zentrifugationsmethoden, aber einen signifikant geringeren Spermienverlust bei der Kissenzentrifugationstechnik feststellen, wodurch eine höhere Anzahl von Besamungsdosen pro Ejakulat produziert werden kann.



Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch DELHOMME et al. (2004). Sie testeten eine neue Art von Zentrifugationsverdünner kombiniert mit einer Kissenzentrifugationstechnik (Eqcellsire®-Eq), der zur Aufbereitung von Hengstsperma für die Kryokonservierung herangezogen werden soll. Dabei verdünnten sie eine Hälfte der jeweiligen Ejakulate mit INRA-82+2% Eigelb als Standardmethode (600 x g für 10min) und die andere Hälfte für die Testgruppe mit Eqcellsire® Lösung A+2% Eigelb. Bei der Testgruppe wurde vor dem Zentrifugieren die Spermiesuspension mit 3,5 ml einer dichten, zähflüssigen Flüssigkeit (Eqcellsire® Lösung B) unterschichtet und danach bei 1000 x g für 20min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand bei beiden Versuchsgruppen bis auf das Pellet von 3,5 ml entfernt. Auch sie beschrieben im Vergleich zu der Standardmethode (77%) eine signifikant höhere Rückgewinnungsrate bei der Kissenzentrifugationstechnik (99%). In einem Besamungsversuch konnten sie keine Fertilitätsunterschiede erkennen. Die progressive Vorwärtsbeweglichkeit betrug bei der Kissenzentrifugation 45 µm/s und dem Standardverfahren 39 µm/s. ECOT et al. (2005) konnten bei Benutzung eines Zentrifugationskissens, eines klaren Zentrifugationsverdünners und hoher Zentrifugationsbeschleunigung sogar eine Rückgewinnungsrate von 100% erzielen. Sie fanden keine Unterschiede in der Motilität nach dem Auftauen verglichen mit dem Standardzentrifugationsverfahren.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Kissenzentrifugationsverfahren eine einfache Möglichkeit darstellen, um Samen auf schonende Weise zu zentrifugieren und zusätzlich eine hohe Rückgewinnungsrate zu erlangen.

## **2.2.2 Resuspension**

Nach der Zentrifugation wird das Spermienpellet mit dem zur Tiefgefrierung vorgesehenen Verdünner resuspendiert und auf die vorgesehene Konzentration verdünnt. Modifikationen sind hierbei durch Variation des Resuspensionsmediums sowie der Endkonzentration der Samenzellen möglich.

### **2.2.2.1 Einfluss des Tiefgefrierverdünners auf die Samenqualität**

Bei der Herstellung eines Tiefgefrierverdünners ist vor allem die Wahl geeigneter Nähr- und Schutzsubstanzen wie Zucker, Puffersubstanz, Eidotter und der Zusatz eines Kryoprotektivums wie Glycerin, DMSO o.a. besonders wichtig. Die exakten Konzentrationen dieser Bestandteile variieren

zwischen Verdünnern (PALMER 1984; AMANN u. PICKETT 1987). Als Zuckerzusatz bei Tiefgefrierverdünnern sind Glukose, Laktose und Fruktose zu nennen, deren Wirkung zum größten Teil auf osmotischen Eigenschaften beruht, aber auch von ihren Wechselwirkungen mit anderen Verdünnerbestandteilen abhängig ist (PAQUINON 1985). Wichtige Voraussetzung für den Verdünner ist die Einhaltung des osmotischen Gleichgewichts zwischen Zellen und Medium. Samenzellen bilden toxische Endprodukte (u. a. Milchsäure), die im spermienumgebenden Milieu eine pH-Wertsenkung verursachen. Neutralisierend und pH-stabilisierend wirkende Puffersubstanzen müssen daher zur Erhaltung einer ausreichenden Pufferkapazität des Verdünners gegenüber aeroben und anaeroben toxischen Abbauprodukten der Spermien in einem Bereich zwischen pH 6 und pH 7 zugesetzt werden (AMANN u. PICKETT 1987). In den meisten Verdünnern wird der pH-Wert durch puffernde Substanzen wie Zitronensäure (Pufferbereich um 8), Ethylendiamintetraessigsäure „EDTA“ (pH-Optimum 4-5) oder Natriumbikarbonat (pH-Optimum 6,8-7,2) eingestellt (PAQUINON 1985).

In ihrem neu entwickelten modifizierten Magermilchverdünner mit einem pH-Wert von 7,2 (Pufferbereich 7-8) verwendeten PADILLA und FOOTE (1991) erfolgreich HEPES (N-(2-Hydroxyläthylpiperazine-N-(2-Äthenäsylylfundacid)) als Zwitterionenpuffer. Nach FERGUSON et al. (1980) erfüllt der HEPES- Puffer alle Anforderungen an eine ideale Puffersubstanz.

Ein schützender und motilitätssteigernder Einfluss der Milch auf Samenzellen wurde sehr früh erkannt; daher enthalten viele Verdünnermedien als Grundsubstanz Milch (EBERTUS 1960) oder Magermilch (HUGHES u. LOY 1970; KENNEY et al. 1975).

Die Tiefgefrierung tierischer Zellen wurde erst durch den Einsatz von Glycerin möglich. POLGE et al. (1949) entdeckten die protektive Wirkung, als es ihnen durch Zugabe von Glycerin zu Geflügelsperma erstmalig gelang, tierische Samenzellen erfolgreich zu konservieren. In Verbindung mit Wasser bewirkt Glycerin eine Erhöhung der Viskosität und der Siedetemperatur sowie ein Absenken des Gefrierpunktes (STEINBERNER u. PREUSS 1987). Man geht davon aus, dass es wie andere Zellmembran penetrierende Schutzsubstanzen durch seine wasserbindende Eigenschaft wirkt (WEITZE 2001). Penetrierende Gefrierschutzsubstanzen (z.B. Glycerin) agieren sowohl intra- als auch extrazellulär (AMANN u. PICKETT 1987). Nicht penetrierende Substanzen, wie z.B. Laktose und die Lipoproteine aus zugesetztem Eidotter, befinden sich nur im extrazellulären

Bereich. Letztere dehydrieren die Spermien, reduzieren dafür aber die Bildung großer Eiskristalle im Intrazellularraum.

Der kryoprotektive Mechanismus von Glycerin und die intra- und extrazellulären Schutzmechanismen sind noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass es wie andere Zellmembran penetrierende Schutzsubstanzen durch seine wasserbindende Eigenschaft wirkt (WEITZE 2001). In Verbindung mit Wasser bewirkt Glycerin eine Erhöhung der Viskosität sowie ein Absenken des Gefrierpunktes (STEINBERNER und PREUSS 1987). Schon 1977 beschrieb WEITZE als sogenannte „Lösungseffekte“ die beim Einfrieren entstehenden Vorgänge der Konzentrierung gelöster Stoffe im Verdünner infolge des Wasserentzugs durch die Eisbildung. Durch das hohe Wasserbindungsvermögen von Glycerin kann das Ausfrieren von Wasser verringert werden. Damit bleibt die Konzentrierung von Salzen und löslichen Verdünnerkomponenten und der daraus folgende Wasserentzug für die Zellen in einem tolerablen Rahmen. Nach WATSON (1995) beruht die Wirkung dieses Schutzeffektes, der in Abhängigkeit von der molaren Konzentration der Substanz entsteht, eher auf dem Anteil an ungefrorenem Wasser als auf der Elektrolytkonzentration. Der Übergang vom flüssigen zum glasartigen Stadium der Plasmamembran führt zu Gefrierschäden, die sich in einer sogenannten „Sprödigkeit“ der Zelle darstellen. Durch Volumenänderungen während des Tiefgefriervorganges können Mikrofissuren entstehen, die bis zur Ruptur der Plasmamembran führen können. Glycerin wirkt durch seine intrazellulären Effekte gegen die Bildung dieser Mikrofissuren, indem es sich in der Membran löst und so deren Plastizität erhält (ALVAREZ u. STOREY 1993). Auch HAMMERSTEDT et al. (1990) vermuteten, dass Glycerin sowohl die Membranfluidität durch Einlagerung in die Lipiddoppelmembran als auch alle metabolischen Reaktionen durch Wandlung der intrazellulären Viskosität verändert.

Die Bestimmung der optimalen Glycerinkonzentration hängt von dem zu untersuchenden Beurteilungskriterium ab, da sich die Auswirkungen hinsichtlich der Motilität und der Morphologie unterscheiden. Hengstspermien überstehen die Kryokonservierung nicht ohne Gefrierschutzsubstanzen (SQUIRES et al. 2004). Die Befruchtungsfähigkeit wird neben der Einwirkdauer auch durch die Glycerinkonzentration und die Temperatur, bei welcher der glyzerinhaltige Verdünner zum Samen hinzugegeben wird, beeinflusst (BERNDTSON u. FOOTE 1972; WILMUT u. POLGE 1974; BAMBA u. CRAN 1988). In höheren Konzentrationen (8-10 %) ist Glycerin zelltoxisch (FAHY 1986) und reduziert die Fertilität (POLGE 1956). Deshalb muss die Konzentration im Verdünner zwar niedrig genug sein, um diesen Effekt möglichst gering zu halten,

gleichzeitig soll jedoch ausreichend Schutz für die Zellen gewährleistet werden (GRAHAM 1996). Bei Pferdesperma nimmt die Fertilität mit steigender Glyzerinkonzentration (von 2 bis 7%) signifikant ab (PACE u. SULLIVAN 1975). Üblicherweise werden laut SAMPER und MORRIS (1998) daher 2,5 bis 5% Glyzerin als Verdünnerezusatz gewählt. Eine maximal protektive Wirkung in Kombination mit minimal schädigenden Effekten für Hengstsamen wird mit einem Glyzerinzusatz von 2% in der Endverdünnung erreicht (BURNS u. REASNER 1995). Mehrere Substanzen, wie z.B. Äthylenglycol, Polyäthylenglycol und Propylenglycol (NISHIKAWA et al. 1968), Betain (KOSKINEN et al. 1989) sowie DMSO (LOVELOCK u. BISHOP 1959), wurden als alternative Kryoprotektiva getestet. Diese Substanzen konnten jedoch keinen befriedigenden Ersatz für Glyzerin bilden.

SQUIRES et al. (2004) stellten fest, dass sich Methyl-Formamid und Dimethyl-Formamid genauso effektiv wie Glyzerin als Kryoprotektiva eignen und dabei anscheinend nicht spermientoxisch wirken. Die Autoren empfehlen weitere Experimente für solche Ejakulate, die sich nur schlecht mit Glyzerin tiefgefrieren lassen.

#### **2.2.2.2 Einfluss der Samenzellkonzentration auf die Qualität von Hengstsperma**

Die Anzahl der inseminierten Spermatozoen ist bedeutungsvoll für den Erfolg der Besamung.

PICKETT et al. (1975b) erhielten bei der Besamung mit 10 ml à  $500 \times 10^6$  Samenzellen signifikant bessere Befruchtungsraten (72%) gegenüber Inseminationen mit 10 ml à  $100 \times 10^6$  Spermien. Der Zusammenhang zwischen Abfohlrate und inseminierter Spermienzahl wurde von PACE und SULLIVAN (1975) bestätigt. Dabei ergab sich ein signifikanter Anstieg der Trächtigkeiten durch eine Erhöhung der motilen Spermien von 400 auf 800 Millionen; aber darüber hinaus war keine weitere Verbesserung durch Steigerung auf 1,6 Mrd. Samenzellen zu erreichen. Daraus kann also gefolgert werden, dass eine Mindestmenge an Spermatozoen im Inseminat enthalten sein muss, um eine optimale Trächtigkeitsrate zu gewährleisten, eine Steigerung der Spermienmenge aber nur bis zu einer gewissen Grenze Einfluss auf den Erfolg der Besamung hat.

Weiterhin stellt sich die Frage, wie konzentriert Spermien verpackt, eingefroren und angepasst werden können, ohne dass die Samenqualität leidet.

Hengstsperma wird üblicherweise in 0,5 ml, 2,5 ml oder 5 ml-Pailletten eingefroren. Dabei sollten mindestens 30% vorwärtsbewegliche Spermien nach dem Auftauen vorhanden sein (LOVE et al. 1989; SAMPER et al. 1994). Die Motilität in aufgetauten Spermaproben unterscheidet sich

zwischen verschiedenen Hengsten, aber auch zwischen den Ejakulaten desselben Hengstes erheblich. Eine adäquate Besamungsdosis enthält üblicherweise 100-400 Millionen vorwärtsbeweglicher Spermatozoen (CRISTANELLI et al. 1984; HEITLAND et al. 1996; THOMASSEN 1993; VOLKMANN u. VAN ZYL 1987). Die Spermienkonzentration scheint dabei einen Einfluss auf die Auftaumotilität zu besitzen (HEITLAND et al. 1996). Obwohl NISHIKAWA (1975) erfolgreiche Versuche mit weit höheren Spermienkonzentrationen veröffentlicht hat, vertrat auch PALMER (1984) die Auffassung, dass eine Dosierung von mehr als 100 Millionen Samenzellen/ml negative Auswirkungen auf die Samenqualität hat. Im gleichen Jahr widerlegten COCHRAN et al. (1984) diese Theorie mit sehr guten Ergebnissen bei einer Endverdünnung auf 500 Millionen Samenzellen/ml. In den letzten Jahren wurden eher höhere Konzentrationen mit immer weiter verringerten Volumina verwendet. DELIUS (1985) bestätigte, dass eine Konfektionierung einer Besamungsdosis von 200 Millionen Spermien in 0,5 ml-Pailletten keine negative Auswirkung auf die Samenqualität hat. HÅÅRD und HÅÅRD (1991) erhöhten die Konzentration ebenfalls in 0,5 ml-Pailletten sogar auf eine Milliarde Samenzellen/ml. Damit konnten sie die Besamungsdosis auf eine Paillette reduzieren. 1998 verglichen LEIPOLD et al. den Effekt von verschiedenen Spermienkonzentration (400 Mio. und 1,6 Mrd. Samenzellen/ml) in 0,5 ml-Pailletten auf die Trächtigkeitsrate von Stuten. Weiterhin untersuchten sie den Einfluss von einer Besamungsdosis mit 320 und 800 Millionen vorwärtsbeweglichen Spermien nach dem Auftauen auf die Trächtigkeitsrate. Sie fanden heraus, dass die Motilität nach dem Auftauen keinen Unterschied zwischen den beiden Spermienkonzentrationen erkennen ließ. Eine Verbesserung der Trächtigkeitsrate mit erhöhter Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien wurde nicht festgestellt und sie schlugen eine Besamungsdosis von einer 0,5 ml-Paillette mit einer Gesamtkonzentration von  $8 \times 10^8$  Samenzellen und einem Anteil von  $33,2 \times 10^8$  motilen Spermien vor. Einen Einfluss auf diese Ergebnisse durch verschiedene Tiefgefrierverdünner halten sie für möglich und raten daher zu weiteren Untersuchungen mit unterschiedlichen Verdünnern. Entsprechende Ergebnisse wurden durch SQUIRES et al. (1999) bestätigt.

HEITLAND et al. (1996) fanden im Gegensatz dazu einen Motilitätsunterschied nach dem Auftauen mit verschiedenen Spermakonzentrationen. Dabei stellten sie einen Verdünnereffekt fest und empfahlen eine Konzentration von  $4 \times 10^8$  Samenzellen/ml in einem Magermilch-Eidotter Verdünner. Auch CROCKETT et al. (2001) fanden nach der Tiefgefrierung bei einer niedrigen

Konzentration (250 Millionen Spermien/ml) einen höheren Prozentsatz an motilen Spermien als bei Verwendung von 500 Millionen Spermien/ml.

### **2.2.3 Kühlregime**

Bereits 1776 beobachtete SPALLANZANI (zitiert nach BOWEN 1969), dass bei Kühlung der Samenzellen eine Verzögerung ihrer Aktivität eintritt und Wiedererwärmung deren Motilität wieder steigen lässt. AMANN und PICKETT (1987) berichteten, dass durch den Prozess der Kühlung die Lebensfähigkeit der Samenzellen verlängert werden kann. Der Grund hierfür liegt in der Abhängigkeit zwischen Samenzellmetabolismus und Temperatur. Die Temperaturabsenkung bewirkt eine Verlangsamung der biochemischen Reaktionen und drückt sich in einer Motilitätsabsenkung aus. Erfolgt diese Abkühlung oder auch die Erwärmung zu schnell, kann es zu irreversiblen Zellschäden (Kälteschock) kommen (AMANN u. PICKETT 1987). Durch Einhaltung spezieller Abkühlungsraten können diese Schäden jedoch in Grenzen gehalten werden.

#### **2.2.3.1 Veränderung der Samenzellen durch den Abkühlungsprozess-Kälteschock**

In den meisten Zellen, die zu schnell niedrigen Temperaturen ausgesetzt werden, ohne zu gefrieren, kommt es zum sogenannten Kälteschock. An Bullensperma beobachtete MILOVANOV (1934) irreversible Schädigungen bei einer schnellen Abkühlungsgeschwindigkeit von 37°C bzw. 20°C auf 1°C. Die Spermien erfahren im Laufe der Abkühlung von +20°C bis +1°C verschiedene Veränderungen, die bei Temperaturen unter +15°C einsetzen und mit zunehmendem Kältestress allmählich intensiver werden. Diese Veränderungen sind zum Teil irreversibel (WHITE u. WALES 1960). WATSON und PLUMMER (1985) entdeckten eine positive Korrelation zwischen dem Prozentsatz überlebender Spermien nach Kälteschock und der Fruchtbarkeit nach Tiefgefrierung und Auftauen. Der Kälteschock macht sich besonders bei Ungulaten, die hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber Kälteeinflüssen besonders prädisponiert sind (WATSON 1995), durch Verlust von Membranintegrität und Zellfunktion bemerkbar (BWANGA 1991). Weiterhin wurde vorzeitiger Motilitätsverlust mit charakteristischen Merkmalen wie abnorme Bewegungsmuster (zirkulär und rückwärts) und Verlust der Akrosomenintegrität beobachtet (WATSON 1995). Außerdem erfolgt eine beträchtliche Reduktion der Energieproduktion, die Membranpermeabilität nimmt zu und intrazelluläre Ionen und Moleküle gehen verloren (AMANN u. PICKETT 1987). Die

Temperatursenkung führt zu einer Verringerung der ATP-Produktion (QUINN 1985) und da die Funktion ATP-abhängiger membranständiger Pumpen für die Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts von großer Bedeutung ist, kommt es zu einer Verschiebung der Ionenverhältnisse und folglich zur Depolarisation der Plasmamembran. Diese Depolarisation führt zur Öffnung ladungsgesteuerter Kalziumkanäle und somit zu einem Kalziumeinstrom (AMANN u. PICKETT 1987). Bedingt durch die erhöhte Kalziumkonzentration im Zytosol werden Phospholipasen und Proteasen aktiviert und Membrankomponenten infolgedessen hydrolysiert (HAMMERSTEDT et al. 1990). Insgesamt werden gravierende Veränderungen der Membranpermeabilität ausgelöst, die bis zum Tod der Zelle führen können.

Durch den Kälteschock wird auch ein Defizit verschiedener Enzyme verursacht, wodurch die Glykolyse, die Fruktolyse und die Atmungsaktivität der Spermatozoen reduziert werden. Durch Enzymaktivitätsmessung (ATP-ase, Cytochrom-Reduktase) kann das Ausmaß der Kälteeinwirkung bestimmt werden (HOLT u. NORTH 1985).

Am stärksten werden die Membransysteme durch den Kälteschock betroffen (WATSON et al. 1987). Durch die Abkühlung kommt es infolge einer Formveränderung der Phospholipide zu einem Phasenübergang vom flüssigen zum kristallinen Zustand. Es tritt eine Streckung der Fettsäureketten auf, die eine Zusammenballung der Phospholipide bedingt. Die Moleküle der Membran können sich in diesen kristallinen Domänen nicht frei bewegen. Nur vereinzelte Regionen der Membran bleiben im flüssigen Zustand. In diesen Bereichen kommt es zur Aggregation der integralen Proteine, die zu einer erhöhten Membranpermeabilität und zu einem Verlust der metabolischen Funktion führt (AMANN u. PICKETT 1987). Die Membran wird durch die Kälteschockeinwirkung für Substanzen wie z. B. Sucrose, Natrium und Kalium, welche sonst nicht passieren können, durchlässig (DAW et al. 1973). FARRANT und MORRIS (1973) untersuchten den Einfluss einer hypotonen Belastung, welche an sich keine direkten Schäden verursacht, die Membran aber empfindlicher für andere Stressfaktoren, wie beispielsweise Temperatursenkung, macht. Einige Phospholipide können eine zirkuläre Anordnung annehmen und die sogenannten „hexagonal-II Phasen“ bilden. Diese normalerweise nur flüchtig auftretenden Strukturen können bei Abkühlung länger fortbestehen.

Die Membranschäden des Spermienkopfes betreffen zuerst die Plasmamembran und danach die Akrosommembranen, wobei die äußere Akrosommembran anscheinend keine völlige Ruptur

erleidet, sondern ihre Kontinuität beibehält. Die Veränderungen führen aber zu einer messbaren akrosomalen Expansion (WATSON et al. 1987).

Das Ausmaß dieser Schädigungen ist von der Abkühlungsrate und der Endtemperatur, auf welche das Spermium abgekühlt wird, abhängig. Die Effekte des Kälteschocks können minimiert werden, indem kontrollierte Abkühlungsraten eingehalten werden (MORAN et al. 1992) und Lipide wie Eidotter, dessen protektive Wirkung nach lichtmikroskopischen Untersuchungen von AMANN und PICKET (1987) als Bildung eines Schutzwalles um die Plasmamembran beschrieben wird als auch Lipoproteine, z.B. Milch oder Magermilch, welche einen schützenden und motilitätssteigernden Einfluss auf Samenzellen besitzen (EBERTUS 1960), (HUGHES u. LOY 1970; KENNEY et al. 1975), dem Tiefgefriererdünnungsmittel zugefügt werden.

### **2.2.3.2 Einfluss der Abkühlungsgeschwindigkeit**

Zur Verhinderung des Kälteschocks durch plötzliche Abkühlung der Samenzellen werden geringe Abkühlungsgeschwindigkeiten empfohlen. Da Pferdespermien in einem Temperaturbereich von 37°C bis 20°C relativ unempfindlich auf Abkühlung reagieren, kann in diesem Bereich eine schnelle Abkühlung erfolgen. Der kritische Temperaturbereich liegt zwischen 20°C und 5°C, wobei Pferdespermien zwischen 18°C bis 8°C besonders temperaturempfindlich sind (MORAN et al. 1992; DROBNIS et al. 1993).

PROVINCE et al. (1984) untersuchten sowohl die Wirkung von Abkühlungsraten und Lagerungstemperatur, als auch den Einfluss verschiedener Verdünnungsmittel auf diese. Als Abkühlungsraten verglichen sie -0,1, -0,2 und -0,5 °C/min. mit dem direkten Eintauchen der verdünnten Spermasuspension in ein 5°C kaltes Wasserbad. Unabhängig von verschiedenen Verdünnungsmitteln waren die drei langsamen Abkühlungsraten dem Wasserbad von 5°C überlegen. Weiterhin stellten sie in ihren Untersuchungen fest, dass für die Erhaltung der Gesamtmotilität eine Lagerungstemperatur von 20°C und 15°C günstiger erscheint als 10°C und 5°C. Auch BATELLIER et al. (2001) stellten die Hypothese auf, dass durch die Lagerung bei 15°C die Plasmamembran der Spermatozoen weniger geschädigt wird. Zu etwas anderen Ergebnissen kamen VARNER et al. (1987). Sie erreichten eine Optimierung der Motilität bei flüssigkonserviertem Sperma bei einer Abkühlungsrate von -0,3°C/min. auf eine Endtemperatur von 4°C.



HEITLAND et al. (1996) untersuchten die Wirkung verschiedener Abkühlungszeiten vor dem Einfrieren von Raumtemperatur auf 5°C auf die Motilität von aufgetautem Hengstsperma in zwei unterschiedlichen Verdünnern. Der Anteil der vorwärtsbeweglichen Samenzellen erhöhte sich signifikant nach einer Abkühlungszeit von 2,5 und 5 Std. im Vergleich zum direkten Einfrieren bei 20°C. Die Spermatozoen, die in einem Magermilch-Eigelb-Medium verdünnt wurden, zeigten bei zwei Abkühlungszeiten höhere Gesamtmotilität und Vorwärtsbeweglichkeit als bei Verdünnung in einem Lactose-EDTA-Medium. Spermien, die in Lactose-EDTA-Medium verdünnt wurden, zeigten bei allen Abkühlungszeiten keinen Unterschied. Langsame Kühlraten von 0,05-0,1°C/min innerhalb des temperatursensitiven Bereiches sind danach optimal (DOUGLAS-HAMILTON et al. 1984; KAYSER et al. 1992). Bei Übergabe des während der Aufbereitung auf Raumtemperatur herabgekühlten Samens in den Kühlschrank werden initiale Kühlraten von 0,2°C/min erreicht. Geringere Kühlraten (0,07°C/min) können erreicht werden, indem das Samenaufbereitungsgefäß in ein Wasserbad mit Raumtemperatur verbracht wird und dieses Wasserbad in den Kühlschrank gestellt wird. Der Wasserstand im Wasserbad muss gleich oder höher sein als die Füllhöhe des Samens. Unterhalb des temperatursensitiven Bereiches kann wiederum eine schnelle Abkühlung erfolgen (SQUIRES et al. 1999). Abkühlungsraten und Lagerungstemperaturen sind für verschiedene Haussäugetiere untersucht worden.

### **2.2.3.3 Auswirkung der Lagerungsdauer**

Eine längere Lagerungsdauer von aufbereitetem und gekühltem Samen vor dem Einfrieren eröffnet die Möglichkeit, anstelle des Hengstes nur den gekühlten, frischkonservierten Hengstsamen zu Stationen mit spezieller Ausstattung für die Kryokonservierung zu transportieren.

Ziel vieler Untersuchungen war es, die maximale Aufbewahrungszeit von aufbereitetem und gekühltem Sperma vor dem Einfrieren festzulegen, ohne eine Verminderung der Tiefgefriersamenqualität einzugehen.

CROCKETT et al. (2001) zeigten, dass aufgetaute Proben einen höheren prozentualen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien besitzen (27%), wenn sie 2 bis 12 Std. vor der Tiefgefrierung gelagert wurden als nach 24stündiger Lagerung (10%).

REINSTORF (2003) stellte fest, dass bei einer längeren Lagerung des Samens bis zum Einfrieren mehr Zellen mit einem niedrigen Membranpotential nach dem Auftauen vorhanden waren. In den länger gelagerten Proben waren weniger akrosomintakte Spermien vorhanden. Auch VIDAMENT

et al. (2000) konnten höhere Motilitäten bei Proben mit einstündiger Kühlungszeit vor dem Einfrieren nachweisen als bei Proben, die vier Std. gekühlt wurden.

Dagegen entdeckte RÖBBELEN (1993) in ihrer Untersuchung einen positiven Einfluss der vier- bis sechsständigen Lagerungsdauer bei Raumtemperatur vor dem Einfrieren. Zum Vergleich wurden Samenproben nach der Aufbereitung direkt eingefroren. Die länger auf Raumtemperatur angepassten Spermien wiesen nach dem Auftauen gegenüber der Vergleichsprobe einen signifikant geringeren Anteil an morphologisch veränderten Spermien auf.

BACKMAN et al. (2004) untersuchten den Einfluss einer Lagerungsdauer von 18 Std. vor dem Einfrieren. In Bezug auf die Motilität konnten sie keinen signifikanten Unterschied zu Samenproben feststellen, die direkt nach der Aufbereitung eingefrorenen wurden. Auch bei einem Besamungsversuch stellten sie keinen nachteiligen Einfluss einer achtzehnstündigen Lagerung auf die Trächtigkeitsraten fest.

Zusätzlich berücksichtigten die Autoren den Abkühlungszeitpunkt. Dabei konnten sie nachweisen, dass eine Abkühlung vor der Zentrifugation zu schlechteren Auftauraten führt als nach der Zentrifugation. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen auch COCHRAN et al. (1984), VIDAMMENT et al. (2000) und CROCKETT et al. (2001). MELO et al. (2005) konnten diese Ergebnisse sowohl bei den Laboruntersuchungen als auch im Besamungsversuch nicht bestätigen. Sie gehen davon aus, dass durch die Lagerungsdauer ein längerer Kontakt zu den Verdünnerkomponenten ermöglicht wird. Dies führt zu einer adäquaten Wiederherstellung der Lipiddoppelmembran und damit zu einer geringeren Schädigung der Spermienmembran nach der Kryokonservierung.

## **2.3 Konfektionierungsform**

Im Laufe der Jahre wurden unterschiedliche Konfektionierungsverfahren eingesetzt.

Zuerst wurden Glasampullen mit einem Volumen zwischen 1 und 10 Millilitern verwendet, die bei  $-79^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren wurden. SZUMOWSKI (1954) sowie ILJINSKAJA (1956) erzielten auf diese Weise Auftaumotilitäten von 70-80 %, während die folgenden Arbeiten weniger zufrieden stellende Resultate lieferten (BARKER u. GANDIER 1957; ZMURIN 1961; BUELL 1963; POLGE u. MINOTAKIS 1964).

Das von NAGASE und GRAHAM (1964) entwickelte Pelletverfahren zur Tiefgefrierung von Bullensperma stellte die erste Verpackungsform mit kleinem Volumen dar. MERKT und KRAUSE

(1966) setzten diese Methode zur Konservierung von Hengstsaamen ein und froren den verdünnten Saamen in 0,1 ml großen Pellets ein. Im Vergleich zum Nativsaamen hatte sich die Vorwärtsmotilität der Ejakulate nach dem Auftauen lediglich um 10% reduziert. Aber die Schwierigkeit der Kennzeichnung und sicheren Identifizierung sowie die Gefahr der Kontamination während der Verarbeitung und Lagerung stellten sich als Nachteil dieser Methode heraus.

Erste Versuche zur Tiefgefrierung in 1,0 ml fassenden Kunststoffpailletten führten NISHIKAWA et al. (1968) durch. MARTIN und KLUG (1979) entwickelten das Makrotüb®-Verfahren. Dabei wurden die bei Schweinesperma benutzten großvolumigen Kunststoffröhrchen (WESTENDORF et al. 1975) für die Tiefgefrierung von Pferdesaamen modifiziert. Diese Verpackungsform mit beidseitigem Stahlkugelverschluss wurde mit 4 ml verdünntem (Laktose-Eidotter-Glyzerin-Medium) Saamen beschickt. Im Vergleich zum pelletierten Saamen wurde eine um 10% verbesserte Auftaumotilität erreicht (MARTIN et al. 1979). Zusätzlich konnte auch eine Reduzierung der Akrosinaktivität festgestellt werden (CHAVES VIEIRA 1980). Hinsichtlich praktischer und hygienischer Gesichtspunkte überzeugt das Makrotüb®-Verfahren gegenüber dem Pelletverfahren, da die gesamte Besamungsdosis in einer Konfektionierungsform untergebracht werden kann und somit das Auftauen und die Insemination wesentlich vereinfacht werden. Im Gegensatz zum Pellet kann jede Inseminationsportion individuell identifiziert werden und ist hygienisch verschlossen.

Da die Forderung nach gleichmäßigen Einfrier- und Auftauverläufen bei Einsatz eines geringeren Verpackungsvolumens (SIMMANK 1981) und einer dünneren Schichtdicke des umgebenden Materials eher gewährleistet wird, wurden von verschiedenen Gruppen Untersuchungen mit kleinervolumigen Kunststoffröhrchen durchgeführt.

KNEIBL (1993) erzielte beim Vergleich verschieden konfektionierter Saamenproben mit 0,5-ml-Pailletten die besten Resultate. SAMPER (1995) stellte keinen Unterschied in den Auftaumotilitäten fest, wenn Hengstspemien entweder in 0,5 ml-, 2,5 ml- oder 5 ml-Pailletten tiefgefroren wurden. Zum gleichen Schluss kamen auch CROCKETT et al. (2001), die die Kryokonservierung in 0,5 ml- und 2,5 ml-Pailletten miteinander verglichen. Weltweit wird Hengstsperma mittlerweile überwiegend in 0,5 ml-Pailletten eingefroren.

## 2.4 Einfrier- und Auftauvorgang

Die Überlebensrate der Samenzellen ist bei der Tiefgefrierung vorwiegend von intrazellulärer Eisbildung und Lösungseffekten abhängig. Die Auswirkung dieser zwei negativ korrelierenden Faktoren ist von der Abkühlungsrate abhängig.

Schon 1970 entwickelte MAZUR die sogenannte Zweifaktorenhypothese, nach der schnelles Einfrieren die Gefahr der Zellschädigung durch intrazelluläre Eisbildung erhöht, während langsames Einfrieren zu einer länger andauernden Wirkung der schädlichen Lösungseffekte führt. WEITZE (1977) beschrieb als Lösungseffekte die Konzentrierung von gelösten Stoffen im extrazellulären Raum infolge des Wasserentzugs durch Eisbildung. Zum osmotischen Ausgleich tritt Wasser aus den Zellen aus, wodurch die intrazelluläre Salzkonzentration ansteigt. Bei langsamen Gefrieraten führt das in Verbund mit einer pH-Wertsenkung zur Sättigung und Präzipitation der Salze (MAZUR 1970).

Die durch Lösungseffekte verursachten Schädigungsmechanismen sind in ihrer Qualität nicht eindeutig beschrieben.

Nach LOVELOCK (1953) werden die Lipide der Membran durch hohe Elektrolytkonzentrationen modifiziert, was eine Veränderung der Permeabilität zur Folge haben soll. Durch die „undichte“ Membran dringen Substanzen in die Zelle ein, die beim Auftauprozess einen osmotischen Schock verursachen.

Nach MERYMAN (1970) resultieren die Schäden aus der Unfähigkeit der Zellen, ab einem bestimmten Volumen, das 55 % des normalen isotonen Zellvolumens entspricht, weiter zu schrumpfen. Da kein Wasser mehr aus den Zellen austreten kann, kommt es zu einer zunehmenden osmotischen Druckdifferenz, die wiederum Schäden an der Membran verursacht.

Der Einfrierverlauf ist besonders vom Phasenübergang „flüssig zu fest“ gekennzeichnet. Das einzufrierende Sperma bleibt im Einfrierverlauf bis  $-5^{\circ}\text{C}$  unter den Gefrierpunkt flüssig, danach setzt bei ca.  $-15^{\circ}\text{C}$  spontan die Kristallisation der umgebenden Flüssigkeit ein. Es kommt zu einer Temperaturkonstanz (Gefrierplateau). Während dieser Phase besteht die Gefahr intrazellulärer Eisbildung. Die Zelle kompensiert den entstehenden Potentialunterschied bei langsamer Temperaturerniedrigung per Exosmose. Dies führt zu einer progressiven Dehydrierung der Zelle und verhindert die intrazelluläre Eisbildung. Bei schneller Temperatursenkung ist die Zelle

hingegen unfähig, das Wasser zeitig genug zu verlieren, um den Potentialausgleich zu bewahren und es kommt im Zellinneren zur Unterkühlung und intrazellulären Eisbildung (MAZUR 1963).

Eine Konsequenz dieser Erkenntnis ist die Aufteilung des Einfriervorganges in verschiedene Phasen mit unterschiedlichen Einfriergeschwindigkeiten. Der mittlere Temperaturbereich (-10 bis -50°C) ist nach MAZUR (1980) die kritische Zone, in der die meisten letalen Schäden auftreten.

Die Entwicklung computergesteuerter Einfriergeräte spielte besonders im Hinblick auf die Kontrollierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Einfrierverfahren eine wichtige Rolle.

BRUEMMER et al. (1963) verwendeten erstmals einen Einfrierautomaten, der mit flüssigem Stickstoff als Kälteträger arbeitete. Während in der Rinderzucht das computergesteuerte Einfrieren inzwischen die ungesteuerten Verfahren vollständig verdrängt hat, wurden bei der Tiefgefrierung von Pferdespermien Mitte der 80er Jahre die ersten vergleichenden Untersuchungen mit einer schnellen Kühlrate im Stickstoffdampf (Styroporbox) und einer moderaten in einem Einfrierautomaten durchgeführt.

Während COCHRAN et al. (1984) keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kühlraten der Verfahren im Hinblick auf die Motilität feststellen konnten, erzielten CRISTANELLI et al. (1985) mit der gesteuerten moderaten Gefriergeschwindigkeit ein um 50% verbessertes Auftauergebnis.

DELIUS (1985) konnte ebenfalls keinen signifikanten Vorteil eines Einfrierverfahrens feststellen. Eine schnelle Einfrierrate führte tendenziell zu besserer Qualität des aufgetauten Hengstsamens. Das Einfrieren in einer Styroporkiste mit flüssigem Stickstoff erwies sich als ungünstiger gegenüber dem computergesteuerten Einfrierprozess mit schneller Kühlrate. Aber der optimale Temperaturverlauf beim Einfrieren und Auftauen hängt von mehreren Faktoren ab.

SENGER et al. (1983) stellten bei der Konfektionierung von Bullensamen und verschiedenen computergesteuerten Kühlraten eine signifikante Interaktion fest. Bei schnellen Gefriergeschwindigkeiten war die Motilität und die Morphologie des aufgetauten Samens in 0,5 ml-Pailletten den anderen überlegen, bei langsamen Kühlraten zeigten die Samenproben der 0,25 ml-Pailletten bessere Auftauergebnisse.

Zu weiteren Faktoren gehören auch der Zelltyp mit seinen inhärenten Eigenschaften und die Verdünnernzusammensetzung. FISER (1990) wies außerdem auf einen wichtigen Zusammenhang zwischen der Glycerinkonzentration und der Einfrier- und Auftaurate hin.

Bei HengstspERMatozoen führte eine schnelle Kühlrate (25°C/min) zu besseren Auftauresultaten als eine Tiefgefriereschwindigkeit von 5°C pro Minute (RÖBBELEN 1993). Im Allgemeinen werden Spermien mit relativ hohen Einfriereschwindigkeiten, welche in der Größenordnung von 15 bis 60°C pro Minute liegen, tiefgefroren (COCHRAN et al. 1984; HÅÅRD u. HÅÅRD 1991; PALMER u. MAGISTRINI 1992; WÖCKENER et al. 1992). Auch WATSON (2000) stellte fest, dass sich relativ hohe Kühlraten günstig auf die Spermaqualität auswirken.

Die Auftaugeschwindigkeit muss an die Gefriereschwindigkeit angepasst sein (MAZUR 1980).

Beim Auftauen werden schnellere Geschwindigkeiten von 1000-2000°C/min bevorzugt (WATSON 1995). Auch FISER (1990) schlug eine Auftaugeschwindigkeit von 1200°C/min vor. Die Wassertemperatur, die Dauer der Wärmeexposition, die Wasserbewegung, die Größe, Form und der Abstand des Gefriergrundes von der Verpackungswand sowie das Material der Verpackung beeinflussen den Auftauverlauf. Der Verlauf der Auftautemperatur hat deutliche Auswirkungen auf die Spermienqualität, denn die Wärmeleitfähigkeit des flüssigen Aggregatzustandes ist gegenüber dem festen um den Faktor 3 vermindert (WEITZE et al. 1987). Daraus resultiert beim Auftauen von peripher nach zentral eine zunehmend schlechtere Leitfähigkeit, so dass zentral gelegene Bezirke langsamere Auftauraten durchlaufen und damit für schlechtere Auftauergebnisse von großvolumigen Einfrierbehältnissen verantwortlich sind (BARON 1986; FAZANO 1986).

Beim Auftauen des Makrotüb® wird eine Auftauzeit von 40 Sekunden bei 50°C empfohlen (MARTIN u. KLUG 1979; MARTIN et al. 1979; CHAVES VIEIRA 1980). Zum Auftauen von tiefgefrorenem Hengstsaamen in Normalpailletten (0,5 ml) wird für die Besamungspraxis eine Temperatur von 37 °C für die Dauer von 30 Sekunden empfohlen (COCHRAN et al. 1984; PALMER u. MAGISTRINI 1992; WÖCKENER et al. 1992).

LOOMIS et al. (1983) bevorzugten eine Temperatur von 38°C für 30 Sekunden.

COCHRAN et al. (1984) verglichen die Auftauresultate bei 0,5 ml fassenden Pailletten, die bei 75°C in 7 Sekunden bzw. bei 37°C in 30 Sekunden aufgetaut wurden. Höhere Auftautemperaturen ergaben eine höhere Anzahl motiler Spermien und erwiesen sich damit als überlegen. Die Autoren betonten, dass bei dem schnellen Auftauen die Zeit exakt eingehalten werden muss. Schon ein 2 Sekunden längeres Verbleiben im Wasserbad mit 75°C könne zu einem Anstieg der Samentemperatur über 40°C und damit zu starken Zellschädigungen führen. Auch das Auftauen bei 75°C für 7 Sekunden mit anschließender Inkubation für 10 – 30 Sekunden bei 35°C wird beschrieben (HÅÅRD u. HÅÅRD 1991).

## 2.5 Einfluss weiterer Faktoren auf die Kryokonservierung von Hengstsperma

Aufgrund der großen Variabilität der Samenqualität produzieren nur etwa 25% aller Zuchthengste Samen, der nach Tiefgefrierung und Auftauen zu ähnlichen Trächtigkeitsraten pro Saison führt wie nach Frischsamenübertragung (AMANN u. PICKETT 1987). Einige Autoren (AMANN u. PICKETT 1987; SAMPER et al. 1994) berichten über die individuelle Einfrierfähigkeit von Hengstsperma, das sich unabhängig von der Qualität des Frischsamens für den Gefrierprozess besser (good freezers) oder schlechter (bad freezers) eignet.

Außerdem lassen sich unterschiedliche Ejakulate des gleichen Individuums nicht immer gleich gut kryokonservieren (PICKETT et al. 1975a). Auch MERKT (1976) und JASKO et al. (1991) fanden große individuelle Schwankungen in der Spermaqualität von Hengsten.

MAGISTRINI et al. (1997b) führten Untersuchungen an nativem Hengstsperma und nach der Kryokonservierung durch. Zur Bestimmung der Samenqualität benutzten sie eine computergestützte Motilitätsanalyse. Hierbei ergab sich nur ein geringer Zusammenhang zwischen den Ergebnissen direkt nach der Ejakulatgewinnung und den Ergebnissen nach dem Auftauen der kryokonservierten Proben. VIDAMENT et al. (1997) kamen zu gleichen Ergebnissen und konnten die Auftauqualität nicht mit der Frischsamenqualität korrelieren.

DIGRASSI (2000) zeigte, dass sich sowohl bei der subjektiven Beurteilung der Motilität von Tiefgefriersamenproben, als auch bei der flowzytometrischen Bestimmung der Integrität der Spermachromatinstruktur, der Plasmamembranintegrität und des Mitochondrienmembranpotentials große individuelle Unterschiede ergaben.

MAGISTRINI et al. (1987) konnten saisonal bedingte Unterschiede bei aufgetautem Tiefgefriersperma von Hengsten feststellen. Dabei wurden die Ejakulate von 6 Hengsten über ein Jahr lang kryokonserviert und anschließend untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine bessere Kryokonservierbarkeit außerhalb der Paarungssaison, jedoch war der saisonale Unterschied, verglichen mit den individuellen Variationen, nur sehr gering.

Auch WARNKE et al. (2000) konnten durch computergestützte Analyse der Motilität von aufgetautem Hengstsperma einen geringen jahreszeitlichen Unterschied feststellen. Bei den im Winter gewonnen Proben betrug der prozentuale Anteil vorwärts-beweglicher Spermien nach dem Auftauen rund 16 %. Bei Samenproben vom Frühjahr betrug dieser Wert 11 %.

Zu einem anderen Ergebnis kamen PICKETT et al. (1975a). Sie konnten nachweisen, dass zur Kryokonservierung Hengstsperma sowohl in der Decksaison als auch außerhalb der Decksaison verwendet werden kann. Sie beurteilten die Spermaqualität anhand der Motilität der Spermien nach dem Auftauen und fanden keinen signifikanten saisonalen Unterschied.



## 3. Material und Methoden

### 3.1 Allgemeine Angaben zu Material und Methoden

#### 3.1.1 Versuchstiere

Für die vorliegenden Untersuchungen standen insgesamt 34 Zuchthengste des Landgestütes Niedersachsen zur Verfügung. Die Hengste waren zwischen 5 und 14 Jahre alt und standen alle während der Decksaison (März bis Juni) im Zuchteinsatz. Die Hengste nahmen am standardisierten Einfrierprogramm von Oktober bis Februar teil.

Die Ejakulate wurden im Januar, Februar und Juni gewonnen.

Die Hengste waren in Einzelboxen mit Stroheinstreu aufgestellt und erhielten eine Fütterung aus Heu, Hafer und pelletiertem Mischfutter. Aus Selbsttränken stand zu jeder Zeit Wasser zur Verfügung. Das Allgemeinbefinden und die Sexualfunktion waren während der Versuchsdauer ungestört.

Für die Untersuchungen wurden die Hengste in zwei Gruppen aufgeteilt:

- 1.) Hengste mit guter Tiefgefriereignung (Versuchsreihe I: n=7) (Versuchsreihe II: n=6) und Hengste mit guter Haltbarkeit bei gekühlter Lagerung (n=4)
- 2.) Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung (Versuchsreihe I: n=7) (Versuchsreihe II: n=6) Hengste mit schlechter Haltbarkeit bei gekühlter Lagerung (n=4)

Dazu wurde 6 Wochen vor Versuchsbeginn routinemäßig (montags, mittwochs und freitags) mit der Samenentnahme begonnen. Hengste, die in mehr als drei von zehn vor Versuchsbeginn gewonnenen Ejakulaten eine Vorwärtsmotilität von weniger als 35 % nach dem Auftauen bzw. nach 24 Std. Lagerung bei 5°C aufwiesen, wurden der Gruppe der Hengste mit ungünstiger Tiefgefriereignung bzw. Haltbarkeit zugeordnet. Die Hengste mit Auftaumotilitäten bzw. Haltbarkeit oberhalb dieser Kriterien wurden der Gruppe der Hengste mit guter Tiefgefriereignung bzw. Haltbarkeit zugeordnet.

### 3.1.2 Gewinnung der Ejakulate

Die Samengewinnung erfolgte dreimal wöchentlich (Montag, Mittwoch, Freitag) an einem Phantom (Modell „Celle“, Klug 1990) mittels künstlicher Scheide (Modell „Hannover“, Klug 1990) in Anwesenheit einer rossigen Stute. In die künstliche Scheide wurde eine Einmalschlauchfolie (Fa. Minitüb, Tiefenbach) eingezogen. Als Auffanggefäße dienten sterile, skalierte Glasflaschen, die mit einem Gazefilter (Fa. Minitüb, Tiefenbach) versehen waren, um grobe Verunreinigungen und den gelhaltigen Anteil vom Rest des Ejakulates abzutrennen.

### 3.1.3 Untersuchung des Nativsamens

Der Samen wurde unmittelbar nach der Gewinnung verarbeitet. Zuerst wurde ein Ausstrich des nativen Spermas angefertigt, welcher zur Bestimmung der Morphologie mit einer Eosin-Negrosin Färbung auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet wurde.

Zusätzlich wurden von jedem Ejakulat 2 ml Nativsperma in ein verschraubbares Röhrchen (Fa. Greiner, Frickenhausen) unmittelbar nach der Samenentnahme abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-196^{\circ}\text{C}$  zur Untersuchung der Spermachromatinstruktur (SCSA™) aufbewahrt.

Jedes Ejakulat wurde mit Hilfe des üblichen Aufbereitungsprotokolles untersucht:

Dazu wurde jedes Ejakulat makroskopisch auf Farbe, Konsistenz und Beimengungen untersucht. Das Volumen wurde anhand der Milliliter-Skala des Messzylinders abgelesen und die Dichte mittels eines Photometers („Spermacue“, Fa. Minitüb®, Landshut) bestimmt. Die Gesamtspermienzahl ergibt sich aus dem Produkt von Volumen und Dichte und wird in Milliarden-Einheit angegeben. Die Beurteilung der Motilität im Nativsamen erfolgte unter einem Phasenkontrastmikroskop mit Wärmeplatte ( $37^{\circ}\text{C}$ ) bei 200-facher Vergrößerung. Es wurde der prozentuale Anteil von vorwärts-, orts- und unbeweglichen Spermien geschätzt.

Zusätzlich wurde mit modifiziertem Magermilchverdünner (INRA 82, Zusammensetzung s. Anhang) ein Teil des Nativspermas auf eine Dichte von 50 Millionen Spermien/ml verdünnt und als Halteprobe für spätere Untersuchungen mit dem MIKA Motion Analyser Windows Version 1.1 (Stroemberg - Mika, Montreux, Schweiz) und Färbungen am Flowcytometer aufbewahrt (s. 3.3.1 Untersuchungsparameter, Motilität).

### 3.1.4 Aufbereitung der Ejakulate

Die einzelnen Ejakulate wurden für die verschiedenen Zentrifugationsverfahren in mehrere Portionen gleichmäßig aufgeteilt und mit dem jeweils entsprechenden Zentrifugationsverdünner auf  $50 \times 10^6$  Spermien/ml verdünnt. Für die Zentrifugation wurden 46 ml der jeweiligen Spermiesuspension in 50 ml Plastikröhrchen mit konischem Boden (Sarstedt) oder in silikonisierte Zentrifugengläser mit einem Volumen von ebenfalls 50 ml eingefüllt. Je nach Zentrifugationsverfahren wurde mit unterschiedlicher Dauer und Beschleunigung bei freiem Auslauf (Hettich Tischzentrifuge Universal 32, Ausschwingrotor 4-fach, Kapazität 4x 100 ml, Radius 1,50 cm) bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes mit einer Wasserstrahlpumpe wurde das Zentrifugat unter Zugabe von 1-2 ml TG-Verdünner (Zusammensetzung s. Anhang) mit Hilfe eines Rüttlers resuspendiert. Danach wurde die Dichte der Spermiesuspension mit Hilfe der Thomazählkammer („THOMA neu“®, Fa. Hecht, Sontheim) erneut bestimmt. Anschließend erfolgte die Endverdünnung der Spermiesuspension, wenn nicht anders beschrieben, auf  $200 \times 10^6$  Spermien/ml. Als Gefrierschutzzusatz wurden 2,5% Glycerin zugesetzt.

### 3.1.5 Kühlung vor der Tiefgefrierung und Konfektionierung

Die Spermiesuspension wurde nach dem Resuspendieren in 50 ml Plastikgefäße (Sarstedt) gefüllt. Diese Auffanggefäße wurden in 300 ml Plastikbecher gestellt, die bis zur selben Höhe wie die Spermiesuspension mit ca. 21°C warmem Leitungswasser gefüllt waren. Wenn nicht anders beschrieben, wurden die so von einem Wassermantel umgebenen Proben in einer Kühlvitrine innerhalb von 120 min auf 5°C langsam abgekühlt. Der die Proben umgebende Wassermantel diente dabei sowohl der Verminderung der Temperaturschwankung innerhalb des Spermienmediums als auch der Reduzierung der Kühlrate.

Die auf 5°C abgekühlte Spermasuspension wurde in 0,5 ml fassende Kunststoffpailletten (Fa. Minitüb®, Landshut) mit einem Abfüllautomaten (Fa. IMV, L'Aigle, Frankreich) abgefüllt und die Pailletten verschweißt. Um Temperaturunterschiede zu vermeiden, waren die Pailletten falls nicht anders beschrieben, ebenfalls auf die Temperatur der Spermasuspension abgekühlt. Der Abfüllungsvorgang fand in einem Kühlraum bei 5°C statt.

### **3.1.6 Kryokonservierung der Samenproben**

Für den Einfrierprozess stand der Tiefgefrierautomat (Minidigitcool®, Fa. IMV, L'Aigle, Frankreich) mit automatischer Steuerung für horizontale Tiefgefrierung zur Verfügung. 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 Einfriergeschwindigkeit von 60°C/min. von +5°C auf -140°C abgekühlt, ca. 15 Minuten bei -140°C gehalten und anschließend manuell in eine stickstoffgefüllte Styroporbox überführt und bis zur Auswertung in entsprechenden Lagerungscontainern in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

Das Auftauen aller Pailletten erfolgte bei 37°C im Wasserbad für 30 Sekunden.

Direkt nach dem Auftauen erfolgte die Motilitätsbeurteilung des Spermas. Anschließend wurden die Untersuchungen am Durchflusszytometer durchgeführt.

## **3.2 Versuchsspezifische Angaben**

### **3.2.1 Versuchsaufbau**

Zur Untersuchung der verschiedenen Aufbereitungsverfahren im Rahmen der Kryokonservierung von Hengstsperma wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Der Aufbau dieser Versuchsreihen ist schematisch in Abb.1-4 dargestellt.

Der Einfluss verschiedener Zentrifugationsverfahren auf Samenverlust und Tiefgefriersamenqualität wurde in Versuchsreihe I untersucht.

In Versuchsreihe II wurden verschiedene Zentrifugationskissen und -verdünner eingesetzt und zusätzlich die Auswirkungen der gekühlten Lagerung von 24 Std. vor dem Einfrieren mit dem Einfrieren nach 2,5 Std. auf die Samenqualität verglichen.

Das Ziel in Versuchsreihe III war es, die Auswirkung verschiedener Abkühlungsgeschwindigkeiten von 22°C auf 5°C auf die Qualität von Tiefgefriersamen zu untersuchen.

Der Einfluss unterschiedlich hoher Samenkonzentrationen in 0,5-ml-Pailletten auf die Tiefgefriersamenqualität wurde in der Versuchsreihe IV überprüft.

Abb.1: Versuchsreihe I: Zentrifugation

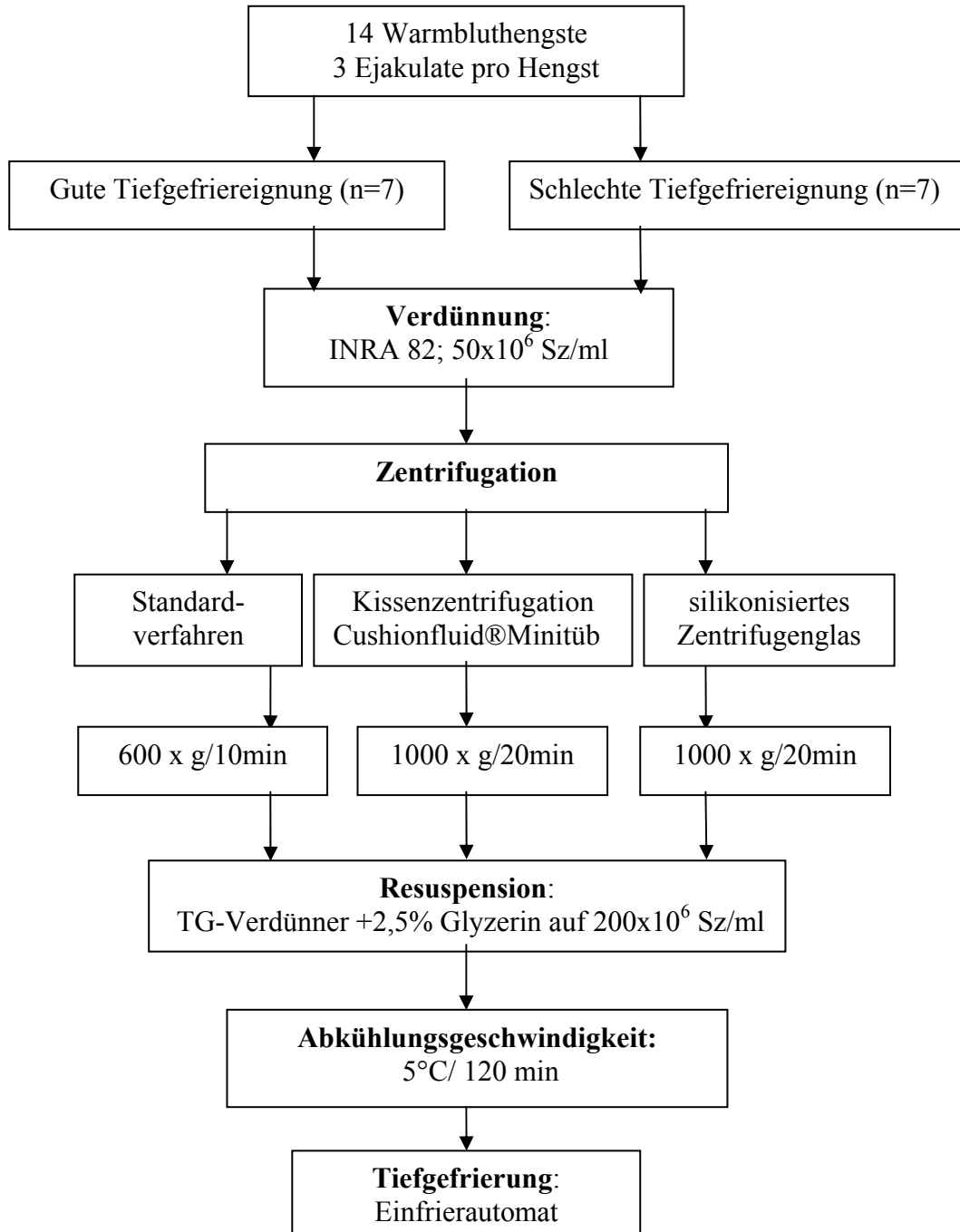


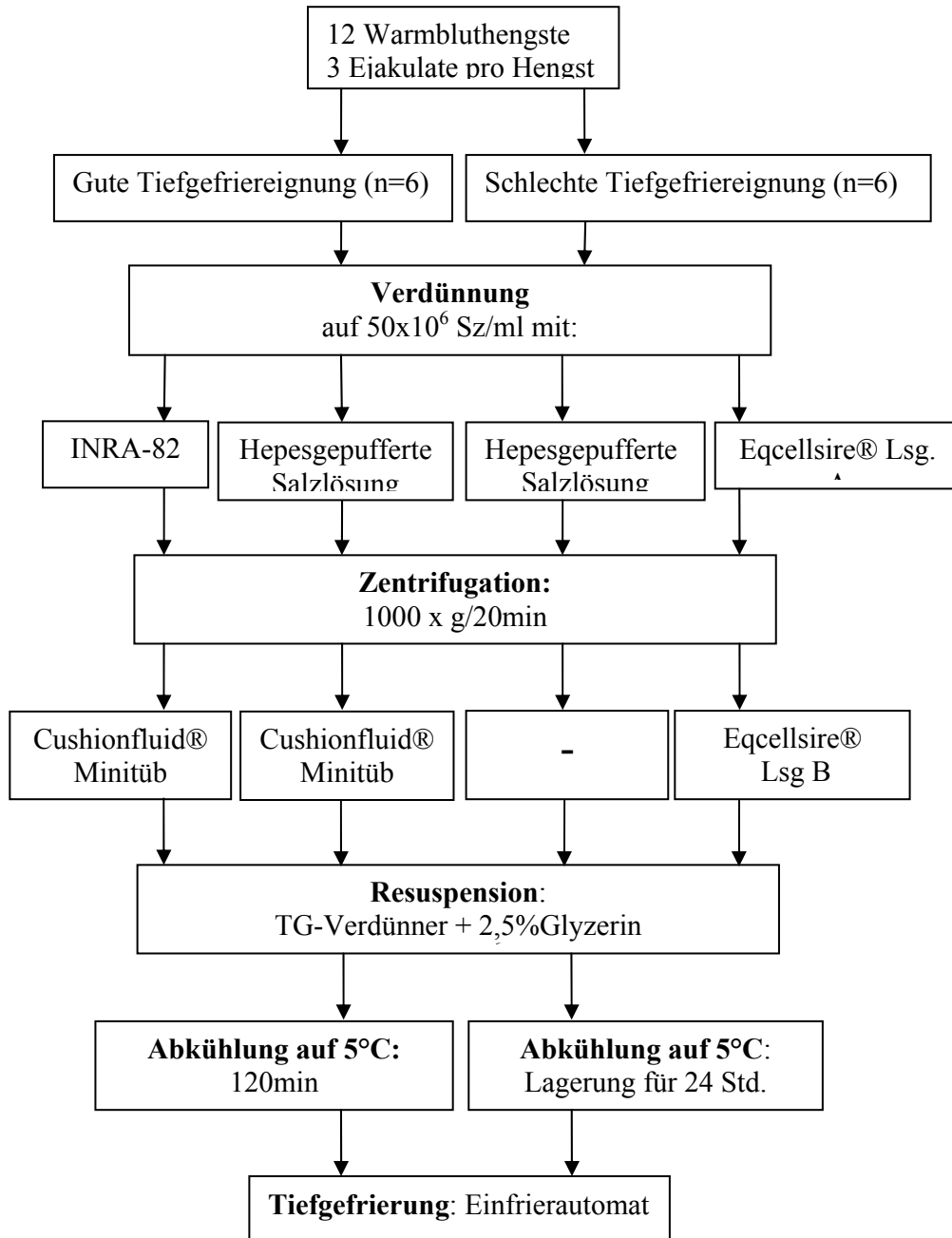
Abb.2: **Versuchsreihe II:** Zentrifugation und Lagerungsdauer

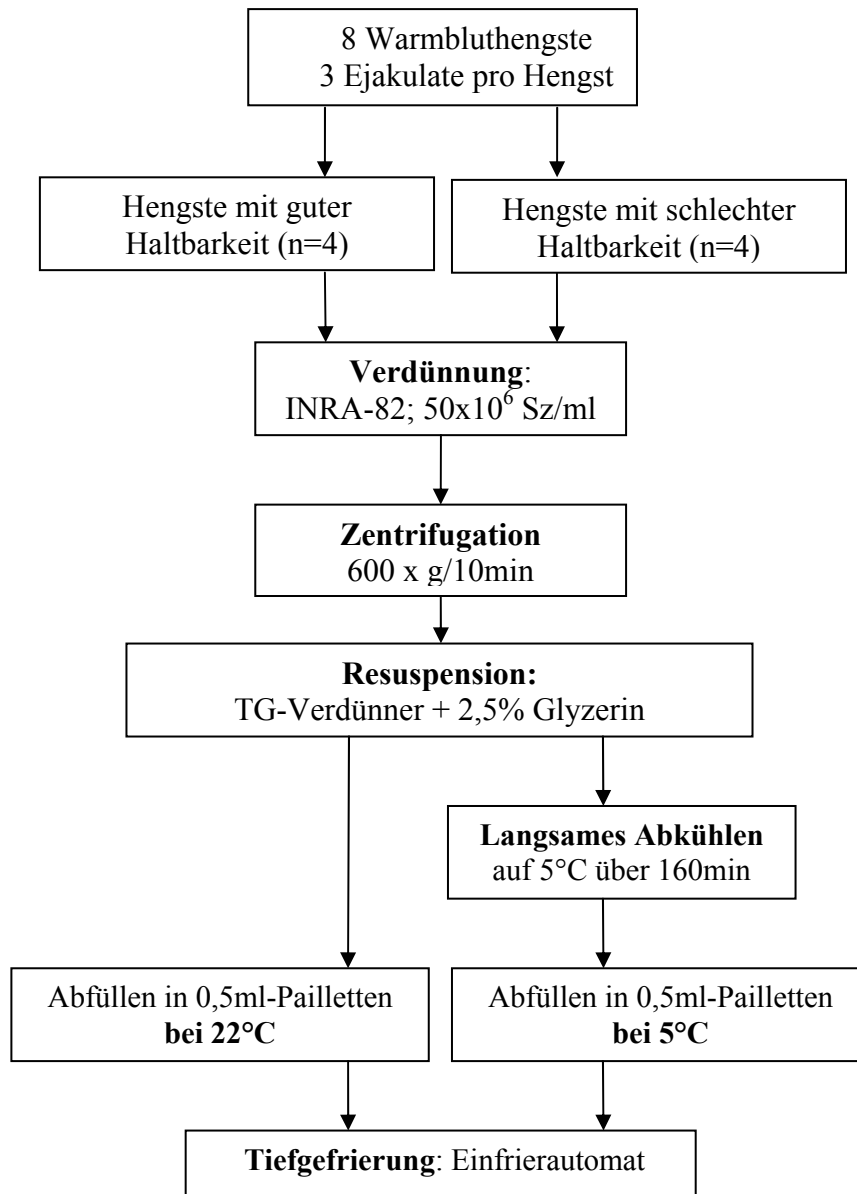
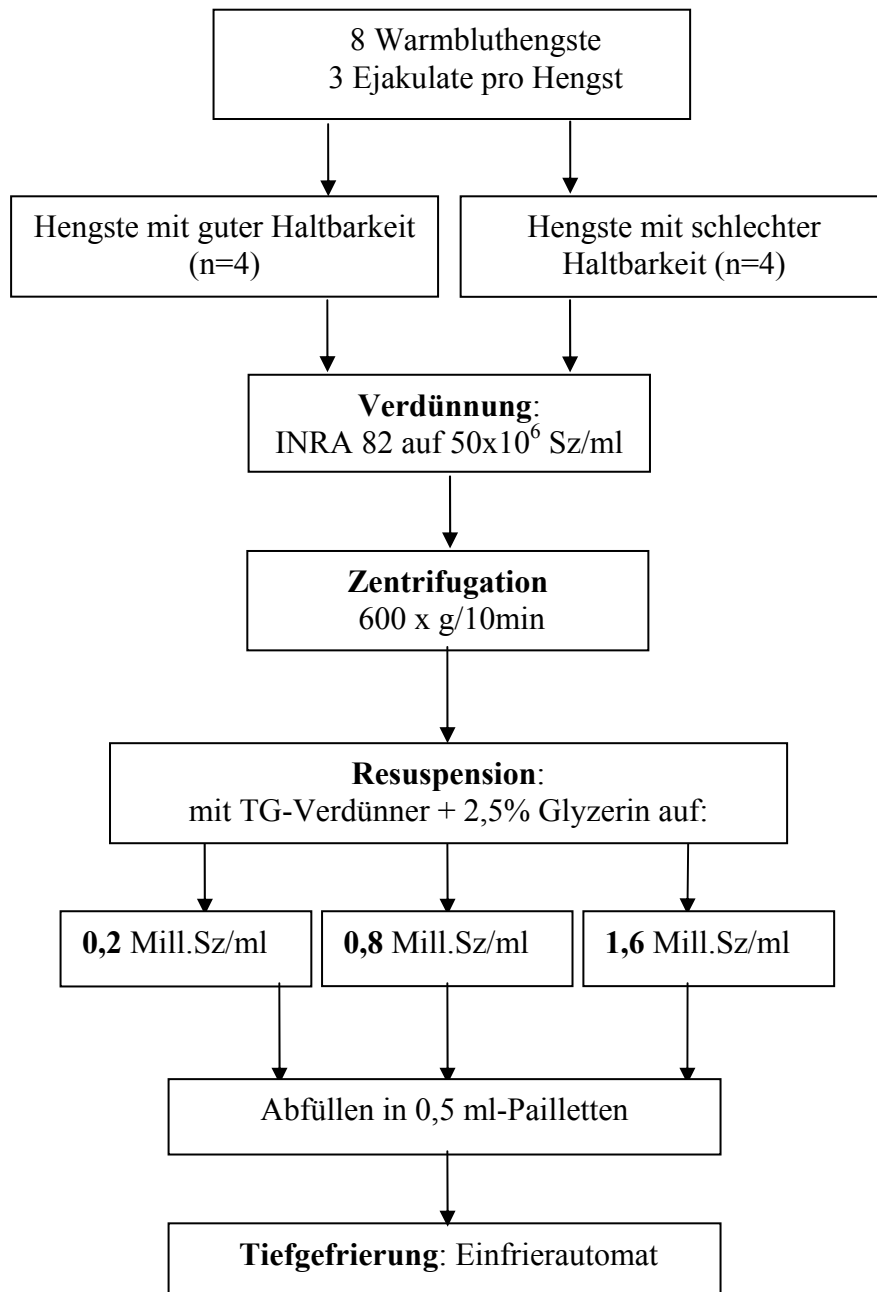
Abb. 3: **Versuchsreihe III:** Abkühlungsgeschwindigkeit

Abb. 4: **Versuchsreihe IV:** Samenzellkonzentration



### 3.2.2 Versuchsreihe I: Zentrifugation

Der Einfluss der Zentrifugationstechnik auf den Spermienverlust und auf die Gefriersamenqualität wurde an Ejakulaten von 14 Hengsten überprüft. Dazu wurden die Hengste in zwei Gruppen mit guter (n=7) bzw. ungünstiger Tiefgefriereignung (n= 7) aufgeteilt. Im Abstand von zwei Tagen wurden pro Hengst 3 Ejakulate gewonnen und untersucht.

Es wurden drei verschiedene Zentrifugationsmethoden (A, B, C) miteinander verglichen.

#### 3.2.2.1 Verdünnung und Aufbereitung

In diesem Versuch wurden alle Ejakulate mit Magermilchverdünner (INRA-82) auf  $50 \times 10^6$  Spermien/ml verdünnt. Der verdünnte Samen wurde bei Raumtemperatur in drei gleiche Aliquots à 46 ml aufgeteilt, d.h. jede Portion enthielt  $2,3 \times 10^9$  Samenzellen. Zwei Aliquots wurden in sterile 50 ml Plastikzentrifugenröhrchen (Sarstedt) jeweils einmal mit und einmal ohne Kissen gegeben, während die dritte Probe in ein silikonisiertes steriles Zentrifugenglas mit konischer Form gefüllt wurde.

#### 3.2.2.2 Zentrifugation

Es wurde nach drei verschiedenen Methoden zentrifugiert. Als Kontrolle (Methode A) diente das übliche Standardverfahren. Dabei wurde das verdünnte Ejakulat im Sarstedtröhrchen ohne Kissen bei einer Zentrifugalbeschleunigung von  $600 \times g$  für 10 Minuten zentrifugiert.

Bei Methode B wurde das verdünnte Sperma in einem zweiten Sarstedtröhrchen mit 4 ml einer zähflüssigen, dichten und isotonischen Lösung (Cushion-Fluid®, Minitüb, Landshut, Deutschland) unterlegt und bei  $1000 \times g$  für 20 Minuten zentrifugiert.

Die dritte Probe (Methode C) wurde in ein steriles, silikonisiertes Zentrifugenglas gefüllt und ebenfalls bei  $1000 \times g$  und für 20 Minuten zentrifugiert.

### 3.2.2.3 Resuspension und Tiefgefrierung

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis auf ca. 3,5-4 ml knapp über der spermienreichen Phase bei Methode A und C mit einer Wasserstrahlpumpe vorsichtig entfernt. Bei Methode B befand sich die spermienreiche Phase zwischen Kissen und Überstand. Hier wurde zuerst der Überstand abgesogen und dann vorsichtig das Kissen mit einer auf einer Spritze aufgesetzten Kanüle entfernt.

Von allen Proben wurde die Dichte bestimmt und die Rückgewinnungsrate erfasst. Danach wurden die Proben mit TG-Verdünner (siehe Anhang) auf eine Endkonzentration von  $200 \times 10^6$  Samenzellen/ml verdünnt, abgekühlt und eingefroren.

### 3.2.3 Versuchsreihe II: Zentrifugation und Lagerungsdauer

Der Einfluss der Kissenzentrifugationstechnik mit verschiedenen Zentrifugationsverdünnern und einer Lagerungszeit von 24 Std. bei  $5^\circ\text{C}$  vor dem Einfrieren (Teil 2) im Vergleich zum direkten Einfrieren nach der Aufbereitung (Teil 1) wurde an Ejakulaten von 12 Hengsten überprüft. Die Hengste wurden entsprechend ihrer bekannten Tiefgefrierfähigkeit in eine gute ( $n=6$ ) und schlechte ( $n=6$ ) Gruppe aufgeteilt. Von jedem Hengst wurden drei Ejakulate im Abstand von zwei Tagen gewonnen.

Es wurden vier verschiedene Zentrifugationsmethoden (A, B, C, D) miteinander verglichen.

#### 3.2.3.1 Verdünnung

Nach der Gewinnung wurde jedes Ejakulat in vier Aliquots aufgeteilt und für die vier verschiedenen Verfahren mit unterschiedlichen Zentrifugationsverdünnern auf  $50 \times 10^6$  Samenzellen/ml verdünnt. Bei Methode A und B wurde als klarer Zentrifugationsverdünner HBS (Hepes buffered saline, siehe Anhang) verwendet. Bei Methode C wurde das Sperma mit Eqcellsire® Lösung A +2% Eigelb verdünnt und bei Methode D mit Magermilchverdünner (INRA-82). Die vier Aliquots à 46 ml wurden in sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen aus Plastik mit konischem Boden gefüllt. Die Gesamtspermienzahl pro Portion betrug  $2,3 \times 10^9$ .

### 3.2.3.2 Zentrifugation

Für die Zentrifugation wurden bei Methode B, C und D 46 ml der Spermasuspension in ein 50 ml Plastikgefäß (Sarstedt) mit konischen Boden gefüllt und mit 4 ml einer dichten, zähflüssigen und isotonischen Lösung unterschichtet. Bei Methode B und D wurde Cushion-fluid® (Minitüb, Landshut) und bei Methode C wurde Eqcellsire® Lösung B (IMV Technologies, France) verwendet.

Bei Methode A wurde die Spermasuspension in ein 50 ml fassendes silikonisiertes, konisches Zentrifugenglas gefüllt.

Die Zentrifugation erfolgte bei allen Methoden über 20min bei 1000 x g und Raumtemperatur.

### 3.2.3.3 Resuspension und Tiefgefrierung

Wie in Versuchsreihe I (Kapitel 3.2.2.3) wurde das Pellet resuspendiert und die Rückgewinnungsrate bestimmt.

Danach wurden aus jedem Pellet zwei gleichgroße Aliquots gebildet. Teil 1 wurde mit TG-Verdüner auf  $200 \times 10^6$  Samenzellen/ml verdünnt, abgekühlt und eingefroren.

Teil 2 wurde mit TG-Verdüner ohne Zugabe von Glycerin auf  $400 \times 10^6$  Samenzellen/ml verdünnt, langsam auf 5°C abgekühlt und dann bei 5°C über 24 Std. gelagert. Vor dem Einfrieren wurden die Proben mit TG-Verdüner unter Zugabe von 2,5% Glycerin auf  $200 \times 10^6$  Samenzellen/ml verdünnt und eingefroren.

### 3.2.4 Versuchsreihe III: Abkühlungsgeschwindigkeit

Der Einfluss des langsamen Abkühlens von 22°C auf 5°C mit Zugabe von Glycerin bei 22°C vor dem Einfrieren (Methode A) und des direkten Einfrierens von 22°C ohne Temperaturangleichung (Methode B) auf die Tiefgefriersamenqualität wurde an Ejakulaten von 8 Hengsten überprüft. Dazu wurden die Hengste hinsichtlich der Toleranz ihres Samens gegenüber Abkühlungsprozess und Lagerung für 24 Std. Lagerung bei 5°C aufgeteilt (gut: n=4; schlecht: n=4). Es wurden pro Hengst 3 Ejakulate gewonnen und innerhalb eines Tages untersucht.

### **3.2.4.1 Verdünnung und Zentrifugation**

Die Ejakulate wurden nach der Gewinnung mit Magermilchverdünner INRA-82 (Zusammensetzung s. Anhang) auf  $50 \times 10^6$  Samenzellen/ml verdünnt. Diese Spermasuspension wurde in 100 ml Zentrifugengläser für 10min bei  $600 \times g$  und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Daraufhin wurde das Zentrifugat unter Zugabe von 1-2 ml Magermilchverdünner (INRA-82), dem 2% Eidotter zugegeben waren, mit gleichzeitiger Hilfe eines Rüttlers resuspendiert.

Die Endkonzentration wurde auf  $200 \times 10^6$  Spermien/ml mit TG-Verdünner und 2,5% Glycerin eingestellt.

### **3.2.4.2 Anpassungszeit vor der Tiefgefrierung**

Bei Methode A wurde zur langsamen Abkühlung von  $22^\circ\text{C}$  auf  $5^\circ\text{C}$  ( $0,1-0,05^\circ\text{C}/\text{min}$ ) die Spermasuspension, die zuvor in 50 ml Plastikgefäßen (Sarstedt) gefüllt worden war, in mit Leitungswasser gefüllte Becher gestellt. Die Becher fassten ein Volumen von ca. 300 ml und wurden der Füllhöhe der Spermasuspension entsprechend mit Leitungswasser in Raumtemperatur aufgefüllt. Umgeben von diesem Wassermantel wurden die Proben in einen Kühlschrank bei  $5^\circ\text{C}$  gestellt, bis sie auf die gewünschte Temperatur von  $5^\circ\text{C}$  abgekühlt waren (ca. 2,5 Std.). Danach wurde die Spermasuspension in ebenfalls über den selben Zeitraum im Kühlschrank abgekühlte Pailletten automatisch abgefüllt und nach weiteren 2 Std. eingefroren.

Bei Methode B wurde die Spermasuspension nach der Endverdünnung mit TG-Verdünner und der Zugabe von Glycerin bei Raumtemperatur in Pailletten gefüllt und direkt eingefroren. Es fand keine Anpassung auf die Temperatur von  $5^\circ\text{C}$  vor dem Einfrieren statt.

### **3.2.5 Versuchsreihe IV: Samenzellkonzentration**

Der Einfluss verschiedener Spermienkonzentrationen in 0,5 ml-Pailletten auf die Qualität von Tiefgefriersamen wurde an einer Gruppe von 8 Hengsten mit guter ( $n=4$ ) und schlechter ( $n=4$ ) Tiefgefriereignung untersucht.

### 3.2.5.1 Verdünnung und Zentrifugation

Das Ejakulat wurde nach der Gewinnung auf  $50 \times 10^6$  Spermien/ml mit Magermilchverdünner INRA-82 (Zusammensetzung s. Anhang) verdünnt.

Die Zentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur für 20 min bei  $1000 \times g$  in silikonisierten Zentrifugengläsern. Direkt nach der Beendigung des Zentrifugationsvorganges wurde der Überstand mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe bis auf wenige Millimeter oberhalb des Pellets entfernt.

### 3.2.5.2 Resuspension und Einfrieren

Die Resuspension erfolgte durch vorsichtiges Aufschwenken mit entsprechender Menge an TG-Verdünner, versetzt mit 2,5% Glyzerin der jeweiligen Endkonzentration. Es wurden jeweils nur wenige Milliliter zugesetzt, um die vorgegebenen hohen Endkonzentrationen von 0,2, 0,8 und 1,6 Mrd. Samenzellen/ml zu erreichen. Aufgrund teilweise niedriger Gesamtspermienzahlen war es allerdings nicht immer möglich, bei der Resuspension eine Samenzellkonzentration von 1,6 Mrd. Samenzellen/ml zu erreichen. Die Dichte wurde mit einer Thoma Zählkammer („THOMA neu“®, Fa. Hecht, Sontheim) bestimmt. Vor der Konfektionierung wurde der resuspendierte Samen bei Raumtemperatur auf eine Konzentration von 1,6 Mrd Samenzellen/ml, auf 0,8 Mrd Samenzellen/ml und auf die Standardkonzentration von 0,2 Mrd Samenzellen/ml durch Zugabe entsprechender Mengen des TG-Verdünners eingestellt.

Die in drei verschiedenen Stufen konzentrierten Spermasuspensionen wurden langsam wie in Versuchsreihe I und II beschrieben abgekühlt und automatisch in Pailletten abgefüllt. Pro Ejakulat ergaben sich 3 bis 5 Pailletten der niedrigeren Samenzellkonzentrationen und 1 bis 3 Pailletten der hohen Konzentrationen. Bei zu geringer Gesamtspermienzahl musste auf Proben der hohen Konzentration verzichtet werden.

### 3.3 Untersuchungsverfahren

#### 3.3.1 Motilität

Die Beurteilung der Spermienmotilität erfolgte 6 Std. nach der Gewinnung als auch direkt nach dem Auftauen der einzelnen Proben bei den verschiedenen Versuchsreihen. Zum Vergleich der verschiedenen Zentrifugationsverfahren (Versuchsreihe I und II) wurde eine Halteprobe des jeweiligen Verfahrens im Anschluss an die Zentrifugation mit INRA-82 auf  $50 \times 10^6$  Sz/ml resuspendiert und zusammen mit einer Halteprobe unzentrifugierten Spermias als Kontrollwert nach 24 Std. Lagerung im Kühlschrank bei 5°C untersucht.

Für die Motilitätsmessung wurden die Proben mit INRA 82-Verdüner auf eine Dichte von 25 Millionen Spermien/ml verdünnt und 5 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurden 5 µl des verdünnten Spermias mit einer Eppendorf-Pipette in eine auf 37°C vorgewärmte Makler-Kammer (Fa. Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) pipettiert. Die Messung der Motilitätsparameter der Spermien erfolgte computervideomikrographisch mit dem MIKA Motion Analyser, Windows Version 1.1 (Stroemberg - Mika, Montreux, Schweiz) und wurde an fünf Gesichtsfeldern pro Kammerfüllung durchgeführt. Mit einer Videokamera wurden die fünf Felder auf den Monitor übertragen und danach der jeweilige Mittelwert aus den fünf Messungen errechnet. Es wurden folgende Motilitätsparameter bestimmt:

- Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien (pms)
- lineare Geschwindigkeit: µm/s (Velocity Straight Line = VSL)
- kurvilineare Geschwindigkeit: µm/s (Velocity Curve Linear = VCL)
- mittlere Geschwindigkeit: µm/s (Velocity Average Path = VAP)

Je nach Geschwindigkeitsgrenze (siehe Einstellungsparameter Tabelle 1) wurden die Spermien den Kategorien vorwärts-, orts- oder unbewegliches Spermium zugeteilt.

Bei der kurvilinearen Geschwindigkeit (VCL) wurde die Geschwindigkeit (µm/s) angegeben, die entlang der vom Kopfschwerpunkt tatsächlich zurückgelegten Bahn gemessen worden ist. Die lineare Geschwindigkeit (VSL) entspricht der Geschwindigkeit (µm/s) entlang der geraden Strecke

zwischen Start- und Endpunkt der vom Spermium zurückgelegten Bahn. Die Geschwindigkeit entlang der geglätteten Bahn ( $\mu\text{m/s}$ ) wird als mittlere Geschwindigkeit (VAP) bezeichnet.

Alle auf ihre Motilität untersuchten aufgetauten Spermaproben wurden in die weitere Auswertung mit einbezogen, auch wenn die gemessenen Motilitätswerte nicht den Mindestanforderungen für TG-Sperma entsprachen (mindestens 35% vorwärtsbewegliche Spermien).

***Tabelle 1: Einstellung der Parameter für die Motilitätsanalyse***

Anzahl der Bilder der Sequenz	32 Bilder/sec
Minimale Fläche des Objektes	16 (pixel)
Maximale Fläche des Objektes	300 (pixel)
Maximale Fläche des unbeweglichen Objektes	60 (pixel)
Geschwindigkeitsgrenze für immobile Objekte	15 ( $\mu\text{m/s}$ )
Geschwindigkeitsgrenze für mobile Objekte	50 ( $\mu\text{m/s}$ )
Geschwindigkeitsklassenbreite	3 ( $\mu\text{m/s}$ )
Empfindlichkeit der Schwanzdetektion	1,1 pixel
Schwanzsuche anwenden auf	alle Objekte

### 3.3.2 Morphologie

#### Eosin-Nigrosin-Färbung

Die subjektiv-morphologischen Untersuchungen zur Ermittlung des Anteils an lebenden und toten Samenzellen sowie zur Erkennung pathologischer Spermienformen erfolgten mittels Eosin-Nigrosin-Färbung bei 1000-facher Vergrößerung und Ölimmersion unter einem Phasenkontrastmikroskop (Fa. Leitz). Dazu wurden 25  $\mu\text{l}$  Nativsamen und 25  $\mu\text{l}$  Eosin-Nigrosin-Färbelösung vermischt (BLOM 1950) und nach einer Einwirkungsdauer von einer Minute auf einem Objektträger ausgestrichen. Die morphologischen Veränderungen der jeweils 200 ausgezählten Spermien wurden nach dem Schema von WEITZE (2001) (siehe Tabelle 34, Anhang) prozentual ausgewertet. Bei der Auswertung wurden pathologische Spermienformen an den in Tabelle 34 (Anhang) aufgeführten Lokalisationen berücksichtigt. Aus der Summe aller Veränderungen wurde der Gesamtprozentsatz morphologisch veränderter Spermien als Beurteilungsparameter herangezogen.

### 3.3.3 Durchflusszytometrische Spermauntersuchung

Geräte und Geräteeinstellungen:

Die Auswertung der Spermien erfolgte mit Hilfe des Durchflusszytometers 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 drei verschiedene 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.) an dieses Gerät angeschlossen. Die Bearbeitung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Software-Programm Cellquest™ (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg). Die Auswertung der SCSA™-Daten wurde mit dem Software-Programm DAS Version 4.40 (BEISKER, 1994) vorgenommen.

Die Untersuchungen des Mitochondrienmembranpotentials erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff JC-1 und mit SYTO® 17/FITC-PNA/PI zur Überprüfung der Akrosomenintegrität. Weiterhin wurde für die Bestimmung der Chromatinstruktur der Spermien der SCSA™-Test angewendet. Für die Färbungen SYBR®14 / PI, JC-1 und SYTO® 17 / FITC-PNA /PI wurden einheitliche Geräteeinstellungen am Durchflusszytometer gewählt (s. Anhang). Die Geräteeinstellungen wurden bei der SCSA™ entsprechend den Angaben von EVENSON und JOST (2000) zu Beginn einer jeden Messreihe neu vorgenommen und nach jeder zehnten Messung anhand einer Referenzprobe überprüft (s. Anhang). Bei allen Analyseverfahren wurden 10.000 Spermien pro Probe analysiert.

#### 3.3.3.1 JC-1 und FITC-PNA/SYTO® 17/PI-Färbung, Messung und Auswertung

Für die Bestimmung des Mitochondrienpotentials (MMP) wurde der JC-1-Farbstoff (0,153 mM) (Katalog-Nr.: T-3168, Fa. MoBitec GmbH, Göttingen) eingesetzt. Bei dem Farbstoff handelt es sich um ein membranpermeables Cyanid mit einer delokalisierten positiven Ladung. Der Farbstoff kann sowohl in monomerer Form als auch in Aggregatform vorliegen. Die monomere Form wird in die Mitochondrienmatrix eingeschleust. Da es sich um ein positiv geladenes Molekül handelt, nimmt der Einstrom mit dem Anstieg des Mitochondrienmembranpotentials zu. Bei einem Schwellenwert des Mitochondrienmembranpotentials von 80 bis 100mV werden reversibel JC-1-Aggregate gebildet. Die monomere Form des JC-1 emittiert nach Laseranregung Licht einer Wellenlänge von



527nm im grünen Bereich, die Aggregatform oranges Licht einer Wellenlänge von 590 nm. Somit weisen Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential eine orange Fluoreszenz, Spermien mit niedrigem Mitochondrienmembranpotential eine grüne Fluoreszenz auf.

Bei der Bestimmung des akrosomalen Status wurde zwischen Spermien mit intaktem Akrosom (FITC/PNA-L: Prozentsatz der nicht akrosomenreagierten lebenden Spermien) und solchen mit Akrosomenschäden (FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien) unterschieden. Für die Untersuchung des akrosomalen Status der Spermien wurde die FITC-PNA /SYTO®17 /PI-Färbung nach GARNER et al. (1999) mit veränderten Farbstoffmengen angewandt. Der Farbstoff FITC-PNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; L-7381) besteht aus *Arachis hypogaea* Lectin (PNA), das an Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt ist und das Akrosom anfärbt. Dieses Lektin bindet sich selektiv an die äußere Akrosommembran und emittiert nach Laseranregung grünes Licht. Zusätzlich wird durch den Farbstoff SYTO®17 (Fa. MoBitec GmbH, Göttingen, S-7579, 0,5 mM) und den Farbstoff PI (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-4170, 2,99 mM) die Plasmamembranintegrität und damit die Vitalität der Spermien bestimmt. Bei vitalen Spermien ist die Plasmamembran nicht permeabel für FITC-PNA und PI; SYTO®17 durchdringt auch die intakte Plasmamembran, färbt die DNA der Spermien und emittiert nach Laseranregung Licht im orangen Bereich. Spermien mit intakter Plasmamembran und intakter Akrosommembran färben sich somit nur mit SYTO®17 und fluoreszieren orange. Der Farbstoff PI (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, P-4170, 2,99 mM) dient der Unterscheidung von toten und lebenden Spermien. Bei Schädigung der Plasmamembran wird bei diesem Farbstoff nach Laseranregung rotes Licht emittiert. Die Spermien werden somit hinsichtlich ihrer Plasmamembranintegrität, zum anderen hinsichtlich der Unversehrtheit des Akrosoms, in vier unterschiedlich fluoreszierende Gruppen unterteilt. Man unterscheidet membranintakte Spermien mit intaktem Akrosom (orange Fluoreszenz), membrangeschädigte Spermien mit intaktem Akrosom oder völligem Verlust des Akrosoms (rote Fluoreszenz), membrangeschädigte Spermien mit geschädigtem Akrosom (rot mit grün fluoreszierendem Akrosom) und membranintakte Spermien mit geschädigtem Akrosom (orange mit grün fluoreszierendem Akrosom).

Für die Färbungen wurde das Frischsperma bzw. das Tiefgefriersperma nach Verdünnung mit Tyrode-Medium (s. Anhang) auf eine Endkonzentration von  $5 \times 10^6$  Spermien/ml eingestellt. Das

Frischsperma wurde nach 6 Std. und nach 24 Std. Kühlung und das Tiefgefriersperma direkt nach dem Auftauen gemessen. Bei jedem Test wurden 500 µl der so verdünnten Spermaproben verwendet.

Zur Bestimmung des Mitochondrienpotentials (MMP) mit JC-1-Farbstoff wurden 20 µl Stammlösung mit 180 µl DMSO (= 0,153 mM) vermischt. Danach wurden je 10 µl der verdünnten Färbelösung zu 500 µl Spermien suspension pipettiert. Für die Färbung mit FITC-PNA /SYTO®17 /PI Farbstoff waren alle drei Stammlösungen gebrauchsfertig. Hier wurden zu 500 µl Spermien suspension je 2 µl SYTO, 3 µl PI und 5 µl FITC/PNA dazugegeben. Die Proben wurden im abgedunkelten Raum 15 Minuten bei 37°C in einem Wärmebad (Thermostat, Typ 5320, Fa. Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden sie im Durchflusszytometer bei einer Durchflussrate von 150 bis 300 Spermien pro Sekunde gemessen. Für die FITC-PNA / SYTO® 17 / PI-Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt. Für die JC-1-Färbung wurde anstelle des FL-3 der Filter FL-2 für die orange Fluoreszenz herangezogen. Die Auswertungen wurden nach dem bei KRIENKE (2003) beschriebenen Verfahren vorgenommen. Bei der JC-1-Färbung wurde der prozentuale Anteil der Spermien mit erhöhter Orange fluoreszenz bestimmt. Bei der Auswertung nach der FITC-PNA / SYTO® 17 / PI-Färbung wurden die Spermienköpfe hinsichtlich der vier verschiedenen Populationen eingeteilt. Die Eingrenzung der einzelnen Spermienpopulationen erfolgte mit Hilfe des Analyseprogramms Cellquest™ (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg).

### **3.3.3.2 Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA™)**

Es wurde sowohl in Plastikröhrchen schockgefrorenes Nativsperma (SCSA/DFI) als auch Tiefgefriersperma in Pailletten (SCSA/DFI/P) zur Durchführung der SCSA™ -Messung benutzt. Beide Probenarten wurden bis zur Messung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Plastikröhrchen wurden für 2 Minuten, die Pailletten für 30 Sekunden in einem 38°C warmen Wasserbad aufgetaut. Bei der Durchführung der SCSA™ erfolgte die Probenaufbereitung und Messung nach den Angaben von EVENSON und JOST (2000). Für die Messungen wurden die Filter FL-1 für die grüne Fluoreszenz und FL-3 für die rote Fluoreszenz eingesetzt. Zu Beginn und nach jeder zehnten Probe wurde eine Referenzprobe gemessen. Analysiert wurden 10.000 Spermien pro Samenprobe. Für die computergestützte Bestimmung der Messdaten wurde die in die Auswertung eingehende Spermienpopulation eingegrenzt.

Bei dem Sperm Chromatin Structur Assay<sup>®</sup> handelt es sich um ein Verfahren zur Beurteilung der Integrität der Spermachromatinstruktur. Es beruht auf dem Prinzip, dass abnormal strukturiertes Chromatin eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber physikalisch induzierter Denaturierung besitzt. Durch die Denaturierung der DNA kommt es teilweise zur Trennung der normalerweise doppelsträngig vorliegenden DNA-Moleküle in Einzelstränge. Der Farbstoff Akridinorange lagert sich an die gesamte DNA. Doppelsträngige DNA zeigt grüne Fluoreszenz, einzelsträngige DNA rote Fluoreszenz.

Für jedes einzelne Spermium wurde der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot + grün) ermittelt und nach EVENSON und JOST (2000) als DFI (DNA-Fragmentationsindex) bewertet. Alle DFI-Werte der analysierten Spermien einer Samenprobe wurden in Abhängigkeit ihrer Höhe in einem Verteilungshistogramm dargestellt. Anhand dieses Histogramms wurden der Mittelwert der DFI-Werte und die Standardabweichung (SD) errechnet. Beide Parameter wurden zur besseren Darstellung mit dem Faktor 1000 multipliziert.

Den prozentualen Anteil der Spermien mit erhöhten DFI-Werten an der Gesamtpopulation errechnete das Computerprogramm nach einer zuvor durchgeführten subjektiven Abgrenzung der Spermien mit niedrigen DFI-Werten von solchen mit erhöhten DFI-Werten.

### **3.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Computersoftware „Sigma Stat for Windows“ (Jandel Scientific Cooperation, Erkrath). Es wurden das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung ( $\pm SD$ ) 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 abgesichert.

Die Einflüsse der Faktoren Verfahren und Hengstgruppe sowie deren Wechselwirkungen erfolgte mittels einer multifaktoriellen Varianzanalyse. Im Falle signifikanter Haupteffekte ( $p \leq 0,05$ ) und / oder Wechselwirkungen wurden Mittelwertvergleiche durchgeführt. Die Mittelwertdifferenzen innerhalb der Gruppen und Verfahren wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one way ANOVA) verglichen.

Die Daten der Hengstgruppen wurden zunächst getrennt untersucht, anschließend alle Werte der gesamten Hengstgruppe zusammengefasst und untersucht. Unterschiede zwischen den verwendeten Methoden innerhalb der gesamten Hengstgruppe wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one way ANOVA) geprüft. Unterschiede zwischen den Methoden galten ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  als signifikant.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Versuchsreihe I: Einfluss der Zentrifugation

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss verschiedener Zentrifugationstechniken auf die Samenqualitätsparameter und den Spermienverlust bei Hengstsamen untersucht. Die Effekte wurden sowohl an Frischsamen als auch an Tiefgefriersamen überprüft.

Die Ergebnisse sind für die gesamte Hengstgruppe und für die Gruppen der Hengste mit guter und schlechter Tiefgefriereignung dargestellt.

#### 4.1.1 Einfluss der Methoden auf den Spermienverlust

Die Mittelwertsvergleiche der prozentualen Rückgewinnungsraten bei den verschiedenen Methoden und Gruppen sind in den folgenden Tabellen (Tabelle 2 und 3) dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Einfluss des Faktors Methode ( $p \leq 0,05$ ) auf die Rückgewinnungsrate der Spermien nach dem Zentrifugationsvorgang (Tabelle 2), aber kein signifikanter Einfluss der beiden Hengstgruppen (Tabelle 3). Deutlich zeigt sich in beiden Tabellen, dass der durchschnittliche Spermienverlust bei den drei unterschiedlichen Zentrifugationsmethoden signifikant differierte ( $p \leq 0,05$ ). Am höchsten war die Rückgewinnungsrate bei Methode C und am niedrigsten bei Methode A, wobei die Ergebnisse sowohl für die beiden einzelnen als auch die gesamte Hengstgruppe übereinstimmen.

**Tabelle 2:** Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Rückgewinnungsrate ( $n=14$ ; 3 Ejakulate pro Hengst)

Methode	A ( $\bar{x} \pm sd$ )	B ( $\bar{x} \pm sd$ )	C ( $\bar{x} \pm sd$ )
Rückgewinnungsrate in %	75,6 <sup>a</sup> $\pm$ 2,4	83,2 <sup>b</sup> $\pm$ 4,3	92,2 <sup>c</sup> $\pm$ 5,0

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ ).

Methoden:

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid@Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

**Tabelle 3:** Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Rückgewinnungsrate bei Hengsten mit guter und schlechter Tiefgefriereignung (n=7; 3 Ejakulate pro Hengst).

<b>Methode</b>	<b>Gruppe</b>	<b>A</b> ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ )	<b>B</b> ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ )	<b>C</b> ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ )
<b>Rückgewinnungs- rate in %</b>	<b>I</b>	75,3 <sup>a</sup> ± 2,8	82,9 <sup>b</sup> ± 4,6	92,8 <sup>c</sup> ± 5
	<b>II</b>	76,0 <sup>a</sup> ± 1,9	83,0 <sup>b</sup> ± 3,9	92,0 <sup>c</sup> ± 5,1

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und den Gruppen I und II (Spalten); ( $p < 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung (n=7)

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung (n=7)

Methoden:

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid®Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

#### 4.1.2 Einfluss der Methoden auf die Frischsamenqualität

In den folgenden Tabellen ist der Effekt der verschiedenen Zentrifugationsmethoden auf Frischsamen dargestellt. Dazu wurden die Mittelwerte der unzentrifugierten, verdünnten Samenproben 6 Std. nach der Gewinnung als Ausgangswert, die einzelnen Zentrifugationsmethoden gemessen nach 24 Std. Lagerung bei 5°C und eine ebenfalls 24 Std. gekühlt gelagerte, unzentrifugierte Frischsamenprobe verglichen.

In Tabelle 4 und 5 werden die Zentrifugationsmethoden bei der gesamten Hengstgruppe verglichen. Ein signifikanter Einfluss der Zentrifugationsmethoden konnte festgestellt werden.

In Tabelle 4 ist der Einfluss der Verfahren auf die Motilitätsparameter dargestellt. Die Standardmethode (A) und die Zentrifugation mit Kissen (B) zeigten bei der progressiven Motilität und bei der linearen Geschwindigkeit (VSL) 24 Std. nach der Zentrifugation signifikant höhere Werte als die unzentrifugierte Kontrollprobe (24 Std. unz.); ( $p \leq 0,05$ ). Ein Unterschied zwischen den einzelnen Zentrifugationsverfahren konnte hier nicht nachgewiesen werden ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabelle 4:** Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Motilitätsparameter von Frischsamen bei der gesamten Hengstgruppe (n=14; 3 Ejakulate pro Hengst).

Mess- parameter	Methode				
	6 Std./unz	24 Std./unz	A	B	C
	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )
<b>pms</b>	73,3 <sup>a</sup> ± 12,4	60,2 <sup>b</sup> ± 16,3	66,9 <sup>a</sup> ± 16,6	69,1 <sup>a</sup> ± 17,5	63,4 <sup>ab</sup> ± 19,2
<b>VSL</b>	47,7 <sup>a</sup> ± 10,7	39,9 <sup>b</sup> ± 11,1	43,3 <sup>ab</sup> ± 14	47,1 <sup>a</sup> ± 16,4	41 <sup>ab</sup> ± 15,4
<b>VCL</b>	149,5 <sup>a</sup> ± 29,9	124 <sup>b</sup> ± 31,6	130,9 <sup>ab</sup> ± 34,3	137,1 <sup>ab</sup> ± 37,8	124,9 <sup>b</sup> ± 36,1
<b>VAP</b>	70,3 <sup>a</sup> ± 14,9	56,2 <sup>b</sup> ± 15,3	59,4 <sup>b</sup> ± 15,7	63,1 <sup>ab</sup> ± 17,9	56,5 <sup>b</sup> ± 17,2

a, b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile. ( $p < 0,05$ ).

Methoden:

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid®/Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:

pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Average Path)

In Tabelle 5 werden die durchflusszytometrisch ermittelten Werte der gesamten Hengstgruppe verglichen. Der prozentuale Anteil membranintakter und akrosomenreagerter Samenzellen nach FITC-PNA/SYTO® 17/PI-Färbung zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den drei zentrifugierten Proben (A, B und C) und der unzentrifugierten Kontrollprobe ( $p \leq 0,05$ ).

Ein Vergleich der verschiedenen Zentrifugationsverfahren untereinander ergab nur für das Mitochondrienmembranpotential (MMP) nach JC-1 Färbung einen signifikanten Unterschied ( $p \leq 0,05$ ). Hier besitzen Standardmethode A und die Kissenzentrifugationsmethode B signifikant höhere Mittelwerte als Methode C ohne Kissen und als der unzentrifugierte Kontrollwert nach 24 Std. ( $p \leq 0,05$ ). Zwischen Methode A und B konnte kein Unterschied festgestellt werden.

**Tabelle 5:** Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die durchflusszytometrischen Messungen von Frischsamen ( $n=14$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Methode				
	6 Std./unz	24 Std./unz	A	B	C
	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )
<b>FITC/PNA-L</b>	50,6 <sup>a</sup> ± 9	39,3 <sup>b</sup> ± 13,7	49,9 <sup>a</sup> ± 10,8	49,6 <sup>a</sup> ± 13,3	47,3 <sup>a</sup> ± 16,2
<b>FITC/PNA-R</b>	26 <sup>ab</sup> ± 8	29,5 <sup>b</sup> ± 13,2	22,9 <sup>a</sup> ± 7,9	23,5 <sup>a</sup> ± 6,8	24,3 <sup>a</sup> ± 9,2
<b>JC-1</b>	47,2 <sup>a</sup> ± 6,2	40,9 <sup>b</sup> ± 7,7	48,6 <sup>a</sup> ± 6,3	47,7 <sup>a</sup> ± 8,2	42,1 <sup>b</sup> ± 9,3

a,b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile ( $p < 0,05$ ).

Methoden:

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid®Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:

FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

In Tabelle 6 und 7 ist der Einfluss der Zentrifugationsmethode auf die Gruppe der Hengste mit guter und ungünstiger Tiefgefriereignung dargestellt. Es zeigte sich generell ein signifikanter Einfluss der Zentrifugationsmethode und der Hengstgruppe ( $p \leq 0,05$ ). Eine Interaktion zwischen Methode und Gruppe war nicht abzusichern ( $p \geq 0,05$ ).

In Tabelle 6 sind die Werte der Vorwärtsbeweglichkeit und der ermittelten Geschwindigkeitssparametern dargestellt. Die Werte der verschiedenen durchflusszytometrischen Messungen befinden sich davon getrennt in Tabelle 7.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Hengstgruppen zeigte sich in Tabelle 6 für den Ausgangswert 6 Std. und für den unzentrifugierten Kontrollwert nach 24 Std. bei der kurvilinearen (VCL) und mittleren Geschwindigkeit (VAP). Zusätzlich wies die Gruppe mit guter Tiefgefriereignung signifikant höhere Mittelwerte für die Standardmethode A bei der linearen Geschwindigkeit und für die Kissenzentrifugationsmethode B bei der progressiven Motilität, der kurvilinearen (VCL) und mittleren Geschwindigkeit (VAP) auf ( $p \leq 0,05$ ).

Bei der Zentrifugation im silikonisierten Zentrifugenglas (C) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ( $p \geq 0,05$ ). Der Vergleich der Zentrifugationsmethoden in



den jeweiligen Hengstgruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied bei den Motilitätsparametern, es konnte jedoch ein signifikanter Vorteil der Kissenzentrifugationsmethode B bei der progressiven Motilität im Vergleich zu der unzentrifugierten Kontrollgruppe nach 24 Std. nachgewiesen werden.

**Tabelle 6:** Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Motilitätsparameter von Frischsperma bei Hengsten mit guter ( $n=7$ ) und schlechter Tiefgefriereignung ( $n=7$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Gruppe	Methode				
		6 Std./unz	24 Std./unz	A	B	C
		( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )
pms	I	80,4 <sup>a</sup> ± 6,5	65,9 <sup>bc</sup> ± 9,7	72,8 <sup>ab</sup> ± 8,7	76,3 <sup>a</sup> ± 11,1	68,3 <sup>abc</sup> ± 17,8
	II	66,4 <sup>bc</sup> ± 12,9	54,7 <sup>c</sup> ± 19,4	61,4 <sup>bc</sup> ± 20,3	62,4 <sup>bc</sup> ± 19,8	58,8 <sup>bc</sup> ± 19,8
VSL	I	53,1 <sup>a</sup> ± 7,3	44,3 <sup>bc</sup> ± 7,4	48,3 <sup>ab</sup> ± 8,4	51,8 <sup>ab</sup> ± 14,9	45,3 <sup>abc</sup> ± 16,7
	II	42,5 <sup>bc</sup> ± 10,9	35,7 <sup>c</sup> ± 12,5	38,6 <sup>c</sup> ± 16,7	42,6 <sup>bc</sup> ± 16,9	36,9 <sup>c</sup> ± 13,2
VCL	I	169 <sup>a</sup> ± 17,8	139,1 <sup>bc</sup> ± 21,4	140,9 <sup>bc</sup> ± 15,6	149,1 <sup>ab</sup> ± 31,9	135,2 <sup>bc</sup> ± 38
	II	130,9 <sup>bc</sup> ± 27,2	109,6 <sup>d</sup> ± 33,5	121,3 <sup>cd</sup> ± 43,8	125,6 <sup>cd</sup> ± 40	115,1 <sup>cd</sup> ± 35,7
VAP	I	79,5 <sup>a</sup> ± 9,1	63,4 <sup>bc</sup> ± 9,1	64,8 <sup>bc</sup> ± 7,2	69,1 <sup>ab</sup> ± 15,1	61,7 <sup>bc</sup> ± 17,7
	II	61,5 <sup>bc</sup> ± 14,2	49,4 <sup>d</sup> ± 16,3	54,3 <sup>cd</sup> ± 19,7	57,4 <sup>cd</sup> ± 18,2	51,5 <sup>cd</sup> ± 15,5

a,b,c,d Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und den Gruppen I und II (Spalte); ( $p < 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung ( $n=7$ )

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung ( $n=7$ )

Methoden:

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid®Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:

pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Average Path)

In Tabelle 7 ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Hengstgruppen feststellen ( $p \geq 0,05$ ). Jedoch ergab sich hier eine signifikante Differenz zwischen den Methoden. Während sich die Standardmethode A zur Kissenzentrifugationsmethode B nicht unterscheidet, weist Methode A einen vermehrten Anteil an Samenzellen mit höherem Mitochondrienmembranpotential auf als bei der Silikonglasmethode C ( $p \leq 0,05$ ). Allerdings konnte dieser Unterschied nur bei Hengsten mit guter Tiefgefriereignung festgestellt werden, während bei Hengsten mit schlechter Tiefgefriereignung kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Zentrifugationsmethoden gefunden wurde ( $p \geq 0,05$ ). Ein positiver Einfluss der Zentrifugation gegenüber der unzentrifugierten Kontrollprobe nach 24 Std. konnte für beide Hengstgruppen nachgewiesen werden. Dies zeigte sich sowohl bei membranintakten Samenzellen als auch bei Samenzellen mit hohem Mitochondrienmembranpotential.

**Tabelle 7:** Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die durchflusszytometrischen Messungen von Frischsperma bei Hengsten mit guter ( $n=7$ ) und schlechter Tiefgefriereignung ( $n=7$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Gruppe	Methode				
		6 Std./unz	24 Std./unz	A	B	C
		$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$
FITC/PNA-L	I	54,3 <sup>a</sup> ± 14,8	42,8 <sup>bc</sup> ± 13,2	55,3 <sup>a</sup> ± 14,2	53,8 <sup>a</sup> ± 12,9	52,3 <sup>ab</sup> ± 14,4
	II	50,6 <sup>a</sup> ± 9	39,2 <sup>c</sup> ± 13,7	49,9 <sup>ab</sup> ± 10,8	49,6 <sup>ab</sup> ± 13,3	47,3 <sup>abc</sup> ± 16,2
FITC/PNA-R	I	24,6 <sup>a</sup> ± 13,9 <sup>b</sup>	30,6 <sup>b</sup> ± 11,9	20,1 <sup>a</sup> ± 9,8	21,6 <sup>ab</sup> ± 10,6	21,6 <sup>ab</sup> ± 9,8
	II	26,1 <sup>ab</sup> ± 8,2	29,5 <sup>ab</sup> ± 13,3	22,9 <sup>ab</sup> ± 7,9	23,5 <sup>ab</sup> ± 6,8	24,3 <sup>ab</sup> ± 9,2
JC-1	I	50,1 <sup>a</sup> ± 5,3	44,5 <sup>bc</sup> ± 6,7	51,6 <sup>a</sup> ± 5,5	49,5 <sup>ab</sup> ± 8,6	44,5 <sup>bc</sup> ± 9,1
	II	44,4 <sup>bc</sup> ± 5,8	37,4 <sup>d</sup> ± 7	45,8 <sup>bc</sup> ± 5,8	46 <sup>bc</sup> ± 7,6	39,8 <sup>cd</sup> ± 9,1

a,b,c,d: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und den Gruppen I und II (Spalte). ( $p < 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung ( $n=7$ )

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung ( $n=7$ )

Methoden:

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid@Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:

FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

### 4.1.3 Einfluss der Methoden auf die Tiefgefriersamenqualität

Der Einfluss der Zentrifugationsmethode auf die Gefriersamenqualität in Betrachtung der gesamten Hengstgruppe als auch auf die Hengste mit guter und schlechter Tiefgefriereignung sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Für die Gesamtbetrachtung der Hengste wurden die Mittelwertsvergleiche der Verfahren in Motilitätsparameter (Tabelle 8) und in flowzytometrischen Messungen (Tabelle 9) unterteilt.

Dabei konnte kein statistisch signifikanter Einfluss der verschiedenen Zentrifugationsmethoden auf die Motilität bei den gemessenen Geschwindigkeitsparametern und bei der Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen festgestellt werden (Tabelle 8;  $p \geq 0,05$ ).

**Tabelle 8:** Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersamen bei der gesamten Hengstgruppe nach dem Auftauen ( $n=14$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Mess-Parameter	Methode		
	A	B	C
	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$
pms	43,5 <sup>a</sup> ± 16,3	46,2 <sup>a</sup> ± 17,4	43,3 <sup>a</sup> ± 18,3
VSL	31,1 <sup>a</sup> ± 13	35,9 <sup>a</sup> ± 15,1	32,7 <sup>a</sup> ± 15,4
VCL	88,9 <sup>a</sup> ± 29,8	78,2 <sup>a</sup> ± 29,5	80,9 <sup>a</sup> ± 29,4
VAP	38,9 <sup>a</sup> ± 15,3	43,7 <sup>a</sup> ± 16,8	39,0 <sup>a</sup> ± 16,8

a: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile. ( $p < 0,05$ ).

Methoden:

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid®Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:

pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Average Path)

In Tabelle 9 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Zentrifugationsmethoden. So wies die Zentrifugation mit Kissen (B) signifikant mehr Samenzellen mit hohem Mitochondrienmembranpotential auf als die Zentrifugation mit Silikonglas (C) ( $p \leq 0,05$ ). Zusätzlich ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Standardmethode A und der Kissenzentrifugation B bei den membranintakten Spermien ( $p \leq 0,05$ ). Hier zeigte Methode B einen höheren Anteil an membranintakten Samenzellen nach dem Auftauen als die Standardmethode A.

**Tabelle 9:** Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die durchflusszytometrischen Messungen von Tiefgefriersamen in der gesamten Hengstgruppe nach dem Auftauen ( $n=14$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Methode		
	A	B	C
	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$
FITC/PNA-L	37,2 <sup>b</sup> ± 11,6	44,7 <sup>a</sup> ± 11,9	41,3 <sup>ab</sup> ± 9,2
FITC/PNA-R	24,6 <sup>a</sup> ± 9,4	21,5 <sup>a</sup> ± 7,6	21,6 <sup>a</sup> ± 6,1
JC-1	34,2 <sup>a</sup> ± 15,7	33,3 <sup>a</sup> ± 10,6	25,1 <sup>b</sup> ± 10,6
SCSA/DFI	17,5 <sup>a</sup> ± 7,8	17,8 <sup>a</sup> ± 8,6	20,1 <sup>a</sup> ± 8,9

a,b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile. ( $p < 0,05$ ).

Methoden:

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid@Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:

FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

SCSA/DFI: Prozentsatz der Spermien mit hohem DNA-Fragmentationsindex

In Tabelle 10 sind die Mittelwerte der prozentualen Anteile der morphologisch veränderten Spermien im Nativsamensamen und zwischen den verschiedenen Zentrifugationsmethoden nach dem Auftauen dargestellt.

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Methoden nach dem Auftauen und dem Nativsamensamen bezüglich der morphologischen Gesamtveränderungen ( $p \leq 0,05$ ).

Eine Differenz zwischen den jeweiligen Zentrifugationsmethoden zeigte sich an den morphologischen Gesamtveränderungen bei Methode C im Vergleich zu den anderen Methoden.

**Tabelle 10:** Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Morphologie von Nativsamensamen und Tiefgefriersamensamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe ( $n=14$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

<b>Methode</b>	<b>Nativ</b> ( $\bar{x} \pm sd$ )	<b>A</b> ( $\bar{x} \pm sd$ )	<b>B</b> ( $\bar{x} \pm sd$ )	<b>C</b> ( $\bar{x} \pm sd$ )
<b>Morphologische Gesamtveränderung</b>	26,5 <sup>a</sup> $\pm$ 9,6	50,9 <sup>b</sup> $\pm$ 12,5	50,9 <sup>b</sup> $\pm$ 14,7	60,4 <sup>c</sup> $\pm$ 10,7

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile. ( $p < 0,05$ ).

Methoden:

Nativ: unverdünnter Frischsamen direkt nach Gewinnung

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid@Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

Die Tabellen 11, 12 und 13 zeigen die Mittelwertvergleiche der verschiedenen Zentrifugationsverfahren nach dem Auftauen innerhalb der Gruppen der Hengste mit guter und schlechter Tiefgefriereignung. Nach dem Auftauen konnte keine Auswirkung auf die Tiefgefriersamenqualität der einzelnen Zentrifugationsmethoden für die Motilitätsparameter (Tabelle 11) und die durchflusszytometrischen Messungen (Tabelle 12) in beiden Hengstgruppen festgestellt werden ( $p \geq 0,05$ ). Jedoch ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Hengste mit guter und schlechter Tiefgefriereignung zu erkennen ( $p \leq 0,05$ ). Eine Interaktion zwischen den Methoden und den Hengstgruppen ist aber nicht vorhanden.

**Tabelle 11:** Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersperma bei Hengsten mit guter ( $n=7$ ) und schlechter Tiefgefriereignung nach dem Auftauen ( $n=7$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Mess- parameter	Methode A		Methode B		Methode C	
	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe I	Gruppe II
	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$
<b>pms</b>	51,8 <sup>a</sup> ± 14,8	35,6 <sup>b</sup> ± 13,8	56,4 <sup>a</sup> ± 9,7	36,5 <sup>b</sup> ± 17,7	53,1 <sup>a</sup> ± 12,3	33,9 <sup>b</sup> ± 18,4
<b>VSL</b>	37,9 <sup>a</sup> ± 10,8	24,6 <sup>b</sup> ± 11,8	44,1 <sup>a</sup> ± 10,9	28,3 <sup>b</sup> ± 14,6	41,4 <sup>a</sup> ± 11,6	24,4 <sup>b</sup> ± 13,9
<b>VCL</b>	96,7 <sup>a</sup> ± 26,3	65,9 <sup>b</sup> ± 24,3	106,8 <sup>a</sup> ± 18	71,9 <sup>b</sup> ± 29	95,9 <sup>a</sup> ± 19,9	61,3 <sup>b</sup> ± 27,3
<b>VAP</b>	46,9 <sup>a</sup> ± 13,3	31,1 <sup>b</sup> ± 13,2	53,5 <sup>a</sup> ± 11,3	34,4 <sup>b</sup> ± 15,9	49,1 <sup>a</sup> ± 12,1	29,7 <sup>b</sup> ± 15,1

a,b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile. ( $p < 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung ( $n=7$ )

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung ( $n=7$ )

Methoden:

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid@Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:

pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Average Path)

**Tabelle 12:** Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die durchflusszytometrischen Messungen von Tiefgefriersperma bei Hengsten mit guter ( $n=7$ ) und schlechter Tiefgefriereignung nach dem Auftauen ( $n=7$ ; 3 Ejakulate pro Hengst)

Methode	A		B		C	
	Gruppe	Gruppe	Gruppe	Gruppe	Gruppe	Gruppe
	I	II	I	II	I	II
Messparameter	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$
<b>FITC/PNA-L</b>	41,5 <sup>ab</sup> ± 10,7	33,2 <sup>c</sup> ± 11,2	49,2 <sup>a</sup> ± 9,5	40,4 <sup>bc</sup> ± 12,6	46,8 <sup>a</sup> ± 5,6	36,1 <sup>bc</sup> ± 8,9
<b>FITC/PNA-R</b>	22,1 <sup>a</sup> ± 8,3	25,1 <sup>a</sup> ± 10	19,7 <sup>a</sup> ± 4,8	24,1 <sup>a</sup> ± 8,9	22,1 <sup>a</sup> ± 6,7	21,2 <sup>a</sup> ± 5,5
<b>JC-1</b>	33,2 <sup>a</sup> ± 15,4	26,3 <sup>a</sup> ± 11,4	34,4 <sup>a</sup> ± 9,9	32,3 <sup>a</sup> ± 9,4	34,1 <sup>a</sup> ± 6,6	28,8 <sup>a</sup> ± 8,6
<b>SCSA/DFI</b>	15,0 <sup>a</sup> ± 5,7	17,8 <sup>a</sup> ± 8,6	15,8 <sup>a</sup> ± 5,7	17,5 <sup>a</sup> ± 7,8	16,4 <sup>a</sup> ± 5,2	20,1 <sup>a</sup> ± 8,9

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile. ( $p < 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung ( $n=7$ )

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung ( $n=7$ )

Methoden:

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid®Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:  
FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

SCSA/DFI: Prozentsatz der Spermien mit hohem DNA-Fragmentationsindex



Tabelle 13 zeigt bei den morphologischen Gesamtveränderungen einen signifikanten Unterschied in beiden Hengstgruppen zwischen Nativsamen und den aufgetauten zentrifugierten Samenproben ( $p \leq 0,05$ ). Zusätzlich konnte in der Gruppe der Hengste mit guter Tiefgefriereignung bei der Zentrifugation im Silikonglas C eine signifikant höhere Anzahl morphologischer Gesamtveränderungen im Vergleich zu der Standardmethode A und der Kissenzentrifugationsmethode B festgestellt werden ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabelle 13:** Auswirkungen der Zentrifugationsmethoden auf die Morphologie von Nativsamen und von Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter ( $n=7$ ) und schlechter Tiefgefriereignung ( $n=7$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

	Gruppe	nativ ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ )	A ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ )	B ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ )	C ( $\bar{x} \pm \text{sd}$ )
<b>Morphologische</b>	<b>I</b>	19,8 <sup>a</sup> ± 5,6	41,2 <sup>c</sup> ± 9,1	38,3 <sup>bc</sup> ± 7,4	50,7 <sup>c</sup> ± 5,8
<b>Gesamtveränderungen</b>	<b>II</b>	32,7 <sup>b</sup> ± 8,7	60,4 <sup>d</sup> ± 7,3	62,2 <sup>d</sup> ± 8,7	63,2 <sup>d</sup> ± 8,8

a,b,c,d: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und zwischen den Gruppen I und II (Spalte). ( $p < 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung ( $n=7$ )

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung ( $n=7$ )

Methoden:

Nativ: unverdünnter Frischsamen direkt nach Gewinnung

A: Standardzentrifugationsverfahren 10min/600 x g

B: Kissenzentrifugationstechnik Cushionfluid®Minitüb 20min/1000 x g

C: silikonisiertes Zentrifugenglas 20min/1000 x g

## **4.2 Versuchsreihe II: Einfluss der Zentrifugation und der Lagerungsdauer**

In dieser Versuchsreihe wird der Einfluss auf die Samenqualität von verschiedenen Kissenzentrifugationstechniken mit unterschiedlichen Zentrifugationskissen und -verdünnern überprüft. Zusätzlich wurde der Unterschied zwischen der Kissenzentrifugation und der Zentrifugation ohne Kissen bei gleicher Beschleunigung (1000 x g/ 20min) dargestellt. Weiterhin befasst sich diese Versuchsreihe mit dem Vergleich des Standardeinfrierverfahrens 2,5 Std. nach der Gewinnung und Aufbereitung des Samens (Teil 1) und dem Einfrieren nach 24- stündiger Lagerung bei 5°C (Teil 2) und den darauf wirkenden Einfluss der verschiedenen Kissenzentrifugationsverfahren.

### **4.2.1 Einfluss der Methoden auf den Spermienverlust**

Die Mittelwertvergleiche der prozentualen Rückgewinnungsraten zwischen den verschiedenen Methoden und Gruppen sind in den Tabellen 14 und 15 dargestellt.

Hier konnte ein signifikanter Einfluss des Faktors Methode ( $p \leq 0,05$ ) auf die Rückgewinnungsrate der Spermien nach dem Zentrifugationsvorgang nachgewiesen werden (Tabelle 14), welcher gleichermaßen für beide Hengstgruppen zutrifft (Tabelle 15). Deutlich zeigt sich in beiden Tabellen, dass der durchschnittliche Spermienverlust bei den Zentrifugationsmethoden mit klarem Zentrifugationsverdünner A (HBS ohne Kissen), B (HBS mit Kissen) und C (Ecqellsire®) zu der Zentrifugationsmethode D (INRA) signifikant verschieden war ( $p \leq 0,05$ ). Am höchsten ist die Rückgewinnungsrate bei Methode A (HBS ohne Kissen) und am niedrigsten bei Methode D (INRA).

**Tabelle 14:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Rückgewinnungsrate ( $n=12$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Methode	A	B	C	D
	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$
<b>Rückgewinnungsrate in %</b>	$95,7^a \pm 5,9$	$93,8^a \pm 5,4$	$93,3^a \pm 5,4$	$85,7^b \pm 5,6$

a,b: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile ( $p \leq 0,05$ ).

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

**Tabelle 15:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Rückgewinnungsrate bei Hengsten mit guter ( $n=6$ ) und schlechter Tiefgefriereignung ( $n=6$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Methode	Gruppe	A	B	C	D
		$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$
<b>Rückgewinnungsrate in %</b>	<b>I</b>	$95,6^a \pm 6,6$	$94,5^a \pm 5,7$	$93,4^a \pm 5,2$	$85^b \pm 5,9$
	<b>II</b>	$95,9^a \pm 5,4$	$93,1^a \pm 5$	$93,3^a \pm 5,7$	$86,4^b \pm 5,4$

a,b: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und zwischen den Gruppen I und II (Spalten); ( $p \leq 0,05$ )

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung ( $n=6$ )

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung ( $n=6$ )

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

#### 4.2.2 Einfluss der Methoden auf die Frischsamenqualität

In den folgenden Tabellen wird der Einfluss der Zentrifugationsmethoden und -verdünner auf die Frischsamenqualität gezeigt. Hierfür wurden die Mittelwerte der unzentrifugierten, verdünnten Samenproben 6 Std. nach der Gewinnung als Ausgangswert, die einzelnen Zentrifugationsmethoden gemessen nach 24 Std. Lagerung bei 5°C und eine ebenfalls 24 Std. gekühlt gelagerte, unzentrifugierte Frischsamenprobe miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind getrennt nach Motilitätsmessparametern und durchflusszytometrisch gemessenen Werten dargestellt.

Die Tabellen 16 und 17 stellen den Mittelwertsvergleich bei der gesamten Hengstgruppe dar.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Zentrifugationsmethoden wurde für die linearen (VSL) und kurvilinearen Geschwindigkeitsparameter (VCL) nachgewiesen ( $p \leq 0,05$ ; Tabelle 16). Die Kissenzentrifugationsmethoden mit Verdünner HBS (B) und INRA (D) zeigten signifikant höhere Werte als die Kissenzentrifugationsmethode C (Ecqellsire®) und die Methode A (HBS ohne Kissen). Auch beim Vergleich der Zentrifugationsmethoden mit dem unzentrifugierten Kontrollwert erwiesen sich die Kissenzentrifugationsmethoden B und D bei Vorwärtsbeweglichkeit als auch bei den linearen (VSL) und kurvilinearen Geschwindigkeitsparametern (VCL) von Vorteil ( $p \leq 0,05$ ). Gleichzeitig konnte ein signifikanter Rückgang der Vorwärtsbeweglichkeit und der Geschwindigkeitsparameter (VCL, VSL und VAP) nach 24 Std. bei dem Kontrollwert und den Methoden A (HBS ohne Kissen) und C (Ecqellsire®) im Vergleich zum Ausgangswert 6 Std. beobachtet werden ( $p \leq 0,05$ ).

Ebenfalls wurde eine signifikante Differenz zwischen den einzelnen Zentrifugationsmethoden festgestellt (Tabelle 17). Während die Methoden B (HBS) und D (INRA) bei den Samenzellen mit hohem Mitochondrienmembranpotential entsprechend der Motilitätsparameter in Tabelle 16 signifikant höhere Werte aufwiesen, zeigte sich Methode C (Ecqellsire®) bei dem prozentualen Anteil der membranintakten wie auch bei den akrosomenreagierten Spermien und bei der Messung des DNA-Fragmentationsindex (DFI) gegenüber den anderen Methoden überlegen ( $p \leq 0,05$ ).

Hinsichtlich des Anteils an membranintakten und akrosomreagierten Samenzellen war die Zentrifugation generell und unabhängig von dem jeweiligen Verfahren besser als der unzentrifugierte Kontrollwert.

**Tabelle 16:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Motilitätsparameter bei Frischsperma bei der gesamten Hengstgruppe (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst).

Mess- parameter	Methoden					
	6 Std./unz	24 Std./unz	A	B	C	D
	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )
<b>pms</b>	73,0 <sup>a</sup> ± 16,8	53,1 <sup>c</sup> ± 20,8	59,6 <sup>bc</sup> ± 20,1	68,7 <sup>ab</sup> ± 14,5	56,8 <sup>bc</sup> ± 20,7	69,7 <sup>ab</sup> ± 12,9
<b>VSL</b>	51,6 <sup>a</sup> ± 17,1	39,4 <sup>cd</sup> ± 15,3	38,3 <sup>cd</sup> ± 14,1	47,2 <sup>abc</sup> ± 14,5	34,7 <sup>d</sup> ± 15,6	50,2 <sup>ab</sup> ± 12,6
<b>VCL</b>	150,3 <sup>a</sup> ± 37	109,7 <sup>b</sup> ± 38,5	125,8 <sup>b</sup> ± 38,1	137,9 <sup>a</sup> ± 29,6	110,7 <sup>b</sup> ± 40,2	136,6 <sup>a</sup> ± 24,6
<b>VAP</b>	73,4 <sup>a</sup> ± 20,6	53,4 <sup>b</sup> ± 19,8	55,8 <sup>b</sup> ± 20,3	63,6 <sup>ab</sup> ± 16,5	51,2 <sup>b</sup> ± 20,7	64,7 <sup>ab</sup> ± 15

a,b,c,d: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile ( $p \leq 0,05$ ).

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:

Pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Average Path)

**Tabelle 17:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die durchflusszytometrischen Messungen bei Frischsperma bei der gesamten Hengstgruppe (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst).

Mess-Parameter	Methoden					
	6 Std./unz	24 Std./unz	A	B	C	D
	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )
<b>FITC/PNA-L</b>	60,1 <sup>b</sup> ± 13,4	48,1 <sup>d</sup> ± 14,7	60,2 <sup>c</sup> ± 10,3	63,6 <sup>abc</sup> ± 11,3	70,1 <sup>a</sup> ± 8,0	68,8 <sup>ab</sup> ± 6,7
<b>FITC/PNA-R</b>	18,7 <sup>b</sup> ± 9,5	25,1 <sup>c</sup> ± 10,2	15,9 <sup>b</sup> ± 4,8	14 <sup>ab</sup> ± 5,1	10,4 <sup>a</sup> ± 3,2	12,5 <sup>ab</sup> ± 4,1
<b>JC-1</b>	52,1 <sup>ab</sup> ± 11,4	40,7 <sup>c</sup> ± 12,3	48,4 <sup>bc</sup> ± 10,3	56,5 <sup>a</sup> ± 5,8	59,2 <sup>a</sup> ± 7,9	53,9 <sup>ab</sup> ± 8,9
<b>SCSA/DFI</b>	12,1 <sup>a</sup> ± 4,8	–	24,0 <sup>b</sup> ± 7,6	22,2 <sup>b</sup> ± 7,9	16,1 <sup>a</sup> ± 16,3	20,8 <sup>ab</sup> ± 7,4

a,b,c,d: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile ( $p \leq 0,05$ ).

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:

FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

SCSA/DFI: Prozentsatz der Spermien mit hohem DNA-Fragmentationsindex

In den Tabellen 18 und 19 sind die Mittelwerte der verschiedenen Zentrifugationsmethoden für Hengste mit guter und ungünstiger Tiefgefriereignung dargestellt.

Es wurde ein signifikanter Einfluss der Zentrifugationsmethoden und ein Einfluss der verschiedenen Hengstgruppen auf die Frischsamenqualität nachgewiesen ( $p \leq 0,05$ ). Eine Interaktion der Methode und Gruppe bestand jedoch nicht. Der Vergleich der beiden Hengstgruppen zeigte, dass die Gruppe der Hengste mit guter Tiefgefriereignung zwar höhere Mittelwerte besitzt, jedoch können kaum signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Zentrifugationsmethoden für die Motilitätsparameter war erkennbar ( $p \leq 0,05$ ; Tabelle 18). So zeigt Methode D (INRA) im Vergleich zu Methode C (Eqcellsire®) bei beiden Hengstgruppen eine höhere lineare Geschwindigkeit (VSL). Bei der kurvilinearen Geschwindigkeit stellte sich Methode B (HBS) gegenüber der Methode C (Eqcellsire®) von Vorteil bei Hengsten mit ungünstiger Tiefgefriereignung heraus.

**Tabelle 18:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Motilitätsparameter von Frischsperma bei Hengsten mit guter ( $n=6$ ) und schlechter Tiefgefriereignung ( $n=6$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Gruppe	Methode					
		6 Std./unz	24Std./unz	A	B	C	D
		$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$
pms	I	79,4 <sup>a</sup> ± 9,1	60,3 <sup>bc</sup> ± 14	62,1 <sup>abc</sup> ± 22,9	69,7 <sup>abc</sup> ± 15,4	61,6 <sup>abc</sup> ± 20,5	73,4 <sup>ab</sup> ± 13,2
	II	66 <sup>abc</sup> ± 20,4	45,8 <sup>c</sup> ± 23	57,5 <sup>bc</sup> ± 17,9	67,6 <sup>abc</sup> ± 14,0	52,1 <sup>bc</sup> ± 20,5	66,1 <sup>abc</sup> ± 12,2
VSL	I	59,1 <sup>a</sup> ± 16,4	45,3 <sup>bc</sup> ± 13	41,2 <sup>bc</sup> ± 17,8	49,4 <sup>abc</sup> ± 16,1	37,1 <sup>c</sup> ± 17,3	53,9 <sup>ab</sup> ± 11,6
	II	44,1 <sup>bc</sup> ± 14,8	33,4 <sup>bc</sup> ± 15	35,8 <sup>bc</sup> ± 9,9	44,9 <sup>bc</sup> ± 12,8	32,3 <sup>c</sup> ± 13,9	46,6 <sup>b</sup> ± 12,9
VCL	I	163,7 <sup>a</sup> ± 30,2	121,3 <sup>bc</sup> ± 29	131,9 <sup>abc</sup> ± 44	137,9 <sup>ab</sup> ± 32,2	116,7 <sup>bc</sup> ± 41,7	138,6 <sup>ab</sup> ± 24,4
	II	136,9 <sup>abc</sup> ± 39	98,2 <sup>c</sup> ± 43,8	120,5 <sup>bc</sup> ± 32	137,9 <sup>ab</sup> ± 27,9	104,7 <sup>c</sup> ± 39,1	134,6 <sup>abc</sup> ± 39
VAP	I	85,6 <sup>a</sup> ± 17,5	60,8 <sup>bc</sup> ± 16	60,2 <sup>bc</sup> ± 23,9	64,9 <sup>bc</sup> ± 18,8	55,4 <sup>bc</sup> ± 21,8	67,1 <sup>b</sup> ± 14,8
	II	65,2 <sup>b</sup> ± 18,6	45,9 <sup>c</sup> ± 20,3	52,1 <sup>bc</sup> ± 16,6	62,3 <sup>bc</sup> ± 14,4	47,1 <sup>bc</sup> ± 19,5	61,8 <sup>bc</sup> ± 15,3

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und zwischen den Gruppen I und II (Spalten) ( $p \leq 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung ( $n=6$ )

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung ( $n=6$ )

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid®/Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid®/Minitüb 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:

pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Average Path)

In Tabelle 19 besitzt die Kissenzentrifugationsmethode C (Eqcellsire®) im Vergleich zu Methode A (HBS ohne Kissen) signifikant höhere Werte bei membranintakten Samenzellen und bei Samenzellen mit hohem Mitochondrienpotential innerhalb der Hengste mit ungünstiger Tiefgefriereignung. In beiden Hengstgruppen konnte ein positiver Einfluss der Methode C (Eqcellsire®) gegenüber den Methoden A (HBS ohne Kissen) und B (HBS) bei der Messung des DNA-Fragmentationsindexes (DFI) festgestellt werden. Der Vergleich der Zentrifugationsmethoden

mit der unzentrifugierten Kontrollprobe nach 24 Std. wies eine signifikante Überlegenheit aller Methoden für membranintakte und akrosomenreagierte Samenzellen von Hengsten mit guter Tiefgefrierung auf. Bei Hengsten mit ungünstiger Tiefgefriereignung konnte diesbezüglich kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

**Tabelle 19:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die durchflusszytometrischen Messungen von Frischsperma bei Hengsten mit guter ( $n=6$ ) und schlechter Tiefgefriereignung ( $n=6$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Gruppe	Methode					
		6 Std./unz	24Std./unz	A	B	C	D
		$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$
FITC/	I	61,9 <sup>a</sup> ± 14,3	50,4 <sup>bc</sup> ± 16	65,1 <sup>a</sup> ± 8,3	67,1 <sup>a</sup> ± 7,8	70,4 <sup>a</sup> ± 9,4	71,8 <sup>a</sup> ± 5,1
PNA-L	II	58,3 <sup>ab</sup> ± 12,2	45,7 <sup>c</sup> ± 12	55,9 <sup>bc</sup> ± 10,2	60,1 <sup>ab</sup> ± 13,2	69,9 <sup>a</sup> ± 6,7	65,9 <sup>ab</sup> ± 7,1
FITC/	I	18,7 <sup>bcd</sup> ± 10,3	23,7 <sup>d</sup> ± 11,3	14,6 <sup>ab</sup> ± 3,6	13,1 <sup>ab</sup> ± 3,8	10,1 <sup>a</sup> ± 2,7	11,4 <sup>ab</sup> ± 3,1
PNA-R	II	18,6 <sup>bcd</sup> ± 9,6	26,4 <sup>d</sup> ± 9,2	16,9 <sup>abc</sup> ± 5,6	14,9 <sup>ab</sup> ± 6,1	10,7 <sup>a</sup> ± 3,7	13,6 <sup>ab</sup> ± 4,8
JC-1	I	55,5 <sup>ab</sup> ± 10,1	45,4 <sup>cd</sup> ± 10	51,8 <sup>abc</sup> ± 8,2	57,3 <sup>ab</sup> ± 5,8	58,7 <sup>a</sup> ± 8,9	57,3 <sup>ab</sup> ± 6,1
	II	48,6 <sup>bc</sup> ± 11,9	35,9 <sup>d</sup> ± 12	45,5 <sup>bcd</sup> ± 11,2	55,7 <sup>ab</sup> ± 5,8	59,7 <sup>a</sup> ± 6,9	50,6 <sup>ab</sup> ± 10,2
SCSA/DFI	I	11,7 <sup>a</sup> ± 5,5	—	23,0 <sup>b</sup> ± 8,1	22,5 <sup>b</sup> ± 7,0	13,1 <sup>a</sup> ± 5,3	18,9 <sup>ab</sup> ± 6,6
	II	13,7 <sup>a</sup> ± 4,9	—	25,5 <sup>b</sup> ± 7,0	22,9 <sup>b</sup> ± 8,4	19,0 <sup>ab</sup> ± 22,5	22,7 <sup>b</sup> ± 7,9

a,b,c,d: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und zwischen den Gruppen I und II (Spalten) ( $p \leq 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung ( $n=6$ )

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung ( $n=6$ )

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

6 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 6 Std.

24 Std./unz: unzentrifugierter verdünnter Samen, gemessen nach 24 Std gekühlter Lagerung

Messparameter:

FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

SCSA/DFI: Prozentsatz der Spermien mit hohem DNA-Fragmentationsindex



### 4.2.3 Einfluss der Methoden auf die Tiefgefriersamenqualität

Die folgenden Tabellen zeigen den Einfluss der verschiedenen Zentrifugationsverfahren auf die Tiefgefriersamenqualität der gesamten Hengstgruppe. Zwischen den Methoden bestehen signifikante Unterschiede, welche den Ergebnissen vor dem Einfrieren entsprechen, sich aber durch den Einfrier- und Auftauprozess noch deutlicher herauskristallisieren.

Bei den Motilitätsparametern (Tabelle 20) besitzen die Kissenzentrifugationsmethode B (HBS) und D (INRA) die höchsten Mittelwerte, und es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zu Methode A (HBS ohne Kissen) und zu der Kissenzentrifugationsmethode C (Ecqellsire®) ( $p \leq 0,05$ ).

Methode A (HBS ohne Kissen) weist signifikant niedrigere Werte für den prozentualen Anteil membranintakter und somit vitaler Spermien ( $p \leq 0,05$ ) auf (Tabelle 21). Dieses Ergebnis stimmt mit dem Mittelwertsvergleich des prozentualen Anteils der Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential überein. Dagegen ist ein signifikanter Unterschied der Methode C (Ecqellsire®) zu den übrigen Methoden bei dem akrosomalen Status und bei dem prozentualen Anteil an DFI-Spermien nach SCSA®-Färbung feststellbar ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabelle 20:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst)

Mess- parameter	Methode			
	A	B	C	D
	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )
<b>pms</b>	42,6 <sup>bc</sup> ± 15,9	52,5 <sup>a</sup> ± 16,7	37,1 <sup>c</sup> ± 16,4	55,4 <sup>a</sup> ± 15,2
<b>VSL</b>	28,7 <sup>ab</sup> ± 12,3	34,9 <sup>a</sup> ± 14,1	25,9 <sup>b</sup> ± 12,2	35,2 <sup>a</sup> ± 13,4
<b>VCL</b>	73,4 <sup>b</sup> ± 25,5	92,3 <sup>a</sup> ± 29,2	72,0 <sup>b</sup> ± 28,1	92,1 <sup>a</sup> ± 27,9
<b>VAP</b>	34,4 <sup>b</sup> ± 13,5	43,6 <sup>a</sup> ± 16,2	33,2 <sup>b</sup> ± 14,1	43,5 <sup>a</sup> ± 14,9

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile ( $p \leq 0,05$ ).

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

Messparameter:

pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Average Path)

**Tabelle 21:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die durchflusszytometrischen Messungen von Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst)

Mess- parameter	Methode			
	A	B	C	D
	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )
<b>FITC/PNA-L</b>	31,5 <sup>b</sup> ± 9,2	38,4 <sup>a</sup> ± 9,4	37,9 <sup>a</sup> ± 9,3	37,4 <sup>a</sup> ± 10,6
<b>FITC/PNA-R</b>	21,2 <sup>b</sup> ± 4,3	19,7 <sup>b</sup> ± 5,3	16,1 <sup>a</sup> ± 4,3	19,9 <sup>b</sup> ± 4,8
<b>JC-1</b>	29,6 <sup>b</sup> ± 7,3	37,1 <sup>a</sup> ± 8,6	34,7 <sup>a</sup> ± 7,2	34,6 <sup>a</sup> ± 7,9
<b>SCSA/DFI</b>	15,5 <sup>b</sup> ± 7,7	14,2 <sup>ab</sup> ± 6,6	10,3 <sup>a</sup> ± 4,3	17,3 <sup>b</sup> ± 6,1

a,b: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile ( $p \leq 0,05$ ).

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

Messparameter:

FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

SCSA/DFI: Prozentsatz der Spermien mit hohem DNA-Fragmentationsindex

In der Tabelle 22 sind die Mittelwertsvergleiche der morphologischen Gesamtveränderungen bei Nativsamensamen und den verschiedenen Kissenzentrifugationsverfahren nach dem Einfrieren und Auftauen dargestellt. Bei allen Verfahren besteht nach dem Auftauen bei den morphologischen Veränderungen ein signifikanter Unterschied zu dem Ausgangswert Nativsamensamen ( $p \leq 0,05$ ).

Bei Betrachtung der verschiedenen Zentrifugationsverfahren konnte kein signifikanter Unterschied aufgrund der Morphologie der Samenzellen festgestellt werden ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabelle 22:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Morphologie von Nativsamen und Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst)

<b>Methode</b>	<b>Nativ</b> ( $\bar{x} \pm sd$ )	<b>A</b> ( $\bar{x} \pm sd$ )	<b>B</b> ( $\bar{x} \pm sd$ )	<b>C</b> ( $\bar{x} \pm sd$ )	<b>D</b> ( $\bar{x} \pm sd$ )
<b>Morphologische Gesamtveränderungen</b>	29,2 <sup>a</sup> ± 12,9	53,6 <sup>b</sup> ± 13,1	50,3 <sup>b</sup> ± 11,5	53,6 <sup>b</sup> ± 12,4	50,7 <sup>b</sup> ± 12

a,b: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile ( $p \leq 0,05$ )

Methoden:

Nativ: unverdünnter Frischsamen direkt nach Gewinnung

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

In den folgenden Tabellen sind die Mittelwertvergleiche der verschiedenen Zentrifugationsmethoden nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter und ungünstiger Tiefgefriereignung dargestellt. Die Werte sind getrennt für Motilitätsparameter (Tabelle 23), Messungen am Durchflusszytometer (Tabelle 24) und für morphologische Veränderungen (Tabelle 25) dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss des Faktors Methode und Hengstgruppe auf die Samenqualitätsparameter. Eine Interaktion konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 23 zeigt für die Motilitätsparameter signifikant höhere Werte für Methode B (HBS) und D (INRA) gegenüber Methode A (HBS ohne Kissen) und C (Eqcellsire®) ( $p \leq 0,05$ ). Dabei ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den Zentrifugationsverfahren vermehrt innerhalb der Gruppe der Hengste mit guter Tiefgefriereignung.

**Tabelle 23:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter ( $n=6$ ) und schlechter Tiefgefriereignung ( $n=6$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Gruppe	Methoden			
		A	B	C	D
		$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$
pms	I	45,1 <sup>bc</sup> ± 15,3	58,7 <sup>ab</sup> ± 15	45 <sup>bc</sup> ± 14,5	61,1 <sup>a</sup> ± 15,7
	II	40,3 <sup>cd</sup> ± 16,5	46,4 <sup>abc</sup> ± 15,7	29,3 <sup>d</sup> ± 14,6	49,8 <sup>abc</sup> ± 12,8
VSL	I	30,1 <sup>abc</sup> ± 11,6	39,3 <sup>ab</sup> ± 14,7	29,7 <sup>bc</sup> ± 11,8	41,1 <sup>a</sup> ± 13,1
	II	27,4 <sup>c</sup> ± 13,2	30,7 <sup>abc</sup> ± 12,6	22,2 <sup>c</sup> ± 11,6	29,4 <sup>bc</sup> ± 11,3
VCL	I	77,2 <sup>b</sup> ± 23,7	101,9 <sup>a</sup> ± 28,9	80,1 <sup>ab</sup> ± 28	102,3 <sup>a</sup> ± 23,7
	II	70 <sup>b</sup> ± 27,3	82,7 <sup>ab</sup> ± 26,9	63,9 <sup>b</sup> ± 26,5	82 <sup>ab</sup> ± 28,8
VAP	I	37,2 <sup>ab</sup> ± 13,3	49,4 <sup>a</sup> ± 16,4	38,2 <sup>ab</sup> ± 13,0	50,1 <sup>a</sup> ± 13,8
	II	31,8 <sup>b</sup> ± 13,5	37,7 <sup>ab</sup> ± 14,1	28,2 <sup>b</sup> ± 12,7	36,8 <sup>ab</sup> ± 13

a,b,c,d: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und zwischen den Gruppen I und II (Spalten) ( $p \leq 0,05$ )

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung ( $n=6$ )

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung ( $n=6$ )

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

Messparameter:

pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Average Path)

Wie aus Tabelle 24 zu ersehen, weist die Kissenzentrifugationsmethode B (HBS) im Vergleich zu Methode A (HBS ohne Kissen) einen signifikant höheren prozentualen Anteil membranintakter Spermien und Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential auf ( $p \geq 0,05$ ). Bei den akrosomenreagierten Samenzellen und beim prozentualen Anteil an DFI-Spermien nach SCSA®-Färbung ist ein signifikanter Unterschied der Kissenzentrifugationsmethode C (Eqcellsire®) zu der Methode A (HBS ohne Kissen) feststellbar ( $p < 0,05$ ). Bei allen Verfahren besitzen Hengste der

Gruppe mit guter Tiefgefriereignung höhere Mittelwerte als Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung, jedoch unterscheiden sie sich nur in einigen Fällen auch signifikant.

**Tabelle 24:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter (n=6) und schlechter Tiefgefriereignung (n=6; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Gruppe	Methoden			
		A	B	C	D
		$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$
FITC/PNA-L	I	33,4 <sup>bc</sup> ± 8,7	43,7 <sup>a</sup> ± 6,9	40,6 <sup>ab</sup> ± 8,7	42,3 <sup>a</sup> ± 10,2
	II	29,8 <sup>c</sup> ± 9,6	33 <sup>bc</sup> ± 8,6	35,2 <sup>abc</sup> ± 9,3	32,5 <sup>bc</sup> ± 8,6
FITC/PNA-R	I	20,7 <sup>b</sup> ± 3,6	18,7 <sup>ab</sup> ± 3,8	14,9 <sup>a</sup> ± 2,7	19,2 <sup>b</sup> ± 3,1
	II	21,7 <sup>b</sup> ± 5,6	20,8 <sup>b</sup> ± 6,1	17,2 <sup>ab</sup> ± 3,7	20,6 <sup>b</sup> ± 4,8
JC-1	I	32,2 <sup>bc</sup> ± 8,1	42 <sup>a</sup> ± 6,8	37,3 <sup>ab</sup> ± 6,1	39 <sup>a</sup> ± 6,2
	II	27,3 <sup>c</sup> ± 5,8	32,1 <sup>bc</sup> ± 7,4	32,1 <sup>bc</sup> ± 7,4	30,2 <sup>c</sup> ± 7,1
SCSA/DFI	I	16,2 <sup>bc</sup> ± 8,4	13,8 <sup>abc</sup> ± 6,3	9,7 <sup>a</sup> ± 4,6	15,7 <sup>bc</sup> ± 6,8
	II	14,9 <sup>abc</sup> ± 7,3	14,6 <sup>abc</sup> ± 6,9	11 <sup>ab</sup> ± 4,0	18,9 <sup>c</sup> ± 5,0

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und zwischen den Gruppen I und II (Spalten) ( $p \leq 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung (n=6)

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung (n=6)

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

Messparameter:

FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

SCSA/DFI: Prozentsatz der Spermien mit hohem DNA-Fragmentationsindex

Der Mittelwertsvergleich der morphologischen Veränderungen zwischen den verschiedenen Gruppen und der Verfahren ist in Tabelle 25 dargestellt.

Bei den Gesamtveränderungen besteht bezüglich der Mittelwerte ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Hengste mit guter Tiefgefriereignung und der Gruppe der Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung ( $p \leq 0,05$ ). Es besteht ebenso ein signifikanter Unterschied zwischen Nativsamen und den Samenproben nach dem Auftauen in beiden Gruppen ( $p \leq 0,05$ ). Ein Unterschied der Verfahren konnte nicht festgestellt werden ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabelle 25:** Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Morphologie von Nativ- und Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter ( $n=6$ ) und schlechter Tiefgefriereignung ( $n=6$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Methode	Gruppe	Nativ ( $\bar{x} \pm sd$ )	A ( $\bar{x} \pm sd$ )	B ( $\bar{x} \pm sd$ )	C ( $\bar{x} \pm sd$ )	D ( $\bar{x} \pm sd$ )
Morphologische	I	19,3 <sup>a</sup> ± 6	43,5 <sup>b</sup> ± 8	41,2 <sup>b</sup> ± 8	44 <sup>b</sup> ± 8,2	40,7 <sup>b</sup> ± 7,8
Gesamtveränderung	II	36,8 <sup>b</sup> ± 10,4	62 <sup>c</sup> ± 10,1	57,3 <sup>c</sup> ± 8,4	62,8 <sup>c</sup> ± 7,7	58,1 <sup>c</sup> ± 8,7

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und zwischen den Gruppen I und II (Spalten); ( $p \leq 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung ( $n=6$ )

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung ( $n=6$ )

Methoden:

Nativ: unverdünnter Frischsamen direkt nach Gewinnung

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

#### 4.2.4 Einfluss der Lagerungsdauer

In den Tabellen 26 und 27 ist der Unterschied der aufgetauten Samenproben bei einer Lagerungsdauer von 24 Std. und dem direkten Einfrieren nach 2,5 Std. dargestellt.

Es zeigt sich ein signifikanter Einfluss der Lagerungsdauer vor dem Einfrieren. Die progressive Motilität als auch die Geschwindigkeitsparameter weisen signifikant niedrigere Werte nach der 24 stündigen Lagerung in den aufgetauten Samenproben auf. Es wurde für die membranintakten Samenzellen, dem Anteil der Samenzellen mit hohem MPP und dem DFI-Wert nach SCSA®-Färbung ebenfalls ein deutlich signifikanter Unterschied festgestellt. Kein signifikanter Unterschied

zeigte sich dagegen für den Anteil akrosomenreagerter Samenzellen. Eine Interaktion zwischen Einfrierzeitpunkt und Zentrifugationsverfahren konnte nicht nachgewiesen werden.

**Tabelle 26:** Einfluss der Lagerungsdauer vor der Tiefgefrierung von 24 Std. im Vergleich zum Standardverfahren (2,5 Std.) auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersamen nach dem Auftauen (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Gruppe	Methoden			
		A	B	C	D
		$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$
pms	2,5 Std.	42,6 <sup>b</sup> ± 15,9	52,5 <sup>a</sup> ± 16,7	37,1 <sup>b</sup> ± 16,4	55,4 <sup>a</sup> ± 15,2
	24 Std.	22,4 <sup>c</sup> ± 12,0	39,5 <sup>b</sup> ± 15,8	22,6 <sup>c</sup> ± 15,1	42,4 <sup>b</sup> ± 17,5
VSL	2,5 Std.	28,7 <sup>ab</sup> ± 12,3	34,9 <sup>a</sup> ± 14,1	25,9 <sup>b</sup> ± 12,2	35,3 <sup>a</sup> ± 13,4
	24 Std.	14,7 <sup>c</sup> ± 7,4	26,7 <sup>ab</sup> ± 14,1	16,1 <sup>c</sup> ± 9,3	28,7 <sup>ab</sup> ± 15,2
VCL	2,5 Std.	73,4 <sup>b</sup> ± 25,4	92,3 <sup>a</sup> ± 29,2	72 <sup>b</sup> ± 28,1	92,1 <sup>a</sup> ± 27,9
	24 Std.	46,9 <sup>c</sup> ± 18,4	73,6 <sup>ab</sup> ± 27,4	46,6 <sup>c</sup> ± 22,7	75 <sup>ab</sup> ± 30,4
VAP	2,5 Std.	34,5 <sup>b</sup> ± 13,5	43,6 <sup>a</sup> ± 16,2	33,2 <sup>b</sup> ± 14,1	43,4 <sup>a</sup> ± 14,9
	24 Std.	19,7 <sup>c</sup> ± 8,7	33,7 <sup>b</sup> ± 14,9	20,8 <sup>c</sup> ± 10,4	35,4 <sup>ab</sup> ± 16,3

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und zwischen den Lagerungszeiten 2,5- und 24 Std. (Spalten); (p ≤ 0,05)

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

Messparameter:

pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit: µm/s (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit: µm/s (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit: µm/s (Velocity Average Path)



**Tabelle 27:** : Einfluss der Lagerungsdauer vor der Tiefgefrierung von 24 Std. im Vergleich zum Standardverfahren (2,5 Std.) auf die durchflusszytometrischen Messparameter von Tiefgefriersamen nach dem Auftauen (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Gruppe	Methoden			
		A	B	C	D
		$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$
FITC/PNA-L	2,5 Std.	31,5 <sup>b</sup> ± 9,2	38,4 <sup>a</sup> ± 9,4	37,9 <sup>a</sup> ± 9,3	37,4 <sup>a</sup> ± 10,6
	24 Std.	19,8 <sup>c</sup> ± 10,1	26,6 <sup>bc</sup> ± 13,0	24,4 <sup>bc</sup> ± 9,0	27,8 <sup>b</sup> ± 10,0
FITC/PNA-R	2,5 Std.	21,2 <sup>c</sup> ± 4,3	19,7 <sup>bc</sup> ± 5,6	16,1 <sup>a</sup> ± 4,3	19,9 <sup>bc</sup> ± 4,8
	24 Std.	22,7 <sup>c</sup> ± 9,7	20,3 <sup>bc</sup> ± 9,4	16,9 <sup>ab</sup> ± 6,7	18,8 <sup>abc</sup> ± 7,2
JC-1	2,5 Std.	26,6 <sup>bc</sup> ± 7,3	34,7 <sup>a</sup> ± 7,2	37,1 <sup>a</sup> ± 8,6	34,6 <sup>a</sup> ± 7,9
	24 Std.	23,5 <sup>c</sup> ± 7,0	30,3 <sup>ab</sup> ± 6,7	27,1 <sup>bc</sup> ± 5,2	28,3 <sup>ab</sup> ± 7,2
SCSA/DFI	2,5 Std.	15,5 <sup>bc</sup> ± 7,7	14,2 <sup>ab</sup> ± 6,6	10,3 <sup>a</sup> ± 4,3	17,3 <sup>bc</sup> ± 6,1
	24 Std.	20,6 <sup>c</sup> ± 8,9	19,7 <sup>c</sup> ± 9,1	12,8 <sup>ab</sup> ± 6,2	17,3 <sup>bc</sup> ± 7,5

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und zwischen den Lagerungszeiten 2,5-und 24 Std. (Spalten); (p≤0,05)

Methoden:

A: Verdünnt mit klarer HBS ohne Kissenzusatz 20min/1000 x g

B: Verdünnt mit klarer HBS; Kissenzusatz: Cushionfluid®Minitüb 20min/1000 x g

C: Verdünnt mit klarer Lsg. A (Eqcellsire®); Kissenzusatz: Lsg. B (Eqcellsire®) 20min/1000 x g

D: Verdünnt mit Magermilchverdünner (INRA-82); Kissenzusatz: Cushionfluid® Minitüb 20min/1000 x g

Messparameter:

FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

SCSA/DFI: Prozentsatz der Spermien mit hohem DNA-Fragmentationsindex

### 4.3 Versuchsreihe III: Einfluss der Abkühlungsgeschwindigkeit

Der Einfluss langsamer Abkühlungsraten von 22°C auf 5°C nach Zugabe von Glycerin bei 22°C vor dem Einfrieren (Methode A) und während des direkten Einfrierens von 22°C ohne Temperaturangleichung (Methode B) auf die Tiefgefriersamenqualität wird in den Tabellen 28 und 29 dargestellt.

Die Ergebnisse sind sowohl für die gesamte Hengstgruppe (n=8) als auch für Hengste mit günstiger (n=4) und ungünstiger Haltbarkeit (n=4) aufgezeigt. Signifikante Unterschiede der Tiefgefriersamenqualität aufgrund der Abkühlungsgeschwindigkeit zeigten sich bei den Motilitätsparametern (Tabelle 28) als auch bei den durchflusszytometrisch ermittelten Werten (Tabelle 29).

Die langsame Abkühlungsgeschwindigkeit auf 5°C vor dem Einfrieren zeigte einen positiven Einfluss auf die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien in der Gesamtbetrachtung aller Hengste in Tabelle 28. Aber auch unabhängig von der Toleranz der jeweiligen Hengstgruppe gegenüber gekühlter Lagerung konnten signifikant höhere Ergebnisse mit einer langsamen Abkühlungsrate erzielt werden ( $p \leq 0,05$ ). Ein Einfluss auf die ermittelten Geschwindigkeitsparameter war nicht zu erkennen. Zusätzlich zeigte sich eine deutliche Differenz in den Motilitätsparametern zwischen den Hengstgruppen mit guter und schlechter Tiefgefriereignung ( $p \leq 0,05$ ).

Die Überlegenheit des langsamen Abkühlungsvorganges vor dem Einfrieren konnte bei der Gesamtbetrachtung aller Hengste ebenfalls festgestellt werden (Tabelle 29). So zeigte sich ein positiver Anstieg sowohl für den prozentualen Anteil membranintakter und somit vitaler Spermien als auch für den prozentualen Anteil der Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential nach einer langsamen Abkühlungsrate auf 5°C ( $p \leq 0,05$ ). Bezüglich des akrosomalen Status wies die direkte Einfrieremethode ohne Abkühlungszeit auf 5°C einen signifikant höheren Anteil akrosomreagerter Samenzellen auf als nach einer langsamen Abkühlungszeit über 2,5 Std. ( $p \leq 0,05$ ). Der Vergleich der Ergebnisse bei Hengsten mit guter und schlechter Haltbarkeit zeigte bei beiden Hengstgruppen eine niedrigere Tiefgefriersamenqualität nach dem direkten Einfrieren bei 22°C ( $p \leq 0,05$ ). Weiterhin konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen aufgrund der Tiefgefriersamenqualität sowohl nach einer langsamen als auch ohne Abkühlungszeit festgestellt werden ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabelle 28:** Einfluss der Abkühlungsgeschwindigkeit auf die Motilitätsparameter bei Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe (n=8) und bei Hengsten mit guter (n=4) und schlechter Haltbarkeit (n=4) bei gekühlter Lagerung (3 Ejakulate pro Hengst).

Mess- parameter	Gruppe I		Gruppe II		Gruppe Gesamt	
	Methode		Methode		Methode	
	direkt	langsam	direkt	langsam	direkt	langsam
	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )
<b>pms</b>	37,7 <sup>b</sup> ± 8,0	45,6 <sup>a</sup> ± 10,2	24,1 <sup>c</sup> ± 9,9	29,4 <sup>b</sup> ± 11,3	30,9 <sup>1</sup> ± 7,3	37,5 <sup>2</sup> ± 9,4
<b>VSL</b>	30,1 <sup>a</sup> ± 7,7	34,9 <sup>a</sup> ± 9,1	16,7 <sup>b</sup> ± 5,2	20,9 <sup>b</sup> ± 7,3	23,4 <sup>1</sup> ± 9,4	27,9 <sup>1</sup> ± 10,8
<b>VCL</b>	78,6 <sup>a</sup> ± 18,6	88,7 <sup>a</sup> ± 18,7	47,6 <sup>b</sup> ± 13,3	58,1 <sup>b</sup> ± 15,6	63,1 <sup>1</sup> ± 22,4	73,4 <sup>1</sup> ± 22,9
<b>VAP</b>	36,6 <sup>a</sup> ± 8,7	41,8 <sup>a</sup> ± 10,2	21,0 <sup>b</sup> ± 6,7	25,6 <sup>b</sup> ± 8,3	28,8 <sup>1</sup> ± 10,9	33,7 <sup>1</sup> ± 12,3

a,b,c: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile ( $p \leq 0,05$ ).

1,2: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich zwischen den Abkühlungsgeschwindigkeiten innerhalb der gesamten Hengstgruppe (n=8)

Gruppe I: Hengste mit guter Haltbarkeit nach 24 Std. bei 5°C (4)

Gruppe II : Hengste mit schlechter Haltbarkeit nach 24 Std. bei 5 °C (n=4)

Messparameter:

pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Average Path)

**Tabelle 29:** Einfluss der Abkühlungsgeschwindigkeit auf die durchflusszytometrischen Untersuchungen bei Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe (n=8) und bei Hengsten mit guter (n=4) und schlechter Haltbarkeit (n=4) bei gekühlter Lagerung (3 Ejakulate pro Hengst).

Mess- parameter	Gruppe I		Gruppe II		Gruppe Gesamt	
	Methode		Methode		Methode	
	direkt	langsam	direkt	langsam	direkt	langsam
	$\bar{x} \pm sd$	$\bar{x} \pm sd$	$\bar{x} \pm sd$	$\bar{x} \pm sd$	$\bar{x} \pm sd$	$\bar{x} \pm sd$
<b>FITC/PNA-L</b>	30,6 <sup>b</sup> ± 4,5	35,8 <sup>ab</sup> ± 5,2	31,8 <sup>b</sup> ± 6,9	38,5 <sup>a</sup> ± 11,4	31,2 <sup>2</sup> ± 5,7	37,2 <sup>1</sup> ± 8,7
<b>FITC/PNA-R</b>	28,1 <sup>b</sup> ± 6,2	22,5 <sup>ab</sup> ± 7,5	28,9 <sup>b</sup> ± 7,3	19,9 <sup>a</sup> ± 4,4	28,5 <sup>2</sup> ± 6,6	21,2 <sup>1</sup> ± 6,2
<b>JC-1</b>	18,7 <sup>b</sup> ± 3,0	29,8 <sup>a</sup> ± 5,9	19,3 <sup>b</sup> ± 4,1	29,3 <sup>a</sup> ± 5,0	18,9 <sup>2</sup> ± 3,5	29,6 <sup>1</sup> ± 5,9
<b>SCSA/DFI</b>	15,5 <sup>a</sup> ± 6,5	13,3 <sup>a</sup> ± 6,3	19,2 <sup>a</sup> ± 5,7	17,0 <sup>a</sup> ± 4,4	17,3 <sup>1</sup> ± 6,2	15,1 <sup>1</sup> ± 5,6

a,b: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile ( $p \leq 0,05$ ).

1,2: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich zwischen den Abkühlungsgeschwindigkeiten innerhalb der gesamten Hengstgruppe (n=8)

Gruppe I: Hengste mit guter Haltbarkeit nach 24 Std. bei 5°C (n=4)

Gruppe II : Hengste mit schlechter Haltbarkeit nach 24 Std. bei 5 °C (n=4)

Messparameter:

FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

SCSA/DFI: Prozentsatz der Spermien mit hohem DNA-Fragmentationsindex

#### 4.4 Versuchsreihe IV: Einfluss der Samenzellkonzentration

Der Einfluss unterschiedlicher Samenzellkonzentrationen in 0,5 ml-Pailletten auf die Tiefgefriersamenqualität wird in den Tabellen 30-33 dargestellt.

Für die Betrachtung der gesamten Hengstgruppe sind die Ergebnisse der Motilitätsparameter und durchflusszytometrischen Untersuchungen in Tabelle 30 und Tabelle 31 aufgezeigt.

In Tabelle 30 ist erkennbar, dass zwischen den Konzentrationen 200 und 800 Mio. Sz/ml bei den Motilitätsparametern kein Unterschied besteht, die Konzentration von 1,6 Mrd. Sz/ml jedoch einen deutlich negativen Einfluss auf die Vorwärtsbeweglichkeit und die Geschwindigkeitsparameter (VCL, VSL und VAP) besitzt ( $p \leq 0,05$ ).

Deutlich erkennbar ist in Tabelle 31 ein negativer Einfluss der hohen Spermienkonzentrationen von 800 Mio. und 1,6 Mrd. Sz/ml auf Tiefgefriersamen bezüglich des prozentualen Anteils membranintakter und somit vitaler Spermien. Auch für den prozentualen Anteil an Spermien mit hohem DFI Wert nach SCSA®-Färbung zeigten sich bei einer hohen Konzentration von 1,6 Mrd. Sz/ml signifikant schlechtere Werte im Gegensatz zu einer Konzentration von 200 Mio. Sz/ml ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabelle 30:** Einfluss unterschiedlicher Samenkonzentrationen auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen ( $n=8$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Konzentrationen		
	200 Mio. Sz/ml	800 Mio. Sz/ml	1,6 Mrd. Sz/ml
	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$
pms	37,5 <sup>a</sup> ± 13,4	36,8 <sup>a</sup> ± 21,1	27,5 <sup>b</sup> ± 17,3
VSL	27,9 <sup>a</sup> ± 10,8	28,1 <sup>a</sup> ± 16,4	21,2 <sup>b</sup> ± 12,4
VCL	73,4 <sup>a</sup> ± 22,9	74,6 <sup>a</sup> ± 34,7	58,9 <sup>b</sup> ± 28
VAP	33,7 <sup>a</sup> ± 12,3	34,9 <sup>a</sup> ± 18,5	26,6 <sup>b</sup> ± 13,9

a,b: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile ( $p \leq 0,05$ ).

Messparameter:

pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Average Path)

**Tabelle 31:** Einfluss unterschiedlicher Samenkonzentrationen auf die durchflusszytometrischen Untersuchungen von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen ( $n=8$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Konzentrationen		
	200 Mio. Sz/ml	800 Mio. Sz/ml	1,6 Mrd. Sz/ml
	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$	$(\bar{x} \pm sd)$
<b>FITC/PNA-L</b>	37,1 <sup>a</sup> ± 8,7	30,1 <sup>b</sup> ± 9,9	28,7 <sup>b</sup> ± 10,3
<b>FITC/PNA-R</b>	21,2 <sup>a</sup> ± 6,2	25,2 <sup>a</sup> ± 12,2	23,4 <sup>a</sup> ± 9,8
<b>JC-1</b>	29,6 <sup>a</sup> ± 5,4	25,6 <sup>a</sup> ± 8,1	25,4 <sup>a</sup> ± 5,7
<b>SCSA/DFI</b>	15,1 <sup>a</sup> ± 5,6	19,1 <sup>ab</sup> ± 7,2	21,1 <sup>b</sup> ± 6,9

a,b: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile ( $p \leq 0,05$ ).

Messparameter:

FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

SCSA/DFI: Prozentsatz der Spermien mit hohem DNA-Fragmentationsindex

In den Tabellen 32 und 33 ist der Einfluss der verschiedenen Konzentrationen auf Hengste mit günstiger und ungünstiger Tiefgefriereignung dargestellt. Es besteht ein signifikanter Einfluss der Faktoren Verfahren und Gruppen.

Bei der Gruppe der Hengste mit günstiger Tiefgefriereignung zeigte sich bei den Motilitätsparametern (Tabelle 32) ein Unterschied der Werte bei den Konzentrationsstufen 200 und 800 Mio. Sz/ml zu 1,6 Mrd. Sz/ml, während bei der Gruppe der Hengste mit ungünstiger Tiefgefriereignung sich die niedrige Konzentrationsstufe 200 Mio.Sz/ml als signifikant überlegen darstellte ( $p \leq 0,05$ ). Ein signifikanter Unterschied zwischen der Tiefgefriersamenqualität der verschiedenen Hengstgruppen ist in Tabelle 32 besonders deutlich erkennbar ( $p \leq 0,05$ ).

In Tabelle 33 konnte bei den Hengsten mit guter Tiefgefriereignung nur bei dem prozentualen Anteil an DFI-positiven Spermien nach SCSA®-Färbung ein nachteiliger Einfluss der hohen Konzentration von 1,6 Mrd. Sz/ml festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Gruppe der Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung eine vermehrte Empfindlichkeit gegenüber der höheren Dichte von 800 Mio. Sz/ml und 1,6 Mrd. Sz/ml. Diese Konzentrationen wiesen sowohl bei den

membranintakten als auch bei den akrosomenreagierten Samenzellen signifikant schlechtere Werte gegenüber der Konzentration von 200 Mio.Sz/ml auf ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabelle 32:** Einfluss der Samenkonzentration auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter ( $n=4$ ) und schlechter Tiefgefriereignung ( $n=4$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Mess- parameter	Gruppe	Konzentration		
		200 Mio. Sz/ml	800 Mio. Sz/ml	1,6 Mrd. Sz/ml
		$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$	$(\bar{x} \pm \text{sd})$
pms	I	45,6 <sup>ab</sup> ± 10,2	54,6 <sup>a</sup> ± 11,0	38,1 <sup>b</sup> ± 10,5
	II	29,4 <sup>c</sup> ± 11,3	18,9 <sup>d</sup> ± 10,8	9,2 <sup>d</sup> ± 9,1
VSL	I	34,9 <sup>ab</sup> ± 9,0	42,6 <sup>a</sup> ± 8,8	28,4 <sup>b</sup> ± 9,0
	II	20,9 <sup>cd</sup> ± 7,3	13,6 <sup>de</sup> ± 5,2	9 <sup>e</sup> ± 6,1
VCL	I	88,7 <sup>ab</sup> ± 18,7	105,4 <sup>a</sup> ± 17,1	75,1 <sup>b</sup> ± 20,0
	II	58,1 <sup>c</sup> ± 15,56	43,9 <sup>d</sup> ± 12,8	31,3 <sup>d</sup> ± 14,5
VAP	I	41,8 <sup>ab</sup> ± 10,2	51,4 <sup>a</sup> ± 9,5	34,6 <sup>bc</sup> ± 9,8
	II	25,6 <sup>cd</sup> ± 8,32	18,3 <sup>de</sup> ± 5,7	12,8 <sup>e</sup> ± 7,2

a,b,c,d,e: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und zwischen den Gruppen I und II (Spalten) ( $p \leq 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung nach 24 Std. bei 5°C ( $n=4$ )

Gruppe II: Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung nach 24 Std. bei 5 °C ( $n=4$ )

Messparameter:

Pms: Prozentsatz aller vorwärtsbeweglichen Spermien

VSL: lineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Straight Line)

VCL: kurvilineare Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Curve Linear)

VAP: mittlere Geschwindigkeit:  $\mu\text{m/s}$  (Velocity Average Path)

**Tabelle 33:** Einfluss der Samenkonzentration auf die durchflusszytometrischen Untersuchungen von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter ( $n=4$ ) und schlechter Tiefgefriereignung ( $n=4$ ; 3 Ejakulate pro Hengst).

Messparameter	Gruppe	Konzentration		
		200 Mio. Sz/ml	800 Mio. Sz/ml	1,6 Mrd. Sz/ml
		( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )	( $\bar{x} \pm sd$ )
FITC/PNA-L	I	35,8 <sup>a</sup> ± 5,2	33,3 <sup>ab</sup> ± 5,1	31,3 <sup>ab</sup> ± 7,7
	II	38,5 <sup>a</sup> ± 11,0	26,9 <sup>b</sup> ± 12,6	24,2 <sup>b</sup> ± 13,1
FITC/PNA-R	I	22,5 <sup>ab</sup> ± 7,5	21,5 <sup>ab</sup> ± 7,5	20,6 <sup>ab</sup> ± 6,6
	II	19,9 <sup>a</sup> ± 4,4	28,9 <sup>b</sup> ± 14,9	28,1 <sup>b</sup> ± 12,9
JC-1	I	29,8 <sup>a</sup> ± 5,9	25,6 <sup>a</sup> ± 8,8	26,5 <sup>a</sup> ± 4,9
	II	29,4 <sup>a</sup> ± 5,0	25,6 <sup>a</sup> ± 7,7	23,5 <sup>a</sup> ± 6,8
SCSA/DFI	I	13,2 <sup>a</sup> ± 6,3	16 <sup>ab</sup> ± 6,9	21,2 <sup>b</sup> ± 7,9
	II	17 <sup>ab</sup> ± 4,4	22,2 <sup>b</sup> ± 6,3	21,1 <sup>b</sup> ± 5,2

a,b: Werte mit unterschiedlichen Indices unterscheiden sich signifikant innerhalb einer Zeile und zwischen den Gruppen I und II (Spalten) ( $p \leq 0,05$ ).

Gruppen:

Gruppe I: Hengste mit guter Tiefgefriereignung nach 24 Std. bei 5°C ( $n=4$ )

Gruppe II : Hengste mit schlechter Tiefgefriereignung nach 24 Std. bei 5 °C ( $n=4$ )

Messparameter:

FITC/PNA-L: Prozentsatz der lebenden, nicht akrosomenreagierten Spermien

FITC/PNA-R: Prozentsatz der akrosomenreagierten Spermien

JC-1: Prozentsatz der Spermien mit hohem Membranpotential

SCSA/DFI: Prozentsatz der Spermien mit hohem DNA-Fragmentationsindex



## 5. Diskussion

Unbefriedigende Trächtigkeitsraten, die mit der Insemination von Tiefgefriersperma im Vergleich zu Frischsamen erzielt wurden (KLUG 1989) und die Annahme, dass vor allem durch die Samenverarbeitung hervorgerufene Membranschäden eine Minderung der Vitalität und Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen verursachen (BLACH et al. 1989; WATSON 2000), waren Anlass, um in dieser Arbeit einzelne Aufbereitungsschritte für die Kryokonservierung von Hengstsamen zu untersuchen. Dazu standen insgesamt 34 Zuchthengste des niedersächsischen Landesgestütes zur Verfügung. Der Einfluss der jeweiligen Verfahren wurde bei der gesamten Hengstpopulation und bei den in Gruppen aufgeteilten Hengsten mit guter und schlechter Tiefgefriereignung bzw. Haltbarkeit überprüft. Zunächst wurden die Auswirkungen verschiedener Zentrifugationsverfahren und der Lagerungsdauer von gekühltem Samen vor der Tiefgefrierung untersucht. In einem weiteren Versuch wurden verschiedene Geschwindigkeiten einer Abkühlung von 22°C auf 5°C miteinander verglichen. Zusätzlich wurde der Einfluss unterschiedlicher Spermienkonzentrationen in 0,5 ml-Pailletten auf die Auftauqualität des Spermas überprüft. Die Auswertung erfolgte an Frischsperma und Tiefgefriersamen nach dem Auftauen.

Für die Spermadiagnostik standen moderne Untersuchungsgeräte und Verfahren zur Verfügung, die die herkömmlichen Verfahren ergänzen sollen. Zur Objektivierung der Motilitätsanalyse wurde ein computergestütztes Spermaanalyzergerät verwendet (Stroemberg - Mika, Montreux, Schweiz). Diese Systeme bieten neben der reinen Bewegungsanalyse weitere Parameter der Bewegungsformen und Intensität an, die z.T. mit der Fruchtbarkeit korreliert sind (LEIDL et al. 1987; WEITZE 2001).

Die Beurteilung des akrosomalen Status, des Mitochondrienpotentials und der Spermachromatinanalyse erfolgte mit Hilfe durchflusszytometrischer Untersuchungen (Durchflusszytometer FACScan™, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg). Vorteile der flowzytometrischen Untersuchung sind einerseits die Analyse tausender Zellen innerhalb von Sekunden (STOLLA 1984) und andererseits die höhere Sensitivität und gleichzeitige Mehrfachmessung im Vergleich zur mikroskopischen Beurteilung (MIYAZAKI et al. 1990; MAGISTRINI et al. 1997a).

## 5.1 Einfluss der Hengste

Infolge der Kryokonservierung kommt es zu einer negativen Beeinflussung der Samenqualität und damit auch der Befruchtungsergebnisse. Der Grad der Veränderung ist neben äußeren Faktoren von der individuellen Eignung der Hengstspemien für die Tiefgefrierung abhängig (KLUG et al. 1977; TISCHNER 1979).

Die Unterschiede zwischen den Gruppen der Hengste mit guter oder schlechter Tiefgefriereignung und die Beeinflussung dieser Gruppen aufgrund verschiedener Aufbereitungsverfahren wurden in der vorliegenden Arbeit überprüft. Die Einteilung der Hengste erfolgte nach Beurteilung des prozentualen Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien nach dem Auftauen. Dazu wurde über eine Periode von 6 Wochen (montags, mittwochs und freitags) Samen entnommen. Das Kriterium für schlechte Tiefgefriereignung war eine Vorwärtsmotilität von weniger als 35% nach dem Auftauen in mehr als drei von zehn Ejakulaten. Hengste mit höheren Auftaumotilitäten wurden der Gruppe der Hengste mit guter Tiefgefriereignung zugeordnet.

VIDAMENT (2005) hat aufgrund umfangreicher Untersuchungen die Faktoren festgelegt, die die Fertilität von gefrorenem Samen verbessern. Unter anderem ist ein wichtiges Kriterium eine Vorwärtsbeweglichkeit von  $\geq 30-35\%$ . Sie erachtete die Vorwärtsbeweglichkeit als besseres Einschätzungskriterium als die Geschwindigkeitsparameter, da hier eine deutlichere Beziehung zur Trächtigkeitsrate festzustellen war.

Die eigenen Untersuchungen bestätigten die Zuordnung der Hengste in Gruppen. Bei Tiefgefriersamen konnten signifikant höhere Werte bei Hengsten mit guter Tiefgefriereignung hinsichtlich der Vorwärtsbeweglichkeit, der Geschwindigkeitsparameter, der membranintakten Samenzellen und der Gesamtmorphologie im Vergleich zu Hengsten mit schlechter Tiefgefriereignung festgestellt werden ( $p \leq 0,05$ ). Auch bei Frischsperma zeigten sich Unterschiede zwischen den Hengstgruppen bei der Vorwärtsbeweglichkeit und dem Anteil der Spermien mit hohem Mitochondrienpotential in den Zentrifugationsversuchen.

Ein Effekt der verschiedenen Aufbereitungsverfahren auf die Samenqualität beider Hengstgruppen konnte festgestellt werden. Besonders deutlich trat dieser jedoch bei Hengsten mit schlechter Tiefgefriereignung bei einer schnellen Abkühlungsgeschwindigkeit von 22°C auf 5°C und bei hohen Samenzellkonzentration in 0,5 ml-Pailletten hervor.

## 5.2 Einfluss der Zentrifugation

Ziel der Untersuchungen in Versuchsreihe I und II war es, den Einfluss verschiedener Zentrifugationsverfahren auf die Rückgewinnungsrate und Gefriersamenqualität bei Hengsten mit guter und schlechter Tiefgefriereignung abzuklären.

Dazu wurde in der Versuchsreihe I die herkömmliche Standardmethode (600 x g, 10min) mit einer Kissenzentrifugationsmethode (1000 x g, 20min) und der Zentrifugation in einem silikonisierten Zentrifugenglas (1000 x g, 20min) verglichen.

In Versuchsreihe II wurden die Auswirkungen anhand unterschiedlicher Kissenzentrifugationstechniken mit verschiedenen Zentrifugationskissen und -verdünnern bei einer Gravitationskraft von 1000 x g und einer Dauer von 20 min überprüft. Dabei wurde zusätzlich eine Kontrollprobe ohne Kissen bei gleicher Gravitationskraft und Zentrifugationsdauer eingesetzt.

Die Verwendung der Kissenzentrifugationsmethode (83,2%) oder silikonisierter Zentrifugengläser (92,2%) erzielte eine signifikant höhere Rückgewinnungsrate im Vergleich zu der Standardmethode (75,6%). Weiterhin ergaben sich Unterschiede durch die eingesetzten Verdüner. Dabei zeigten sich bei Verwendung eines klaren Zentrifugationsverdünners wie hepesgepufferte Salzlösung und Eqcellsire®-Lsg. A bei den Methoden A (95,7%), B (93,8%) und C (93,3%) im Vergleich zum Magermilchverdünner, Methode D (85,7%), signifikant höhere Rückgewinnungsraten. Hiermit kann ein positiver Einfluss auf die Rückgewinnungsrate durch hohe Zentrifugationskraft und -dauer kombiniert mit klaren Verdünnermedien festgestellt werden.

Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen von REVELL et al. (1997), DELHOMME et al. (2004) und ECOT et al. (2005) überein. REVELL et al. (1997) konnten zeigen, dass mit Hilfe der Kissenzentrifugationstechnik bei hoher Beschleunigungskraft signifikant höhere Rückgewinnungsraten im Vergleich zu einem herkömmlichen Standardzentrifugationsverfahren erzielt werden konnten. DELHOMME et al. (2004) wiesen sogar eine Rückgewinnungsrate von 99% beim Einsatz einer Kissenzentrifugationstechnik mit klarem Zentrifugationsverdünner nach. Auch bei ECOT et al. (2005) ergab die Benutzung der Kissenzentrifugationstechnik mit einem klaren Zentrifugationsverdünner eine signifikant höhere Rückgewinnungsrate (100%) als die Verwendung eines Magermilchverdünners (81%).

Die Untersuchung der Frischsamenqualität zeigte keinen Unterschied zwischen dem Standardverfahren, der Kissenzentrifugationstechnik und der Zentrifugation im silikonisierten Glas. Dabei konnte ein generell positiver Effekt der Zentrifugation gegenüber der unzentrifugierten Kontrollprobe festgestellt werden, außer bei Zentrifugation mit hoher Beschleunigungskraft ohne Kissen (Methode A). Hier konnte ein negativer Einfluss auf die lineare und kurvilineare Geschwindigkeit (VSL u. VCL), auf den akrosomalen Status und auf das Mitochondrienmembranpotential aufgezeigt werden.

Bei der Untersuchung von Tiefgefriersamen wurden vermehrt membranintakte Samenzellen bei der Kissenzentrifugation im Vergleich zum Standardverfahren festgestellt. Die Zentrifugation ohne Kissen (A) zeigte bei Tiefgefriersamen, zusätzlich zu den negativen Effekten bei Frischsamen, eine deutliche Abnahme der progressiven Motilität und eine signifikante Zunahme des DNA-Fragmentationsindex (DFI). Bei der Kissenzentrifugationstechnik ergaben sich zwar niedrigere Werte bei den Prozentsätzen progressiv motiler Spermien und der Spermigeschwindigkeiten (VCL, VSL, VAP), ein positiver Effekt dieser Methode konnte jedoch sowohl auf den Anteil membranintakter als auch akrosomenreagerter Samenzellen und auf die Spermienchromatinstruktur festgestellt werden. Ein Grund für diese Ergebnisse ist möglicherweise die unterschiedliche Zusammensetzung der Zentrifugationsverdünner. So unterscheidet sich der Zentrifugationsverdünner Eqcellsire® durch den Zusatz von 2% Eigelb und die Abwesenheit von Magermilch. Da weitere Bestandteile nicht bekannt sind, liegt die Vermutung nahe, dass das Eigelb als Membranschutz wirkt, aber gleichzeitig zu einer reduzierten Motilität der Samenzellen führt.

Ein generell positiver Effekt der Zentrifugation durch die Reduzierung des Seminalplasmas wird durch die Ergebnisse verschiedener Autoren bestätigt (CORTEEL 1980; JASKO et al. 1991; SAMPER u. MORRIS 1998). Dabei ruft die Erhöhung der Zentrifugalbeschleunigung und der Zentrifugationsdauer einen signifikanten Anstieg der Membranschäden hervor (WEISS 2004). Bei menschlichen Ejakulaten führten AITKEN und CLARKSON (1988) die nach der Zentrifugation beobachteten irreversiblen Membranschäden auf sogenannte „reactive oxygen species“ (ROS) zurück. Diese physikalischen Schäden, hervorgerufen durch eine vermehrte Pelletierung der Samenzellen und durch den starken Druck, mit dem die Zellen gegen den Boden des Behältnisses gepresst werden, ließen sich bei Methode A (ohne Kissen) nachweisen. Obwohl die Zentrifugation mit hohen Zentrifugalkräften ( $956 \times g$ ) einen negativen Effekt auf die Motilität hervorruft (PICKETT et al. 1975b) konnte in der eigenen Untersuchung trotz erhöhter Beschleunigungskraft

und Zentrifugationsdauer (1000 x g/20min) bei der Zentrifugation mit Kissen im Vergleich zum Standardzentrifugationsverfahren kein nachteiliger Einfluss auf die Samenqualität nachgewiesen werden. MAKLER et al. (1984) beschreiben die Kissenzentrifugationsmethode als eine Technik, die das Arbeiten mit einer hohen Zentrifugationskraft ermöglicht, um eine höhere Rückgewinnungsrate zu erreichen. Gleichzeitig wird der physikalische Schaden durch die Gravitationskräfte und Pelletierung vermindert, indem die Spermien während der Zentrifugation auf einer weichen, kissenähnlichen Flüssigkeit mit hoher Dichte schwimmen. In einem Besamungsversuch konnten keine Unterschiede obiger Zentrifugationsverfahren im Bereich der Fertilität von DELHOMME et al. (2004) festgestellt werden.

Verdüner, welche Eigelb enthalten, bieten den Samenzellen eine Resistenz gegenüber den schädigenden Einflüssen der Zentrifugation (BOGART u. MEYER 1950). PICKETT et al. (1975b) jedoch fanden heraus, dass Spermien nach der Zentrifugation in einem Eigelb enthaltenden Verdünner eine reduzierte Motilität aufweisen. Auch PROVINCE et al. (1984) verglichen den Einfluss Eigelb enthaltender Verdünner sowie Magermilchverdünner auf die Motilität. Dabei stellten sie fest, dass sich ein Magermilchverdünner zur Erhaltung der Motilität besser eignet als ein Eigelb enthaltender Verdünner. Dagegen konnte ECOT et al. (2005) beim Vergleich der Kissenzentrifugationstechnik mit Zentrifugationsverdünnern mit und ohne Zusatz von Eigelb keinen Unterschied der Motilität feststellen. Allerdings schrieben sie dem Zusatz von Eigelb bei einer dreistündigen Lagerung vor der Zentrifugation einen negativen Einfluss auf die Motilität durch eine Interaktion mit dem Seminalplasma zu. DELHOMME et al. (2004) testeten ebenfalls den Zentrifugationsverdünner (Lsg. A + 2% Eigelb) kombiniert mit einem Kissen (Lsg. B) von Eqcellsire® und verglichen diese mit dem Standardverfahren (600 x g für 10min) verdünnt mit INRA-82, der ebenfalls 2% Eigelb enthielt. In einem Besamungsversuch stellten sie keine Fertilitätsunterschiede fest. Da die genauen Zusammensetzungen des Zentrifugationsverdünners (Lsg. A + 2% Eigelb) und des Zentrifugationskissens (Lsg. B) von Eqcellsire® nicht bekannt sind, kann ein Einfluss des Eigelbs auf die Motilität und als Ursache des niedrigen Anteils der akrosomenreagierten Samenzellen und beim DFI-Wert nach SCSA®-Färbung nur vermutet werden, weitere Untersuchungen zur Abklärung sind hier vorzuschlagen.

### 5.3 Einfluss der Lagerungsdauer

Die Möglichkeit, anstelle des Hengstes nur den gekühlten, frischkonservierten Hengstsamen zu technisch ausgestatteten Stationen zu transportieren, würde eine Lagerung des Samens vor der Tiefgefrierung voraussetzen. In dieser Arbeit zeigte jedoch eine 24stündige Lagerungsdauer vor dem Einfrieren einen deutlichen negativen Einfluss auf die Tiefgefriersamenqualität. Signifikant nahmen die Werte der Motilitätsparameter, der membranintakten Samenzellen und der Anteil der Samenzellen mit hohem MPP nach JC1-Färbung im Vergleich zum direkten Einfrieren nach Aufbereitung ab. Die Ergebnisse der Spermienchromatinstrukturanalyse lassen eine signifikante Zunahme des DFI nach 24stündigen Lagerung und Kryokonservierung erkennen. Dies bedeutet, dass der Anteil einzelsträngiger DNA nach Lagerung mit anschließender Tiefgefrierung signifikant höher ist als bei Proben, die nach 2,5 Std eingefroren wurden. Dieses Absinken der Werte ist vermutlich durch einen beginnenden physiologischen Alterungsprozess der Spermien bei der Lagerung entstanden. Aufgrund der hohen Atmungsaktivität der Spermien kommt es zur Bildung von freien Radikalen, die wiederum eine Lipidperoxidation nach sich zieht. Die Lipidperoxidation bewirkt eine Destabilisierung der Spermienmembran, die sich in einer Erhöhung der Permeabilität und in einem damit verbundenen Verlust von intrazellulären Bestandteilen wie Enzymen, Koenzymen und Elektrolyten äußert. Im weiteren Verlauf kommt es zum Agglutinieren der Spermien (SIEGEL et al. 1986), einem Aufbrauchen des ATP-Gehaltes (GRIVEAU et al. 1995) und einer Hemmung der Mitochondrienaktivität (BECONI et al. 1993). Auch REINSTORF (2003) fand heraus, dass eine längere Lagerung des Samens vor dem Einfrieren mehr Zellen mit einem niedrigen Membranpotential hervorruft. Akrosomintakte Spermien waren in den länger gelagerten Proben signifikant geringer vorhanden. Eine Übereinstimmung der eigenen Untersuchungen besteht auch mit den Daten von CROCKETT et al. (2001). Diese Autoren untersuchten den Effekt der Lagerungsdauer von gekühlten Samen vor der Kryokonservierung auf die Motilität. Dabei stellten sie einen höheren prozentualen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach dem Auftauen der Proben fest, die nach 2,5stündiger Lagerung bei 5°C eingefroren worden waren (27%), als bei Proben, die zuvor 24 Std. bei 5°C gelagert wurden (10%). Bei einer Abkühlungszeit von 6 und 12 Std. zeigte sich jedoch kein Unterschied zu 2,5 Std.

Zu guten Ergebnissen mit noch längeren Lagerungsdauern gelangten BACKMAN et al. (2004), die keinen signifikanten Unterschied in der Motilität nach dem Auftauen von Sperma finden konnten, welches nach 18 Std. Lagerung bei 5°C oder nach 2 Std. eingefroren worden war. Auch in den Trächtigkeitsraten konnten sie keinen Unterschied nach 18 Std. Lagerung bei 5°C erkennen. In Übereinstimmung mit BACKMANN et al. (2004) waren auch die Ergebnisse von MELO et al. (2005), die sogar nach 24 Std. Lagerung bei 5°C vor dem Einfrieren keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Motilität, der Membranintegrität und bei den Trächtigkeitsraten nachweisen konnten. Sie fügten sogar hinzu, dass diese Methode einen längeren Kontakt zu dem Verdüner zulässt und damit eine adäquate Wiederherstellung der Lipiddoppelmembran erreicht wird; dieses führe zu einer geringeren Schädigung der Spermienmembran nach der Kryokonservierung.

#### **5.4 Einfluss der Abkühlungsgeschwindigkeit**

Der Vergleich einer langsamen und einer schnellen Abkühlungsgeschwindigkeit von 22°C auf 5°C mit Zugabe von Glycerin bei 22°C vor dem Einfrieren war Ziel der Versuchsreihe III.

Eine langsame Abkühlung vor dem Einfrieren über eine Dauer von 2,5 Std. erwies sich gegenüber dem direkten Einfrieren als überlegen; der Anteil der vorwärtsbeweglichen, membranintakten und somit vitalen Spermien und der Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential war signifikant höher. Die direkte Einfrieremethode ohne Abkühlung auf 5°C führte zu einem signifikant höheren Anteil an akrosomreagierten Samenzellen als eine langsame Abkühlung ( $p \leq 0,05$ ). Dieser Effekt konnte sowohl bei der Gruppe der Hengste mit guter als auch schlechter Haltbarkeit festgestellt werden, wobei jedoch Samen von Hengsten mit schlechter Haltbarkeit eine höhere Empfindlichkeit gegenüber einer schnellen Abkühlungsgeschwindigkeit aufwiesen.

Der negative Einfluss des direkten Einfrierens stimmt mit den Ergebnissen von VIDAMENT et al. (2000) überein. Diese Autoren verglichen den Einfluss einer langsamen und schnellen Abkühlung von 22°C auf 4°C auf die Motilität von aufgetautem Samen. Dabei erfolgte die Zentrifugation und Zugabe von Glycerin entweder bei 4°C oder 22°C. Eine Verbesserung der Motilitäten nach dem Auftauen konnte durch die Zentrifugation und Zugabe von Glycerin bei 22°C und einer langsamen Abkühlung auf 5°C innerhalb einer Stunde vor dem Einfrieren erreicht werden. Sie gehen davon aus, dass bei Hengstsamen die Membranlipide bei einer Temperaturabsenkung von 22°C auf 4°C von einer flüssigen in eine gelartige Phase überwechseln. Dieser Übergang führt zu einer vermehrten Empfindlichkeit der Zellmembran gegenüber äußeren Einflüssen und zu einem

verstärkten osmotischem Stress durch Glycerolzugabe. Auch SIEME et al. (1998) vermuteten, dass ein schädigender Einfluss durch osmotische Veränderungen auf die Membranintegrität bei 22 °C geringer ausgeprägt ist als bei 4°C. WATSON und DUNCAN (1988) begründeten die tendenziell niedrigere Anzahl intakter Spermien nach schneller Abkühlung durch eine herabgesetzte Toleranz zellulärer Strukturen gegenüber osmotischem Stress. GILMORE et al. (1995) unterstrichen diese Aussage durch Untersuchungen an Eberspermien, welche in hypoosmotischen Medien bei starken Temperaturschwankungen das Phänomen des Kälteschocks aufwiesen. Auch AMANN und PICKETT (1987) machten für den vorzeitigen Motilitätsverlust der Spermien das Auftreten eines Kälteschocks beim raschen Absinken der Temperatur von 37°C bzw. 29°C auf 1°C verantwortlich. Langsame Abkühlungsgeschwindigkeiten oberhalb von 0°C werden als essentiell angesehen, um Kälteschockschäden zu minimieren und die Reorganisationsfähigkeit der Phospholipide innerhalb der Zellmembran zu gewährleisten (TISCHNER 1979; PALMER 1984; HOLT u. MORRIS 1986; WÖCKENER et al. 1992). Generell wird ein Kühlregime vor dem Einfrieren mit einer schnellen Abkühlungsrate von 37°C auf 22°C und einer daraufhin folgenden langsamen Abkühlungsrate (0,1-0,05°C/min) auf 5°C empfohlen, um Schäden aufgrund des Kälteschocks an Spermien zu verhindern.

In eigenen Untersuchungen konnten geringe Abkühlungsraten und damit eine schonendere Behandlung dadurch erreicht werden, dass der resuspendierte Samen im Samenaufbereitungsgefäß in ein Wasserbad mit Raumtemperatur verbracht und dieses Wasserbad in den Kühlschrank gestellt wurde. Die positive Wirkung solch geringer Abkühlungsraten zur Minimierung von Kälteschockschäden auf die Auftauqualität des Spermas sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Aufgrund großer Abweichungen der Samenqualität sowohl innerhalb der Ejakulate eines Hengstes als auch zwischen den Hengsten könnte sich eine individuelle Anpassung des Abkühlungs- und Einfrierprotokolls als vorteilhaft erweisen.

## **5.5 Vergleich der Samenzellkonzentrationen**

Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Einfluss verschiedener Samenzellkonzentrationen (0,2, 0,8, 1,6 Mrd. Samenzellen/ml) in 0,5 ml-Pailletten auf die Qualität von Tiefgefriersamen zu untersuchen. Die Untersuchungen wurden an einer Gruppe von insgesamt 8 Hengsten, aufgeteilt in zwei Gruppen mit empirisch guter (n=4) und schlechter Tiefgefriereignung (n=4), durchgeführt.



Dabei konnte festgestellt werden, dass Samen von Hengsten mit schlechter Tiefgefriereignung eine höhere Empfindlichkeit gegenüber den Samenzellkonzentrationen von 0,8 und 1,6 Mrd. Sz./ml zeigten als von Hengsten mit guter Tiefgefriereignung. Samen von Hengsten mit schlechter Tiefgefriereignung wiesen bei einer Konzentration von 0,8 Mrd. Sz./ml im Vergleich zu 0,2 Mrd. Sz./ml signifikant niedrigere Werte bei der Vorwärtsbeweglichkeit und bei dem Anteil membranintakter Spermien auf, während Samen von Hengsten mit guter Tiefgefriereignung hier keinen Unterschied zeigten. Ein negativer Einfluss der Konzentration von 1,6 Mrd. Sz./ml konnte bei beiden Hengstgruppen hinsichtlich der Vorwärtsbeweglichkeit, dem prozentualen Anteil membranintakter und somit vitaler Spermien, dem prozentualen Anteil an DFI-Spermien nach SCSA®-Färbung und den morphologischen Veränderungen festgestellt werden.

MAZUR (1985) schrieb, dass durch langsames Gefrieren die Spermien in engen Kanälen mit ungefrorener Lösung zwischen großen Eiskristallen sequestriert werden. Diese Kanäle werden umso enger, je tiefer die Temperatur sinkt. Die sich ausdehnenden Eisfelder verringern den Platz für die Zellen und schädigen sie. COURTENS und PAQUINON (1985) hat diese Vermutung durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an Eberspermien bestätigt. Durch diesen mechanischen Effekt ließe sich die zahlenmäßig höhere Schädigung der Plasmamembran in den Proben mit der höheren Konzentration erklären.

Zu anderen Ergebnissen kamen HÅÅRD und HÅÅRD (1991), die eine Erhöhung der Konzentration in 0,5 ml-Pailletten auf 1 Milliarden Samenzellen/ml ohne Beeinflussung der Tiefgefriersamenqualität erreichen konnten. Die Besamungsdosis wurde so auf eine Paillette reduziert. LEIPOLD et al. (1998) verglichen den Effekt von verschiedenen Spermienkonzentrationen ( $400 \times 10^6$  und  $1.6 \times 10^9$  Samenzellen/ml) in 0,5 ml-Pailletten auf die Trächtigkeitsrate von Stuten. Sie fanden heraus, dass die Motilität nach dem Auftauen keinen Unterschied bei den beiden verschiedenen Spermienkonzentrationen erkennen ließ. Allerdings konnte auch keine Verbesserung der Trächtigkeitsrate mit erhöhter Anzahl von vorwärtsbeweglichen Spermien festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse schlagen sie eine Besamungsdosis von einer 0,5 ml-Paillette mit einer Gesamtkonzentration von  $800 \times 10^6$  Samenzellen und einem Anteil von  $320 \times 10^6$  motilen Spermien vor. Einen Einfluss auf diese Ergebnisse durch verschiedene Tiefgefrierverdünner halten sie für möglich und schlagen daher weitere Versuche mit unterschiedlichen Verdünnern vor. Ein Jahr später bestätigten SQUIRES et al.

(1999) das Ergebnis, dass eine Konzentration zwischen  $200 \times 10^6$  Samenzellen/ml und  $1,6 \times 10^9$  Samenzellen/ml keinen nachteiligen Einfluss auf die Motilität von Tiefgefriersperma ausübt.

Dagegen fanden CROCKETT et al. (2000) nach der Tiefgefrierung bei einer niedrigen Konzentration (250 Millionen Spermien/ml) einen höheren Prozentsatz an motilen Spermien als bei Verwendung von 500 Millionen Spermien/ml.

Aufgrund der widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur wären weitere Untersuchungen über optimale Konzentrationen in Verbindung mit unterschiedlichen Verdünnern notwendig.

## 5.6 Schlussbetrachtung

In unseren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Kissenzentrifugationstechnik im Vergleich zur Standardzentrifugationsmethode keinen nachteiligen Einfluss auf die Tiefgefriersamenqualität ausübt und darüber hinaus zu signifikant höheren Rückgewinnungsraten führt. Eine Steigerung von rund 20% der Samendosis pro Ejakulat ist von wirtschaftlichem Interesse, besonders bei Hengsten mit geringer Spermienproduktion. Dabei konnten mit klaren Zentrifugationsverdünnern bessere Ergebnisse bei der Rückgewinnungsrate erzielt werden, jedoch erwiesen sich für die Samenqualität aufgrund des Membranschutzes von Magermilch und Eigelb die Verdüner INRA-82 und Eqcellsire® Lsg A von Vorteil. Die Zentrifugation bei hoher Gravitationskraft und Zentrifugationsdauer ohne Kissenzusatz führte zu einer Verminderung der Tiefgefriersamenqualität.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass eine Lagerungsdauer des aufbereiteten und gekühlten Samens von 24 Std. zu einer Verminderung der Tiefgefriersamenqualität führt. Aufgrund unterschiedlicher Ergebnisse verschiedener Autoren wäre es interessant, weitere Untersuchungen mit Hilfe der Kissenzentrifugationstechnik und verschiedenen Verdünnern zur Eingrenzung einer möglichen Lagerungszeit vor dem Einfrieren durchzuführen.

Eine hohe Abkühlungsgeschwindigkeit von  $22^{\circ}\text{C}$  auf  $5^{\circ}\text{C}$  vor dem Einfrieren führte zu einer Schädigung der Samenzellen, hervorgerufen durch den Effekt des Kälteschocks. Dagegen zeigte eine langsame Abkühlungsrate gute Ergebnisse für Samen von Hengsten mit guter als auch schlechter Haltbarkeit nach gekühlter Lagerung. Der Effekt geringer Abkühlungsraten zur Minimierung von Kälteschockschäden auf die Auftauqualität des Spermas könnte helfen, eine gleich bleibende Samenqualität und höhere Fertilitätsrate unabhängig von individuellen und täglichen Schwankungen zu erreichen.

Ein negativer Einfluss hoher Samenzellkonzentration ( $1,6 \times 10^9$  Sz./ml) in 0,5 ml-Pailletten auf die Tiefgefriersamenqualität wurde nachgewiesen. Dabei zeigte eine Konzentration von  $800 \times 10^6$  Samenzellen/ml mit guter Tiefgefriereignung keinen Einfluss auf die Samenqualität, während sich bei Samen mit schlechter Tiefgefriereignung eine Konzentration von  $200 \times 10^6$  Samenzellen/ml von Vorteil erwies.

Zusammenfassend wäre nach diesen Untersuchungen der verschiedenen Aufbereitungsverfahren zur Kryokonservierung von Hengstsamen die Zentrifugation mit der Kissenzentrifugationstechnik für 20 min bei  $1000 \times g$  kombiniert mit einem Magermilchverdünner (INRA) oder einem Eigelb enthaltenden Verdünner (Eqcellsire®), einer Zugabe von Glycerin bei  $22^\circ\text{C}$  und einer langsamen Abkühlungsrate auf  $5^\circ\text{C}$  über einen Zeitraum von 2,5 Std. und einer Konfektionierung mit einer Konzentration von  $200 \times 10^6$  Samenzellen/ml in 0,5 ml-Pailletten vorzuschlagen.

## 6. Zusammenfassung

Katharina Anne Knop (2006): Vergleich verschiedener Aufbereitungsverfahren zur Kryokonservierung von Hengstejakulaten

In der vorliegenden Arbeit wurden 5 verschiedene Aufbereitungsverfahren zur Verbesserung der Tiefgefriersamenqualität von Hengstsamen untersucht. Die Untersuchung wurde an insgesamt 34 Zuchthengsten des Landesgestütes Niedersachsen durchgeführt. Der Einfluss der jeweiligen Verfahren wurde einmal in Gesamtbetrachtung aller Hengste als auch an den einzelnen Gruppen der Hengste mit guter und schlechter Tiefgefriereignung bzw. Haltbarkeit überprüft. Die Motilität wurde mittels Computervideomikrographie (MIKA Motion Analyser), der akrosomale Status (SYTO®17 / FITC-PNA/PI-Färbung), das Mitochondrienmembranpotential (JC-1-Färbung) und die Spermienchromatinstruktur (SCSA™) wurden mittels Durchflusszytometer (FACScan™, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert und als Beurteilungskriterien eingesetzt.

In der **Versuchsreihe I** wurde die Zentrifugation mit erhöhter Gravitationskraft und Zentrifugationsdauer (1000 x g/20min) unter Verwendung einer Kissenzentrifugationstechnik (Cushionfluid®Minitüb) bzw. eines silikonisierten Zentrifugenglases (1000 x g/20min) mit einer Standardmethode (600 x g/10min) verglichen. Dies wurden an Samen von 14 Hengsten mit guter und schlechter Tiefgefriereignung überprüft (n=7; 3 Ejakulate pro Hengst). Dabei konnten höhere Rückgewinnungsraten (83%, 92%) bei hoher Zentrifugationskraft erreicht werden als bei der Standardmethode (75%) ( $p < 0,05$ ). Nach dem Auftauen konnte kein negativer Einfluss auf die Tiefgefriersamenqualität für Motilität, Anteil vitaler Spermien und akrosomreagierter Spermien sowie für Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential festgestellt werden.

In **Versuchsreihe II** wurde der Einfluss verschiedener Zentrifugationsverdünner auf die Kissenzentrifugation untersucht. Dies wurde mit der Zentrifugation ohne Kissenzusatz bei erhöhter Gravitationskraft und Zentrifugationsdauer (1000 x g/20min) verglichen. Es wurden Ejakulate von 12 Hengsten verwendet, die in Gruppen mit guter und schlechter Tiefgefriereignung aufgeteilt waren (jeweils n=6; 3 Ejakulate pro Hengst). Die Rückgewinnungsrate war signifikant höher (95%, 93%) bei der Zentrifugation mit einem klaren Zentrifugationsverdünner (Lsg. A + 2% Eigelb; Eqcellsire®, IMV L'Aigle Frankreich oder Hepes-gepufferte Salzlösung) als mit einem

Magermilchverdünner (INRA-82, 85%). Ein signifikant positiver Einfluss auf die Motilität und auf die membranintakten Samenzellen nach Zentrifugation konnte bei Verdünnung mit Magermilch (INRA-82) und Eigelb enthaltendem Verdünner (Eqcellsire®) festgestellt werden.

Die Zentrifugation mit erhöhter Gravitationskraft und Zentrifugationsdauer (1000 x g/20min) ohne Kissenzusatz zeigte im Vergleich zu der Zentrifugation mit Kissen einen schädigenden Einfluss auf die Motilität, auf den prozentualen Anteil vitaler und akrosomreagerter Spermien und auf Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential ( $p < 0,05$ ).

Die Lagerungsdauer von 24 Std. vor dem Einfrieren zeigte einen negativen Einfluss auf die Motilität, auf die Geschwindigkeitsparameter, auf den prozentualen Anteil vitaler Spermien und auf Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential im Vergleich zum Standardeinfrierverfahren nach 2,5 Std. ( $p < 0,05$ ).

**In Versuchsreihe III** wurde der Einfluss einer langsamen Abkühlungsrate auf 5°C vor dem Einfrierprozess mit direktem Einfrieren nach Zentrifugieren und der Glycerinzugabe bei 22°C auf die Qualität von Tiefgefriersperma verglichen. Dies wurde anhand von 8 Hengsten (3 Ejakulate pro Hengst) überprüft, die aufgrund ihrer Spermaqualität nach 24 Std. Lagerung bei 5°C in zwei Gruppen mit guter ( $n=4$ ) und schlechter ( $n=4$ ) Toleranz gegenüber dem Abkühlungsprozess und der Lagerung bei 5°C aufgeteilt worden waren. Nach langsamer Abkühlungsrate über eine Dauer von 2,5 Std. vor dem Einfrieren zeigte sich eine signifikante Überlegenheit bei der Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien, bei dem prozentualen Anteil membranintakter und somit vitaler Spermien und bei den prozentualen Anteil der Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential gegenüber dem direkten Einfrierverfahren von 22°C ( $p \leq 0,05$ ). Beim akrosomalen Status wies die direkte Einfrieremethode ohne Abkühlungszeit auf 5°C einen signifikant höheren Anteil akrosomreagerter Samenzellen auf als nach einer langsamen Abkühlungszeit ( $p \leq 0,05$ ).

**In Versuchsreihe IV** wurde der Einfluss von drei verschiedenen Samenzellkonzentrationen in 0,5 ml-Pailletten auf die Tiefgefriersamenqualität von 8 Hengsten, aufgeteilt in Gruppen mit guter und schlechter Tiefgefriereignung ( $n=4$ , 3 Ejakulate pro Hengst), untersucht. Die aufgetauten Samenproben zeigten bei einer Konzentration von  $200 \times 10^6$  Samenzellen/ml und  $800 \times 10^6$  Samenzellen/ml signifikant höhere Werte für die Vorwärtsbeweglichkeit, die Geschwindigkeitsparameter sowie für den prozentualen Anteil membranintakter und somit vitaler Spermien als bei einer Konzentration von  $1,6 \times 10^9$  Samenzellen/ml.

Während eine Erhöhung der Konzentration auf  $800 \times 10^6$  Samenzellen/ml bei Hengsten mit guter Tiefgefriereignung ( $n=4$ ) keinen Einfluss auf die Samenqualität zeigte, erwies sich bei Hengsten mit schlechter Tiefgefriereignung ( $n=4$ ) eine Konzentration von  $200 \times 10^6$  Samenzellen/ml von Vorteil.

Ein nach diesen Ergebnissen vorzuschlagendes Aufbereitungsprotokoll zur Kryokonservierung von Hengstsaamen beinhaltet die Zentrifugation mit Hilfe der Kissenzentrifugationstechnik für 20min bei  $1000 \times g$ , kombiniert mit einem Magermilch oder Eigelb enthaltenden Zentrifugationsverdünner, der Zugabe von Glyzerin bei  $22^\circ\text{C}$  nach der Zentrifugation und einer langsamen Abkühlungsrate auf  $5^\circ\text{C}$  über einen Zeitraum von 2,5 Std. sowie eine Konfektionierung mit einer Konzentration von  $200 \times 10^6$  Samenzellen/ml in 0,5 ml-Pailletten.

## 7. Summary

Katharina Anne Knop (2006): Evaluation of different methods for processing equine semen for freezing.

In order to improve the processing of semen prior to freezing, five experiments were conducted to evaluate damage occurring in each processing step. In experiment 1 increasing gravitational force and prolonged centrifugation time of up to 1000 x g for 20 min achieved either by cushioned technique (Cushion-fluid®) or use of siliconized glass tube resulted in a more efficient processing of stallion semen for freezing with respect to sperm recovery (83%, 92%) when compared to routine methods recommended for centrifugation of stallion semen (600 x g, 10min; 75%) ( $p < 0,05$ ). After thawing, neither high speed nor prolonged time of centrifugation showed detrimental effects on motility, membrane integrity, acrosomal status and mitochondrial membrane potential of spermatozoa in ejaculates with good and poor freezability from 14 stallions (7 stallions per group x 3 ejaculates) when compared to routine centrifugation method.

Experiment 2 evaluated a cushioned centrifugation technique in which various extenders were tested and compared to centrifugation up to 1000 x g for 20 min without cushion. Use of a cushion associated with a clear extender (Eqcellsire®: EQA+2% egg yolk or Hepes-buffered saline) improved the recovery rate of spermatozoa after centrifugation (95%, 93%) when compared to the use of an opaque extender containing milk (INRA-82, 85%). When semen was centrifuged up to 1000 x g for 20 min without a cushion, detrimental effects were shown on motility, membrane integrity, acrosomal status and mitochondrial membrane potential of spermatozoa in ejaculates with good and poor freezability from 12 stallions (6 stallions per group x 3 ejaculates) when compared to cushioned centrifugation methods.

Furthermore, in experiment 2 ejaculates have been centrifuged and processed as described above, cooled to 5°C and frozen with a delay of 24h. Freezing after a storage of 24h showed detrimental effects on motility, average path velocity, membrane integrity, acrosomal status and mitochondrial membrane potential of spermatozoa in ejaculates compared with the routine method of freezing after semen collection ( $p > 0,05$ ).

In experiment 3 a method of slow cooling for semen tubes from 22°C to 5°C in a beaker filled with water was tested after centrifugation and addition of glycerol in comparison to direct freezing from

22°C. Eight stallions with known high and low ability to survive cooling were used for artificial insemination of cooled-stored-transported semen in this study (n=4 stallions per group x 3 ejaculates). Post-thaw motility, average path velocity, membrane integrity, acrosomal status and mitochondrial membrane potential of spermatozoa were significantly improved ( $p>0,05$ ) by slow cooling prior to freezing for both groups of stallions.

Experiment 4 evaluated spermatozoa cryopreserved at 3 different concentrations in ejaculates from 8 stallions with known good and poor freezability (n=4 stallions per group x 3 ejaculates). Post-thaw motility, average path velocity, membrane integrity, acrosomal status and mitochondrial membrane potential of spermatozoa were significantly higher at spermatozoal concentrations of 200 and  $800 \times 10^6$ /ml than for the sample frozen at  $1,6 \times 10^9$  spermatozoa/ml. However, the stallions with known poor freezability (n=4) showed a lower quality in frozen-thawed semen already at a concentration of  $800 \times 10^6$  spermatozoa/ml.

In summary a suggested protocol for cryopreservation of stallion spermatozoa would include:

- 1) centrifugation by cushioned technique associated with a milk or an egg yolk extender at 1000 x g for 20 min;
- 2) slow cooling prior to freezing from 22°C to 5°C after centrifugation and addition of glycerol;
- 3) package in 0,5 ml straws at a concentration of  $200 \times 10^6$  spermatozoa/ml.



## 8. Literaturverzeichnis

AALSETH, E. P., u. R. G. SAACKE (1985):

Morphological change of the acrosome on motile bovine spermatozoa due to storage at 4°C.  
J. Reprod. Fert. 74, 473-478

AHLEMEYER, B. (1991):

Tiefgefrierkonservierung von Hengstsamen, Einfluß des Seminalplasmas auf Motilität und Kopfkappenintegrität der Samenzellen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

AITKEN, R. J., u. J. S. CLARKSON (1988):

Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining of the efficiency of sperm preparation technique.

J. Androl. 9, 367-376

ALVAREZ, J. G., u. B. T. STOREY (1993):

Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: Glycerin and other polyols as sole cryoprotectant.

J. Androl. 14, Nr. 3, 199-209

AMANN, R. P., u. L. C. GRIEL (1974):

Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymis, and ejaculated semen.

J. Dairy Sci. 57, 212-219

AMANN, R. P., u. B. D. SCHANBACHER (1983):

Physiology of male reproduction.

J. Anim. Sci. 57, Suppl. 2, 380-403

AMANN, R. P., u. B. W. PICKETT (1987):

Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa.

Equine Vet. Sci. 7, Nr. 3, 145-173

AURICH, J. E., A. KÜHNE, H. HOPPE u. C. AURICH (1996):

Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation.

Theriogenology, 46, 791-797

BAAS, J. W., P. C. MOLAN u. P. SHANNON (1983):

Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa.

J. Reprod. Fert. 68, 275-280

BACKMANN, T., J. E. BRUEMMER, J. K. GRAHAM u. E. L. SQUIRES (2004):

Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18h and then frozen.

J. Anim. Sci. 82, 690-694

BADER, H. (1968):

Weitere Erfahrungen über die Tiefgefrierung von Hengstsperma.  
Zuchthygiene 5, 87-88

BALL, B. A. u. A. VO (2001):

Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential.  
J. Androl. 72, 1061-1069

BAMBA, K., u. D. G. CRAN (1988):

Further studies on rapid dilution and warming of boar semen.  
J. Reprod. Fertil. 82, 509-518

BARKER, C. A., u. J. C. C. GANDIER (1957):

Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa.  
Can. J. Comp. Med. 21, 47-51

BARON, G. (1986):

Tiefgefrierkonservierung von Ebersamen in Kunststoffrohren: "In vitro" Untersuchungen zum Einfluß zweier Konfektionierungsformen und verschiedener Einfrier- und Auftaugeschwindigkeiten.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

BATELLIER, F., M. VIDAMMENT, J. FAUQUANT, G. DUCHAMP, G. ARNAUD, J. M. YVON u. M. MAGISTRINI (2001):

Advances in cooled semen technology.  
Anim. Reprod. Sci. 68, 181-190

BAUMGARTL, C. (1980):

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung über Veränderungen der Plasmamembran und Akrosomstruktur von Pferdespermien.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

BECONI, M. T., C. R. FRANZIA, N. G. MORA u. M. A. AFFRANCHINO (1993):

Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation.  
Theriogenology 40, 841-851

BEDFORD, S. J., J. K. GRAHAM, R. P. AMANN, E. L. SQUIRES u. B. W. PICKETT (1994a):

Use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5°C with and without seminal plasma.  
Theriogenology, 43, 939-953

BEDFORD, S. J., D. J. JASKO, J. K. GRAHAM, , R. P. AMANN, E. L. SQUIRES u. B. W. PICKETT (1994b):

Effects of seminal extenders containing egg yolk and Glyzerin on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa.  
Theriogenology, 43, 955-967

BEISKER, W. (1994):

A new combined integral-light and slit-scan data analysis system (DAS) for flow cytometry.  
Computer Methods and Programs in Biomedicine 42, 15-26

BERGER, T., u. E. D. CLEGG (1985):

Effect of male accessory gland secretions on sensitivity of porcine sperm acrosomes to cold shock, initiation of motility and loss of cytoplasmatic droplets.  
J. Anim. Sci. 60, 1295-1302

BERNDTSON, W. E., u. R. H. FOOTE (1972):

The freezability of spermatozoa after minimal pre-freezing exposure to Glyzerin or lactose.  
Cryobiology 9, 57-60

BLACH, E. L., R. P. AMANN, R. A. BOWEN u. D. FRANTZ (1989):

Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristics.  
Theriogenology 31, 283-298

BLOM, E. (1950):

Eine Schnellfärbemethode mit Eosin und Nigrosin zur Unterscheidung von lebenden und toten Spermien.  
Wien. tierärztl. Wochenschr. 37, 441-442

BOGART, R. u. DT. MEYER (1950):

The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability.  
J. Anim. Sci. 9, 143

BONGSO, A., A. K. JARINA, J. HO u. S. S. RATNAM (1993):

Comparative evaluation of three sperm washing methods to improve sperm concentration and motility in frozen-thawed oligozoospermic and normazoospermic samples.  
Arch. Androl. 31, 223-230

BOWEN, J. M. (1969):

Artificial insemination in the horse.  
Equine vet. J. 1, 89-110

BRINSKO, S. P. u. D. D. VARNER (1992):

Artificial insemination and preservation of semen.  
Vet. Clin. North Am. Equine Pract., 8, 205-218

BRINSKO, J. W., E. C. CROCKETT u. E. L. SQUIRES (2000):

Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage.  
Theriogenology 54, 129-136

- BRUEMMER, J. H., R. W. EDDY u. W. J. DURYEY (1963):  
Temperature control in low temperature preservation of spermatozoa.  
J. Cellul. Comp. Physiol. 62, 113-117
- BUELL, J. R. (1963):  
A method for freezing stallion semen and tests of its fertility.  
Vet. Rec. 75, 900-902
- BURNS, P. J., u. D. S. REASNER (1995):  
Computerized analysis of sperm motion: Effects of Glyzerin concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa.  
J. Equine Vet. Sci. 15, 337-380
- BWANGA, C. O. (1991):  
Cryopreservation of boar semen I: a literature review.  
Acta vet. scand. 32, 431-453
- CHANG, M. C., A. HANDA u. D. M. HUNT (1971):  
Effects of seminal plasma on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in relation to the time of ovulation.  
J. Reprod. Fert. 27, 125-129
- CHAVES VIEIRA, R. (1980):  
Akrosinbestimmung an Pferdespermien unter Berücksichtigung bestimmter andrologischer Fragestellungen.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- CLAY, C. M., N. P. SLADE, R. P. AMANN u. E. L. SQUIRES (1984):  
Effects of extenders, storage temperature and centrifugation on stallion spermatozoa motility and fertility.  
Int. Cong. Anim. Reprod. And AI , 10, 186
- 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, Nr. 6, 735-741
- COCHRAN, J. D., R. P. AMANN, D. P. FROMAN u. B. W. PICKETT (1984):  
Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post thaw motility of equine sperm.  
Theriogenology, 22, 25-38
- COOPER, W. L. (1997):  
Methods of determining the side of bacterial infections in the stallion reproductive tract.  
Proc. Soc. Theriogenology Mobile, 1-3

- CORTEEL, J. M. (1980):  
Effects du plasma seminal sur la survie et la fertilité des spermatozoides conservés in vitro.  
Reprod. Nutr. Dev. 20, 1111-1123
- COURTENS, J. C., u. M. PAQUINON (1985)  
Ultrastructure of fresh, frozen and frozen thawed spermatozoa of the boar.  
In: 1<sup>st</sup> Int. Conf. Deep Freezing Boar Semen, Uppsala 1985, Ber. S. 61-87
- CRISTANELLI, 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, Nr. 1, 39-45
- CRISTANELLI, M. J., E. L. SQUIRES, R. P. AMANN u. B. W. PICKETT (1985):  
Effects of egg yolk and Glycerin levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa.  
Theriogenology, 4, 681-686
- 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
- DAW, A., J. FARRANT u. G. J. MORRIS (1973):  
Membrane leakage of solutes after thermal shock or freezing.  
Cryobiology 10, 126-133
- DELHOMME, G., M. VIDAMENT, P. ECOT u. G. DECUADRO-HANSEN (2004):  
Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen for freezing.  
15<sup>th</sup> Intern. Congr. Animal. Reprod. AI 2, 496
- DELIUS, D. (1985):  
Untersuchungen zur Tiefgefrierung von Pferdesamen in 0,5 ml Volumeneinheiten mit Hilfe computergesteuerter Einfrierprogramme.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss
- DIGRASSI, 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.
- DOUGLAS-HAMILTON, D. H., R. ORSOL u. G. ORSOL (1984):  
A field study of the fertility of transported equine semen.  
Theriogenology, 22, 291-303

- DROBNIS, E. Z., L. M. CROWE, T. BERGER, T. ANCHORDOGUY, J. W. OVERSTREET u. J. H. CROWE (1993):  
Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model.  
J. Exp. Zool. 265, 432-437
- EBERTUS, R. (1960):  
Die Verdünnung von Hengstsperma mit Rindervollmilch.  
Vet. Med. 17, 618
- ECOT, P., G. DECUADRO-HANSEN, G. DELHOMME u. M. VIDAMENT (2005):  
Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen.  
Anim. Reprod. Sci. 89, 1-4, 245-246
- EVENSON, D. P., u. L. JOST (2000):  
Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.  
Meth. Cell. Sci. 22, 169-189
- FAHY, G. H. (1986):  
The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology.  
Cryobiology 23, 1-13
- FARRANT, J., u. G. J. MORRIS (1973):  
Thermal shock and dilution shock as the causes of freezing injury.  
Cryobiology. 10, 134-140
- FAZANO, F. A. T. (1986):  
Zur Kryokonservierung von Ebersperma;  
Verschiedene Verfahren zur Samenbehandlung und unterschiedliche Konfektionierungsmethoden unter besonderer Berücksichtigung der Einfriereschwindigkeit.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- FERGUSON, W. J., K. J. BRAUNSCHWEIGER, W. R. BRAUNSCHWEIGER, J. R. SMITH, C. C. WASMAN, N. P. JARVIS u. D. H. BELL (1980):  
Hydrophen ion buffers for biological research.  
Anat. Biochem. 104, 300-310
- FISER, P. S. (1990):  
Interactions of cooling velocity, warming velocity and glycerol concentration on the survival of frozen-thawed boar semen.  
Reprod. Dom. Anim. 1 (Suppl.), 123-137
- GARNER, D. L., C. A. THOMAS u. C. G. GRAVANCE (1999):  
The effect of Glycerin on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa.  
Reprod. Dom. Anim. 34, 399-404

GELLERT-MORTIMER, S. T., G. N. CLARK, H. W. G. BAKER, R. V. HYNE u. W. I. H. JOHNSON (1988):

Evaluation of Nycodenz and Percoll density gradients for the selection of motile human spermatozoa.

Fertil. Steril. 49, 335-353

GILMORE, J. A., L. E. MCGAN, J. LIU, D. Y. GO, A. T. PETER, F. W. KLEINHANS u. J. K. CRITSER (1995):

Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa.

Biol. Reprod. 53, 985-995

GÖTZE, R. (1949):

Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere.

Verlag Schaper, Hannover

GORUS, F. K u. D. G. PIPELEERS (1981):

A rapid method for fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility.

Fertil. Steril. 35, 662

GRAHAM, J. K. (1996):

Cryopreservation of stallion spermatozoa.

Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 12 (1), 131-147

GRIVEAU, J. F., E. DUMONT, P. RENARD, J. P. CALLEGARI u. D. LE LANNOU (1995):  
Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa.

J. Reprod. Fertil., 103, 17-26

HÅÅRD, M. C., u. M. G. H. HÅÅRD (1991):

Successfull commercial use of frozen stallion semen abroad.

J. Reprod. Fertil., Suppl. 44, 647-648

HAGEDORN, K. (1992):

Beeinflussung der Motilität und Morphologie von frischverdünnten Hengstsperma bei Zusatz von bovinen Serumalbumin unter Berücksichtigung zweier Lagerungsverfahren.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

HAMMERSTEDT, R. H., J. K. GRAHAM u. J. P. NOLAN (1990):

Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive.

J. Androl. 11, Nr. 1, 73-88

HARRISSON, R. A. P. (1976):

A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 48, 347

HARRISSON, R. A. P. u. I. G. WHITE (1972):

Some methods of washing spermatozoa from bull, boar and ram: a comparison using biochemical and other criteria.

J. Reprod. Fertil. 27, 271-284

HEFFE, G. (1993):

Untersuchungen zur Frischspermakonservierung von Hengstsamen; Überprüfung des Einflusses verschiedener Zentrifugationsverdünner auf die Haltbarkeit von Frischsamen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

HEISKANEN, M.-L., A. PIRHONEN, E. KOSKINEN u. P. H. MAENPAA (1987):

Motility and ATP content of extended equine spermatozoa in different storage conditions.

J. Reprod. Fertil. Suppl. 35, 103-107

HEITLAND, A. V., D. J. JASKO, E. L. SQUIRES, J. K. GRAHAM, B. W. PICKETT u. C. HAMMILTON (1996):

Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa.

Equine Veterinary Journal, 28(1), 47-53

HESS, R., W. SCHÄFER, D. SCHMIDT u. W. BAUM (1968):

Versuche zur Pelletierung von Hengstsperma.

Fortpfl. Bes. Aufzucht. Haust. 4, 207-214

HOLT, W. V., u. R. D. NORTH (1985):

Determination of lipid composition and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa.

J. Reprod. Fertil. 73, 285-294

HOLT, W. V., u. J. MORRIS (1986):

Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa.

in: Prog. Ann. Mtg. Soc. Study. Fertile., Abstr., S. 66

HUGHES, J. P., u. R. G. LOY (1970):

Artificial insemination of mares using semen from six stallions.

Cornell Vet. 60, 463-475

HYNE, R. V., A. STOJANOV, G. N. CLARKE, A. LOPATA u. W. I. H. JOHNSTON (1986):

Pregnancy from in vitro fertilization of human eggs after separation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation.

Fertil. Steril. 45, 93-96

ILJINSKAJA, T. (1956):

The effect of various factors on stallion spermatozoa frozen to  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Ref. in: Anim. Breed. Abstr. 25 (1957), 132



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

JONES, R. G. u. W. V. HOLT (1974):  
The effect of washing on the ultrastructure and cytochemistry of ram spermatozoa.  
J. Reprod. Fertil. 41, 159

KAYSER, J. P., R. P. AMANN, R. K. SHIDELER, E. L. SQUIRES, D. J. JASKO u. B. W. PICKETT (1992):  
Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa.  
Theriogenology, 38, 601-614

KENNEY, R. M., R. V. BERGMANN, W. L. COOPER u. G. W. MORSE (1975):  
Minimal contamination technique for breeding mares: Technique and preliminary findings.  
In: Proc. Am. Assoc. Equine Pract. 21, S. 327-336

KLOPPE, L. H., D. 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., A.-R. GÜNZEL, H. MERKT u. D. KRAUSE (1977):  
Untersuchung von Hengsten zum Einsatz in der instrumentellen Samenübertragung mit Tiefgefriersperma.  
Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 84, 236-238

KLUG, E. (1982):  
Untersuchung zur klinischen Andrologie des Pferdes.  
Die Bedeutung andrologischer Befunde am Hengst für den Zuchteinsatz.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Habil.-Schr.

KLUG, E. (1989):  
Neue Chancen der instrumentellen Samenübertragung beim Pferd.  
Tierärztl. Umschau 44, 489-491

KLUG, E. (1990):  
Frischsamenübertragung beim Pferd.  
Verlag M. & H. Schaper, Hannover, S. 23, 118

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

KNEIßL, S. (1993):

Tiefgefrierkonservierung von Pferdesperma: Einfluß der Samenentnahmetechnik, Zentrifugation, Konfektionierungsform und Einfriermethode auf die Motilität und Membranintegrität der Samenzellen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

KOSKINEN, E., M. JUNNILA, T. KATILA u. H. SOINI (1989):

A preliminary study on the use of betaine as a cryoprotective agent in deep freezing of stallion semen.

J. Vet. Med. 36, 110-114

KRIENKE, M. (2003):

Evaluierung durchflusszytometrischer Verfahren zur Beurteilung der Qualität von kryokonserviertem Hengstesperma.

München, Tierärztl. Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, Diss.

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

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

Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 94, 461-464

LEIPOLD, S. D., J. K. GRAHAM, E. L. SQUIRES, P. M. MCCUE, S. P. BRINSKO u. D. K. VANDERWALL (1998):

Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen.

Theriogenology 49, 1537-1543

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

LITTLE, T. V., u. G. L. WOODS (1987):

Ultrasonography of accessory sex glands in the stallion.

J. Reprod. Fert., Suppl. 35, 87-94

LOOMIS, P. R., R. P. AMANN, E. L. SQUIRES u. B. W. PICKETT (1983):

Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws.

J. Anim. Sci. 56, 687-693

LOVE, C. C., W. L. LOCH, F. BRISTOL, R. M. KENNEY (1989):

Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging methods.

Theriogenology 31, 613-622

LOVELOCK, J. E., u. M. W. H. BISHOP (1959):

Prevention of freezing damage to living cells by Dimethyl Sulphoxid.

Nature 183, 1394-1395

- LOVELOCK, J. E. (1953):  
The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing.  
Biochim. Biophys. Acta 10, 414-426
- MAGISTRINI, M., PH. CHANTELOUBE u. E. PALMER (1987):  
Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing.  
J. Reprod. Fertil. Suppl.35, 127-133
- MAGISTRINI, M., E. GUITTON und Y. LEVERN, J.CI. NICOLLE, M. VIDAMENT, D. KERBOEUF u. E. PALMER (1997a):  
New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry.  
Theriogenology 48, 1229-1235
- MAGISTRINI, M., M. SATTLER, J. M. YVON u. M. VIDAMENT (1997b):  
Freezability of stallion spermatozoa evaluated by motility, membrane integrity and ATP content.  
34<sup>th</sup> annual meeting of the society of cryobiology, Barcelona, June 8-12, Abstract 95
- MAKLER, A., O. MURILLO, G. HUSZAR, B. TARLATZIS, A. H. DeCHERNEY u. F. NAFTOLIN (1984):  
Improved techniques for separation motile spermatozoa from human semen. I. A self-migratory technique.  
Int. J. Androl. 7, 61
- MAKLER A., u. P. JACOBI (1981):  
Effects of shaking and centrifugation on human sperm motility.  
Arch. Androl 7, 2
- MANN, T., u. C. LUTWAK-MANN (1981):  
Male reproductive function and the composition of semen: General considerations.  
In: Male reproductive function and semen.  
Verlag Springer, Berlin, Heidelberg, 1-34
- MANN, T. (1975):  
Biochemistry of stallion semen.  
J. Reprod. Fert. Suppl. 23, 47-52
- MARDEN, W., u. N. T. WERTHESSEN (1956):  
Influence of seminal fluid on sper motility.  
Fertil. Steril. 7, 508-515
- MARTIN, J. C., E. KLUG u. A.-R. GÜNZEL (1979):  
Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws.  
J. Reprod. Fertil., Suppl. 27, 47-51
- MARTIN, J. C., u. E. KLUG (1979):  
Zur Samenübertragung beim Pferd – Spermakonservierung in Kunststoffröhrchen.  
Prakt. Tierarzt 3, 193-204

- MATAS, C., J. GADEA u. G. DECUADRO-HANSEN (2005):  
Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing boar semen for freezing.  
*J. Reprod. Fert. Dev.* 17(2), 195-195
- MAZUR, P. (1970):  
Cryobiology: The freezing of biological systems.  
*Science* 168, 939-948
- MAZUR, P. (1980):  
Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos.  
In: 9th Inter. Congr. on Anim. Reprod. and A. I., Madrid 1980, S. 99-114
- MAZUR, P. (1985):  
Basic concepts in freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates.  
*Cryobiology* 14, 251-272
- MAZUR, P. (1963):  
Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing.  
*J. Gen. Physiol.* 47, 347-369
- McLEOD, J., u. W. R. MCGEE (1950):  
The semen of the thoroughbred.  
*Cornell Vet.* 40, 233-248
- MELO, C. M., F. S. ZAHN, I. MARTIN, K. ALBERTI, C. ORLANDI, E. R. SIQUEIRA FILHO,  
J. A. DELL'AQUA, M. A. ALVARENGA, u. F. O. PAPA (2005):  
Effects of cooling stallion semen for 24h before freezing on fertility rates.  
*Anim. Reprod. Sci.* 89, 250-252
- MERKT, H., u. D. KRAUSE (1966):  
Tiefgefrierversuche mit Equidensperma unter Anwendung des sog. Pellet-Verfahrens.  
*Dtsch. tierärztl. Wochenschr.* 73, 267-268
- MERKT, H. (1976):  
Equine artificial insemination.  
*Vet. Rec.* 99, 69-71
- MERYMAN, H. T. (1970):  
The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspensions as a cause of freezing injury.  
In: The frozen cell.  
G. E. Wolstenholme and M. O' Connor, Eds., Churchill, London, 61-64
- MEYER, G. (1951):  
Versuche zum Zentrifugieren des Hengstspermas.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

- MILOVANOV, V. K. (1934):  
Jskustvennoe osemenenie S.-L. Zivonyh (Artificial insemination of livestock).  
Mascow, Seljhozgiz.
- MORAN, D. M., D. J. JASKO, E. L. SQUIRES u. R. P. AMANN (1992):  
Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa.  
Theriogenology 38, 999-1012
- MIYAZAKI, R., M. FUKUDA u. H. TAKEUCHI (1990):  
Flow cytometry to evaluate acrosome reacted sperm.  
Arch. Androl. 25, 243-251
- NAGASE, H., u. E. F. GRAHAM (1964):  
Pelleted semen: Comparison of different extenders and processes on fertility of bovine spermatozoa.  
In: V. Int. Congr. on Anim. Reprod. and A. I., Trient 1964,  
Vol. 4, S. 387-391
- NISHIKAWA, Y. (1975):  
Studies of the preservation of raw and frozen horse semen.  
J. Reprod. Fertil. 23, 99-104
- NISHIKAWA, Y., u. S. SHINOMIYA (1972):  
Our experimental results and methods of deep freezing of horse spermatozoa  
Animal. Reprod. A. I., 207-213
- NISHIKAWA, Y., u. S. SHINOMIYA (1976):  
Results of conception tests of horse semen during the past ten years.  
8<sup>th</sup> Intern. Congr. Animal. Reprod. AI 4, 155-167
- NISHIKAWA, Y., Y. WAIDE u. S. SHINOMIYA (1968):  
Studies on deep freezing of horse spermatozoa.  
In: 6th Int. Congr. on Anim. Reprod. and A. I., Paris 1968,  
Vol.2, S.1589-1591
- OETJEN, M. (1988):  
Überprüfung verschiedener Akrosomfärbungen zur Qualitätsbeurteilung von Nativ- und Tiefgefriersperma des Pferdes.  
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- OSHIDA, H., S. HORIUSHI, H. TAKAHASHI, T. TOMIZUKA u. H. NAGASE (1968):  
Fertility of frozen horse semen and some factors affecting to it.  
6<sup>th</sup> Intern. Congr. Animal Reprod. AI 2, 1597-1599

PACE, M. M., u. J. J. SULLIVAN (1975):

Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen.

J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 115-121

PADILLA, A. W., u. R. H. FOOTE (1991):

Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa.

J. Anim. Sci. 69, 3308-3313

PALMER, E. (1984):

Factors affecting stallion semen survival and fertility.

In: 10th Int. Congr. on Anim. Reprod. and A. I., Urbana 1984, Vol 3, S. 377-379

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

Automated analysis of stallion semen post-thaw motility.

Acta vet. scand., Suppl. 88, 137-152

PAQUINON, M. (1985):

Freezing and thawing extenders for boar spermatozoa.

In: 1. Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala 1985

Ber., S. 129-145

PICKETT, B. W., L. C. FAULKNER und J. L. VOSS (1975a):

Effect of season on some characteristics of stallion semen.

J. Reprod. Fert., Suppl. 23, 25-28

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

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

Fertil. Steril. 26, 167-174

PICKETT, B. W. (1980):

Factors affecting stallion management.

In: MORROW, D.A.: Current Therapy in theriogenology.

W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 681-688

POLGE, C. (1956):

Artificial insemination in pigs.

Vet. Rec. 68, 62-76

POLGE, C., A. U. SMITH u. A. S. PARKES (1949):

Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.

Nature 164, 666

POLGE, C., u. C. MINOTAKIS (1964):

Deep freezing of jackass and stallion semen.

In: 5th Int. Congr. on Anim. Reprod. and A. I., Trient 1964, Vol. 1, S. 545-552

PROVINCE, C. A., R. P. AMANN, B. W. PICKETT u. E. L. SQUIRES (1984):

Extender for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C.

Theriogenology, 22, 409-415

QUINN, P. J. (1985):

A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes.

Cryobiology 22, 128-146

RAJAMANNAN, A. H. J., R. ZEMJAS u. J. ELLERY (1968):

Freezing and fertility studies with stallion semen.

6<sup>th</sup> Inter. Congr. Anim. Reprod. AI 2, 1601-1968

REINSTORFF, F (2003):

Computermikrographische Analyse morphofunktioneller Veränderungen an flüssig- und tiefgefrierkonserviertem Pferdesamen und deren Beziehung zur Fertilität.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

REVELL, S. G., M. T. PETTIT u. T. C. FORD (1997):

Use of centrifugation over iodixanol to reduce damage when processing stallion sperm for freezing.

Proceedings of the Joint Meeting Society for the Study of Fertility, 92, 38

RÖBBELEN, I. (1993):

Vergleichende Untersuchungen an unterschiedlich aufbereitetem Pferdetiefgefriersamen. Einfluß verschiedener Tiefgefrierverdünner, der Anpassungszeit sowie variiertes Einfriergeschwindigkeiten auf Motilität und Membranintegrität der Samenzellen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

ROBERTS, S. J. (1986):

Infertility in male animals.

In: S. J. ROBERTS (Hrsg.) : Veterinary obstetrics and the genital diseases.

Woodstock, VT., S. 752-782

RODGER, J. C. (1975):

Seminalplasma, an unnecessary evil?

Theriogenology, 3, Nr.6, 237-247

SAMPER, J. C., u. C. A. MORRIS (1998):

Current methods for stallion semen cryopreservation: A survey.

Theriogenology, 49, 895-903

- SAMPER, J. C., P. HEARN, A. GANHEIM, E. CURTIS (1994):  
Pregnancy rates and effect of extender on motility and acrosome status of frozen-thawed stallion spermatozoa.  
Proc. Am. Assoc. Equine Pract. 40<sup>th</sup> Ann. Conv. 41-42
- SAMPER, J. C. (1995):  
Stallion semen cryopreservation: Male factors affecting pregnancy rates.  
Theriogenology Proc. Soc. Study, 160-165
- SCHEMBRI, M. A., D. A. MAJOR, J. J. SUTTIE, C. MAXWELL u. G. EVANS (2002):  
Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process.  
Reprod. Fertil. Dev. 14, 225-233
- SENGER, P. L., J. R. MITCHELL, u. J. O. ALMQUIST (1983):  
Influence of cooling rates and extenders upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in 0,25 and 0,5 ml French straws.  
J. Anim. Sci. 56, 1261-1268
- SETCHELL, B. P. (1977):  
Male reproductive organs and semen.  
in: H. H. COLE u. P. T. CUPPS (Hrsg.): Reproduction in domestic animals.  
Academic press, New York, S. 229-256
- SHEKARRIZ, M., D. M. DE WIRE, A. J. THOMAS u. A. AGARWAL (1995):  
A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species.  
Europ. Urol. 28, 31-35
- SIEGEL, I., A. B. DUDKIEWICZ, J. FRIBERG, M SUAREZ u. N. GLEICHER (1986):  
Inhibition of sperm motility and agglutination of sperm cells by free fatty acids in whole semen.  
Fertil Steril. 45, 273-278
- SIEME, H., R. PETZOLDT, S. KAPP, E. TÖPFER-PETERSEN u. E. KLUG (1998):  
Analyses to determine the minimum cellular water content under storage conditions in relation to preservation of stallion spermatozoa.  
Proc. 7<sup>th</sup> International Symposium on Equine Reproduction Pretoria July: 31-32
- SIMMANK, W. (1981):  
Kryophysikalische Untersuchungen zur Bullenspermatiefgefrierung.  
Berlin, Freie Univers., Fachber. Veterinärmed., Diss.
- SMITH, A. U., u. C. POLGE (1950):  
Survival of spermatozoa of low temperatures.  
Nature 166, 668-669  
Zit. Nach: MAZUR, P. (1980)



- SMITH, T. T., M. BYERS, D. KAFTANI u. W. WHITFORD (1997):  
The use of iodixanol as a density gradient material for separating human sperm from semen  
*Archives of Andrology* 38, 223-230
- SQUIRES, E. L., S. L. KEITH u. J. K. GRAHAM (2004):  
Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa.  
*Theriogenology* 62, 1056-1065
- SQUIRES, E. L., B. W. PICKETT, J. K. GRAHAM, D. K. VANDERWALL, P. M. MCCUE  
u. J. E. BRUEMMER (1999):  
Cooled and Frozen Stallion Semen.  
*Anim. Reprod. and Biotechnol. Lab. Bull. No. 9*, CSU, Fort Collins, CO, USA
- STEINBERNER, U., u. W. PREUSS (1987):  
Glyzerin- Ein fettchemischer Grundstoff im Wandel der Zeit.  
*Fat. Sci. Technol.* 89, 297-303
- STOLLA, R. (1984):  
Ursachen und Bedeutung der Teratozoospermie.  
Habilitationsschrift; Enke Verlag, Stuttgart
- SZUMOWSKI, M. P. (1954):  
Essais de congelation du sperme de cheval.  
*C. R. Acad. Agric. Fr.* 40, 156-161  
Ref. in: *Anim. Breed. Abstr.* 23 (1955), 124
- TISCHNER, M., K. KOSINIAK u. W. BIELANSKI (1974):  
Analysis of the pattern of ejaculation in stallions.  
*J. Reprod. Fert.* 41, 329-335
- TISCHNER, M. (1979):  
Evaluation of deep-frozen semen in stallions.  
*J. Reprod. Fertil., Suppl.* 27, 53-59
- THOMASSEN, R. (1993):  
Insemination with stallion semen frozen in 0,5 ml straws.  
*Reprod. Dom. Anim.* 28, 289-293
- THOMPSON, D. L., B. W. PICKETT, E. L. SQUIRES u. T. M. NETT (1980):  
Sexual behaviours, seminal pH and accessory sex gland weights in geldings administered  
testosterone and (or) estradiol-17beta.  
*J. Anim. Sci.* 51, 1358-1366
- VARNER, D. D., T. L. BLANCHARD, C. L. LOVE, M. C. GARCIA u. R. M. KENNEY (1987):  
Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters.  
*Theriogenology* 28, 709-723

VIDAMENT, M., A.M. DUPERE, P. JULIENNE, P. EVAIN, P. NOUE u. E.PALMER (1997):  
Equine frozen semen freezability and fertility fields results.  
*Theriogenologie* 48, 907-917

VIDAMENT, M., P. ECOT, P. NOUE, C. BOURGEOIS, M. MAGISTRINI u. E. PALMER  
(2000):  
Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility  
and fertility of stallion spermatozoa.  
*Theriogenology* 54, 907-919

VIDAMENT, M. (2005):  
French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen.  
*Anim. Reprod. Sci.* 89, 115-136

VOLKMANN, D. H. (1987):  
Acrosomal damage and progressive motility of stallion semen frozen by two methods in 0.5-ml  
straws.  
*Theriogenology* 27, Nr. 4, 689-698

VOLKMANN, D. H. u. D. VAN ZYL (1987):  
Fertility of stallion semen frozen in 0,5ml straws.  
*J. Reprod. Fertil. Suppl.* 35, 143-148

WALTER, K. (1992):  
Einfluss verschiedener Verfahren zur Spermatozoenselektion auf Motilität, Vitalität und  
Morphologie von Hengstspemien sowie deren diagnostische Bedeutung.  
Hannover, Tiertärztl. Hochsch., Diss.

WARNKE, C., S. BLOTTNER, W. KANITZ, A. TUCHSCHERER und H. TORNER (2000):  
Different types of movement pattern and velocities of stallion spermatozoa depending on donor,  
season and cryopreservation.  
4<sup>th</sup> Annual Conference of the ESDAR, Prag

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

WATSON, P. F. u. A. E. DUNCAN (1988):  
Effects of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram  
spermatozoaon.  
*Cryobiology* 25, 131-142

WATSON, P. F., J. M. PLUMMER u. W. E. ALLEN (1987):  
Quantitative assessment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions.  
*J. Reprod. Fertil.*, 35, 651-653

WATSON, P. F., u. J. M. PLUMMER (1985):

The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling.

in: 1th Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Spermatozoa, Uppsala 1985, Bericht, 113-127

WATSON, P. F. (2000):

The cause of the reduced fertility with cryopreserved semen.

Anima. Report. Sci., 60-61, 481-492

WEISS, S. (2004):

Einfluss der Zentrifugationsmethode auf Qualität und Kryokonservierung von Hengstsamen.

Zürich, Universität Zürich, Diss.

WEITZE, K. F. (1977):

Gefrierschädigung und Gefrierschutz im Rahmen der Tiefgefrierkonservierung lebenden Materials unter besonderer Berücksichtigung der Säugetiersamenzelle.

Übersichtsreferat. Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 84, 402-406, 441-446, 481-484

WEITZE, K. F., D. RATH u. G. BARON (1987):

Neue Aspekte der Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma in Plastikrohren.

Dtsch. tierärztl. Wochenschrift 94, 441-496

WEITZE, K. F. (2001):

Spermatologische Untersuchung.

In: BUSCH, W. und A. Holzmann: Veterinärmedizinische Andrologie.

Schattauer GmbH, Stuttgart, 87-118

WESTENDORF, P., L. RICHTER u. H. TREU (1975):

Zur Tiefgefrierung von Ebersperma: Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten-Verfahren.

Dtsch. tierärztl. Wochenschr. 82, 261-267

WHITE, I. G., u. R. G. WALES (1960):

Susceptibility of spermatozoa to cold shock.

Int. Fert. 5, 195-201

WILMUT, I., u. C. POLGE (1974)

The fertilizing capacity of boar semen stored in the presence of glycerol at 20, 5 and -79°C.

J. Reprod. Fertil. 38, 105-113

WÖCKENER, A., L. MALMGREN, B. Op den KAMP, M. BOYLE, H. BADER u. B.

COLENBRANDER (1992):

Freezing of stallion semen effects on sperm motility and morphologie.

In: 12th Int. Congr. on Anim. Reprod. and A. I., Den Haag, Vol. 4, 1933-1935

ZMURIN, L. (1961):

Razbaviteli spermy zerebca zamorazivaemoi pro temperature minus 20°C  
(Diluents for stallion semen frozen to -20°C).

Trud. Vsesojuz nauc.-issled. inst. konevod., 1960, 23, 95-105

Ref. in: Anim. Breed. Abstr. 30 (1962), 157

## 9. Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Versuchsreihe I: Zentrifugation .....	45
Abb.2: Versuchsreihe II: Zentrifugation und Lagerungsdauer .....	46
Abb. 3: Versuchsreihe III: Abkühlungsgeschwindigkeit.....	47
Abb. 4: Versuchsreihe IV: Samenzellkonzentration.....	48

## 9.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> <i>Einstellung der Parameter für die Motilitätsanalyse</i> .....	55
<b>Tabelle 2:</b> <i>Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Rückgewinnungsrate (n=14; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> .....	61
<b>Tabelle 3:</b> <i>Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Rückgewinnungsrate bei Hengsten mit guter und schlechter Tiefgefriereignung (n=7; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> .....	62
<b>Tabelle 4:</b> <i>Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Motilitätsparameter von Frischsamen bei der gesamten Hengstgruppe (n=14; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> .....	63
<b>Tabelle 5:</b> <i>Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die durchflusszytometrischen Messungen von Frischsamen (n=14; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> .....	64
<b>Tabelle 6:</b> <i>Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Motilitätsparameter von Frischsperma bei Hengsten mit guter (n=7) und schlechter Tiefgefriereignung (n=7; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> .....	65
<b>Tabelle 7:</b> <i>Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die durchflusszytometrischen Messungen von Frischsperma bei Hengsten mit guter (n=7) und schlechter Tiefgefriereignung (n=7; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> .....	67
<b>Tabelle 8:</b> <i>Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersamen bei der gesamten Hengstgruppe nach dem Auftauen (n=14; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> ..	68
<b>Tabelle 9:</b> <i>Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die durchflusszytometrischen Messungen von Tiefgefriersamen in der gesamten Hengstgruppe nach dem Auftauen (n=14; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> .....	69
<b>Tabelle 10:</b> <i>Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Morphologie von Nativsamen und Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe (n=14; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> .....	70
<b>Tabelle 11:</b> <i>Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersperma bei Hengsten mit guter (n=7) und schlechter Tiefgefriereignung nach dem Auftauen (n=7; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> .....	71
<b>Tabelle 12:</b> <i>Einfluss der Zentrifugationsmethoden auf die durchflusszytometrischen Messungen von Tiefgefriersperma bei Hengsten mit guter (n=7) und schlechter Tiefgefriereignung nach dem Auftauen (n=7; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> .....	72
<b>Tabelle 13:</b> <i>Auswirkungen der Zentrifugationsmethoden auf die Morphologie von Nativsamen und von Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter (n=7) und schlechter Tiefgefriereignung (n=7; 3 Ejakulate pro Hengst)</i> .....	73

<b>Tabelle 14:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Rückgewinnungsrate (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst).....	75
<b>Tabelle 15:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Rückgewinnungsrate bei Hengsten mit guter (n=6) und schlechter Tiefgefriereignung (n=6; 3 Ejakulate pro Hengst).....	75
<b>Tabelle 16:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Motilitätsparameter bei Frischsperma bei der gesamten Hengstgruppe (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst).....	77
<b>Tabelle 17:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die durchflusszytometrischen Messungen bei Frischsperma bei der gesamten Hengstgruppe (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst).....	78
<b>Tabelle 18:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Motilitätsparameter von Frischsperma bei Hengsten mit guter (n=6) und schlechter Tiefgefriereignung (n=6; 3 Ejakulate pro Hengst).....	79
<b>Tabelle 19:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die durchflusszytometrischen Messungen von Frischsperma bei Hengsten mit guter (n=6) und schlechter Tiefgefriereignung (n=6; 3 Ejakulate pro Hengst).....	80
<b>Tabelle 20:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst) ..	82
<b>Tabelle 21:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die durchflusszytometrischen Messungen von Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst) ..	83
<b>Tabelle 22:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Morphologie von Nativsamen und Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst) ..	84
<b>Tabelle 23:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter (n=6) und schlechter Tiefgefriereignung (n=6; 3 Ejakulate pro Hengst).....	85
<b>Tabelle 24:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter (n=6) und schlechter Tiefgefriereignung (n=6; 3 Ejakulate pro Hengst).....	86
<b>Tabelle 25:</b> Einfluss der Kissenzentrifugation auf die Morphologie von Nativ- und Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter (n=6) und schlechter Tiefgefriereignung (n=6; 3 Ejakulate pro Hengst).....	87
<b>Tabelle 26:</b> Einfluss der Lagerungsdauer vor der Tiefgefrierung von 24 Std. im Vergleich zum Standardverfahren (2,5 Std.) auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersamen nach dem Auftauen (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst).....	88

<b>Tabelle 27:</b> : Einfluss der Lagerungsdauer vor der Tiefgefrierung von 24 Std. im Vergleich zum Standardverfahren (2,5 Std.) auf die durchflusszytometrischen Messparameter von Tiefgefriersamen nach dem Auftauen (n=12; 3 Ejakulate pro Hengst).....	89
<b>Tabelle 28:</b> Einfluss der Abkühlungsgeschwindigkeit auf die Motilitätsparameter bei Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe (n=8) und bei Hengsten mit guter (n=4) und schlechter Haltbarkeit (n=4) bei gekühlter Lagerung (3 Ejakulate pro Hengst).....	91
<b>Tabelle 29:</b> Einfluss der Abkühlungsgeschwindigkeit auf die durchflusszytometrischen Untersuchungen bei Tiefgefriersamen nach dem Auftauen bei der gesamten Hengstgruppe (n=8) und bei Hengsten mit guter (n=4) und schlechter Haltbarkeit (n=4) bei gekühlter Lagerung (3 Ejakulate pro Hengst).....	92
<b>Tabelle 30:</b> Einfluss unterschiedlicher Samenkonzentrationen auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen (n=8; 3 Ejakulate pro Hengst).....	93
<b>Tabelle 31:</b> Einfluss unterschiedlicher Samenkonzentrationen auf die durchflusszytometrischen Untersuchungen von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen (n=8; 3 Ejakulate pro Hengst).....	94
<b>Tabelle 32:</b> Einfluss der Samenkonzentration auf die Motilitätsparameter von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter (n=4) und schlechter Tiefgefriereignung (n=4; 3 Ejakulate pro Hengst).....	95
<b>Tabelle 33:</b> Einfluss der Samenkonzentration auf die durchflusszytometrischen Untersuchungen von Tiefgefriersperma nach dem Auftauen bei Hengsten mit guter (n=4) und schlechter Tiefgefriereignung (n=4; 3 Ejakulate pro Hengst).....	96
<b>Tabelle 34 :</b> Auswertungsschema zur Erfassung der morphologischen Veränderungen .....	140



### 9.3 Zusammensetzung der Verdünner

#### Zusammensetzung des INRA 82-Verdünners:

25 g Glukose  
1,5 g Laktose  
1,5 g Raffinose  
0,4 g Kalium-Zitrat  
0,3 g Tri-Natrium-Zitrat-Dihydrat  
4,76g HEPES  
0,5 g Penicillin  
0,5 g Gentamicin  
Ad 0,5 l Aqua bidest.

Ad 1000ml Magermilch (0,3%)

#### Zusammensetzung des Tiefgefrierverdünners:

...  
INRA 82-Verdünner  
+ 2% Eidotter (geklärt)  
+ 2,5% Glyzerin (Endkonzentration)

**Zusammensetzung des Tyrode-Mediums:**

0,5844 g	NaCl
0,0231 g	KCl
0,0294 g	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
0,0081 g	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O
0,0047 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,2100 g	NaHCO <sub>3</sub>
0,2421 g	Na-Laktat
0,0110 g	Na-Pyruvat
0,2383 g	HEPES
0,0050 g	Gentamicin

ad 100,0 ml Aqua bidest.

**9.4 Geräteeinstellung Durchflusszytometer**

**Spezielle Geräteeinstellungen bei der Bestimmung des MPP und des akrosomalen Status im Flowzytometer (FACScan II):**

Parameter	Detektor	Spannung	Amplituden- zunahme	Modus
P 1	FSC	E-1	1,00	logarithmisch
P 2	SSC	234	1,00	logarithmisch
P 3	FL 1	400	4,92	logarithmisch
P 4	FL 2	491	4,92	logarithmisch
P 5	FL 3	450	4,92	logarithmisch

Schwellenwert: FSC bei 350

**Spezielle Geräteeinstellung bei der Beurteilung der Spermienchromatinstruktur im Flowzytometer (FACScan II):**

Parameter	Detektor	Spannung	Amplituden- zunahme	Modus
P 1	FSC	E-1	1,00	logarithmisch
P 2	SSC	234	1,00	logarithmisch
P 3	FL 1	variabel ca. 440	2,63	linear
P 4	FL 3	variabel ca. 600	1,00	linear

Schwellenwert: FL 1 bei 60

Die Einstellungen der Spannung für die Detektoren FL 1 und FL 3 wurden entsprechend der gemessenen Referenzprobe zu Beginn jeder Messreihe eingestellt und nach jeder zehnten Probe überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die benötigten Referenzproben wurden alle aus ein und demselben Ejakulat eines Hengstes gewonnen. Bei der Messung der Referenzprobe wurden die Spannungswerte so eingestellt, dass die Mittelwerte für FL 1 500 und FL 3 130 betrug.

## 9.5 Auswertungsschema Morphologie

*Tabelle 34 : Auswertungsschema zur Erfassung der morphologischen Veränderungen*

<b>Veränderungen</b>	<b>Genauere Differenzierung</b>
I. Kopfkappenveränderungen	Abgelöst, in Ablösung, deformiert, schief zu klein, rauh, persistierendes Akrosom
II. Kopfveränderungen	Kolbenform, Lanzenform, Spatenform, rund, verjüngt, schmal, eingeschnürt, Zwergkopf, Riesenkopf, deformiert
III. Halsveränderungen	Halsbruch, paraxialer Schwanzansatz, retroaxialer Schwanzansatz, persistierender Plasmotropfen
IV. Verbindungsstückveränderungen	gebrochen, doppelt, fibrillär, axial, deformiert, persistierender Plasmotropfen
V. Haupt- und Endstückveränderungen	Persistierender Plasmotropfen, Schleifenform, aufgerollt, um den Kopf gerollt, abgeknickt, rudimentär
VI. Doppel- und Mehrfachbildungen	Mehrfachmissbildungen (Kopf/ Schwanz)
VII. gesamt	

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Rath sehr für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Förderung und Unterstützung dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Harald Sieme für die geduldige und unermüdliche Unterstützung bei der Klärung praktischer und theoretischer Probleme.

Bei Herrn Landstallmeister Dr. B. Bade und allen Mitarbeitern des Niedersächsischen Landgestüts Celle, besonders denen der Stationen Aurich, Oberndorf und Celle bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme am Gestüt und die gute Zusammenarbeit.

Holger Mühlhan danke ich für seine Unterstützung bei Fragen zur Statistik. Auch Andrea gilt mein Dank für bereitwillige Hilfe zu jeder Zeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Celler Doktoranden, besonders bei Charlotte und Steffi für die seelische Aufmunterung, aber vor allem bei Nicole für die gemeinsamen langen Nächte im Labor.

Ganz besonders herzlicher Dank gilt meiner Familie und allen Freunden, auf deren moralische Unterstützung ich jederzeit zählen konnte.