

**Aus der Klinik für Pferde
der Tierärztlichen Hochschule Hannover**

**Fertilitätsrelevante spermatologische Parameter bei Hengsten unter
Berücksichtigung der sexuellen Inanspruchnahme und saisonaler Aspekte**

INAUGURAL – DISSERTATION

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
(Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Vorgelegt von
Arndt- Friedrich Echte
aus Königsförde**

Hannover 2001

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. Dr. E. Klug

1. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. Dr. E. Klug
2. Gutachter: Univ.- Prof. Dr. A.- R. Günzel- Apel

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 11. 2001

Meinen Eltern und Freunden

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	9
2. LITERATUR.....	10
2.1. UNTERSUCHUNGSGÄNGE ZUR ZUCHTTAUGLICHKEIT VON HENGSTEN.....	10
2.2 KLINISCHE UNTERSUCHUNG	10
2.2.1 KLINISCH- GENITALFUNKTIONELLE UNTERSUCHUNG.....	12
2.2.1.1 <i>Sexualverhalten</i>	12
2.2.1.2 <i>Methoden der Samenentnahme</i>	14
2.2.2 KLINISCH ASSOZIIERTE TECHNIKEN	16
2.2.2.1 <i>Mikrobiologische Untersuchung</i>	16
2.2.2.2 <i>Spermatologie</i>	17
2.2.2.2.1 <i>Motilität</i>	18
2.2.2.2.2 <i>Morphologie</i>	19
2.2.2.2.3 <i>Spermien- Funktionsprüfung</i>	21
2.2.2.2.4 <i>Seminalplasma</i>	24
2.2.2.2.5 <i>Spermatologische Mindestanforderungen</i>	25
2.2.2.2.6 <i>Beziehung andrologischer Parameter zur Fertilität</i>	26
3.1 MATERIAL UND METHODEN	28
3.1.1 UNTERSUCHUNGSKONZEPTION	28
3.1.2 SAMENSPENDER.....	29
3.1.3 GEWINNUNG UND AUFBEREITUNG DER EJAKULATE.....	29
3.1.4 FERTILITÄTSDATEN	30
3.1.5 TEIL I: RETROSPEKTIVE ANALYSE SPERMATOLOGISCHER DATEN WÄHREND DER ZUCHTSAISON.....	30
3.1.5.1 <i>Einfluß des Alters auf die Fertilität</i>	31
3.1.5.2 <i>Einfluß der Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten auf die Fertilität</i>	31
3.1.5.3 <i>Beziehung der biologischen Ejakulatparameter zur Fertilität</i>	31
3.1.5.4 <i>Korrelation der Ejakulatparameter untereinander</i>	32
3.1.5.5 <i>Intra- und interindividuelle Schwankungen der Ejakulatparameter</i>	32
3.1.5.6 <i>Einfluß des Sexualverhaltens auf die quantitativen und qualitativen Samenparameter</i>	32
3.1.5.7 <i>Einfluß der Samenentnahmefrequenz und des Samenentnahmeintervalles auf die Fertilität</i>	32
3.1.6 TEIL II: EXPERIMENTELLER TEIL	
SPERMABILOGISCHE FUNKTIONSPRÜFUNG BEI HENGSTEN UNTER	
BERÜCKSICHTIGUNG SAISONALER EFFEKTE UND DER FERTILITÄT	34
3.1.6.1 <i>Spermienmotilität</i>	34
3.1.6.1.1 <i>Computervideomikrographische Motilitätsanalyse</i>	34
3.1.6.1.2 <i>Vitalitätsprüfung</i>	34
3.1.6.2 <i>Spermienfunktionsprüfung</i>	35
3.1.6.2.1 <i>Carboxyfluoreszeindiazetat- Propidiumiodid Färbung (CFDA-PI)</i>	35
3.1.6.2.2 <i>Hypoosmotischer Schwelltest (HOST)</i>	36
3.1.6.2.3 <i>Fluorescein Isothiocyanat- PSA/ Propidiumiodid- Färbung</i>	39
3.1.6.2.4 <i>Induktion und mikroskopische Beurteilung der Akrosomenreaktion</i>	40
3.1.6.3 STATISTISCHE METHODEN ZUR AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE	42
3.2 ERGEBNISSE	43
3.2.1 TEIL I: RETROSPEKTIVE BETRACHTUNG SPERMATOLOGISCHER DATEN WÄHREND DER ZUCHTSAISON.....	43
3.2.1.1 <i>Einfluß des Alters auf die Fertilität</i>	43
3.2.1.2 <i>Einfluß der Anzahl der dem Hengst zugeführten Stuten auf die Fertilität</i>	44
3.2.1.3 <i>Beziehung der Ejakulatparameter zur Befruchtungs- und Abfohrate</i>	45
3.2.1.4 <i>Korrelationen der Ejakulatparameter untereinander</i>	46
3.2.1.5 <i>Intra- und interindividuelle Schwankungen der Ejakulatparameter</i>	46
3.2.1.6 <i>Einfluß des Sexualverhaltens auf quantitative und qualitative Ejakulatparameter</i>	49
3.2.1.7 <i>Einfluß der Samenentnahmefrequenz und des Samenentnahmeintervalles auf die Fertilität</i>	53

3.2.2 TEIL II: (EXPERIMENTELLER TEIL)	
SPERMABIOLOGISCHE FUNKTIONSPRÜFUNG BEI HENGSTEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG SAISONALER EFFEKTE UND DER FERTILITÄT	55
3.2.2.1 <i>Einfluß des Alters und der Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten auf die Fertilität</i>	55
3.2.2.2 <i>Quantitative Ejakulatparameter unter Berücksichtigung der Jahreszeit</i>	56
3.2.2.3 <i>Unterschiede in der Vorwärtsmotilität unter Berücksichtigung der Jahreszeit</i>	57
3.2.2.4 <i>Integrität der Plasmamembran unter Berücksichtigung der Jahreszeit</i>	58
3.2.2.5 <i>Volumenregulationsfähigkeit der Spermien im hypoosmotischen Schwellungstest (HOST) unter Berücksichtigung der Jahreszeit</i>	59
3.2.2.6 <i>Integrität der akrosomalen Membranen unter Berücksichtigung der Jahreszeit</i>	62
3.2.2.7 <i>Auslösbarkeit der Akrosomenreaktion unter Berücksichtigung der Jahreszeit</i>	63
3.2.2.8 <i>Korrelation der Laboruntersuchungsergebnisse</i>	65
3.2.2.9 <i>Korrelation der Laboruntersuchungsergebnisse mit der Fertilität</i>	69
4. DISKUSSION	71
5. ZUSAMMENFASSUNG	81
6. SUMMARY	83
7. LITERATURVERZEICHNIS	85

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	= Abbildung
ATP	= Adenosintriphosphat
bzw.	= beziehungsweise
ca.	= cirka
CASA	=Computer Assisted Spermatological Analysis
CASY	= Cell Analyser System
CFDA	= Carboxyfluoreszeindiacetat
cm	= Zentimeter
CRISP 1- 3	= Cystein Rich Secretory Protein 1- 3
d	= Tage
d.h.	= das heißt
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
DMSO	= Dimethylsulfoxid
eCG	= equines Choriongonadotropin
EHV I- IV	= equines Herpes Virus I- IV
et al.	= und andere
EVA	= equine Virusarteriitis
FITC	= Fluoreszein Isothiocyanat
fl	= Fentoliter
FSH	= Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	= Gonadotropin Releasinghormon
GSZ	= Gesamtspermienzahl
h	= Stunde
hCG	= humanes Choriongonadotropin
HOST	= Hypoosmotischer Schwelltest
HSP 1- 2	= Horse Seminal Protein 1- 2
HZA	= Hemizona Assay
kg	= Kilogramm
LH	= Luteinisierungshormon
MHz	= Megahertz
Mio	= Million
ml	= Milliliter
mm	= Millimeter
mM	= Millimolar
mOsmol	= Milliosmol
Mrd	= Milliarden
n	= Anzahl
nm	= Nanometer
p	= Irrtumswahrscheinlichkeit
PI	= Propidiumiodid
PNA	= Arachis hypodaea
PSA	= Pisum sativum
r	= Korrelationskoeffizient
RNA	= Ribonukleinsäure
SCSA	= Sperm Chromatin Structure Assay
TG	= Tiefgefrierung

V 0, V- motile	= Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen nach Samengewinnung
V 24, V24- motile	= Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen nach 24 Stunden bei Lagerung bei +5°C
z.B.	= zum Beispiel
z.T.	= zum Teil
g/l	= Gramm pro Milliliter
± SD	= Standardabweichung
μl	= Mikroliter
\bar{X}	= Mittelwert

Einleitung

Ein wesentlicher Teil der Fertilitätsbeurteilung von Vartieren ist die biologische Ejakulatuntersuchung. Durch die Erhebung spermatologischer Befunde sollen Aussagen über die Befruchtungsfähigkeit der untersuchten Spermienpopulationen getroffen werden. Korrelative Zusammenhänge von Sameneigenschaften und Befruchtungsergebnissen sind jedoch durch widersprüchliche Aussagen gekennzeichnet (JASKO et al. 1990).

Die Ejakulatanalyse auf der Grundlage konventioneller Untersuchungsverfahren ermöglicht es zwar, extrem schlechte Ejakulate auszusondern und somit drastische Fertilitätseinbußen zu verhindern, für eine exakte Definition des Fertilitätsstatus eines Hengstes ist die Erfassung der Standardparameter jedoch nicht ausreichend. Trotz normaler Ejakulatmerkmale zeigen manche Tiere eine eingeschränkte Fruchtbarkeit *in vivo*. In solchen Fällen idiopathischer Sub- oder Infertilität kommen häufig funktionelle Störungen der Samenzellen zum Tragen. In vergangener Zeit sind aus diesem Grund immer mehr Testverfahren, welche die Spermienfunktion erfassen, entwickelt worden, um ergänzende Resultate zur Beurteilung der Fertilisierungsfähigkeit eines Hengstes zu liefern. Im Teil I der vorliegenden Arbeit werden die in den Samenuntersuchungsprotokollen einer Zuchtsaison des Landgestütes in Celle erhobenen spermabiologischen Parameter (Volumen, Dichte, Gesamtspermienzahl, Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien direkt nach Samenentnahme und nach 24 Stunden) dahingehend überprüft, ob diese mit der Fertilität der Hengste in Zusammenhang stehen, ob sie sich gegenseitig beeinflussen und welchen Streuungen sie innerhalb der Individuen und während der Saison unterliegen. Des weiteren wird untersucht, inwieweit sich das Sexualverhalten, die sexuelle Inanspruchnahme, das Alter und die Zahl der den Hengsten zugeführten Stuten auf die Fruchtbarkeitsleistung der Hengste auswirkt. Im Teil II dieser Arbeit werden an drei verschiedenen Zeitpunkten im Jahr neben den routinemäßig erfaßten Samenparametern die Spermienmotilität und deren Haltbarkeit, die Intaktheit der Membranen, das Schwellvermögen der Samenzellen unter hypoosmotischer Belastung sowie die Auslösbarkeit der Akrosomreaktion der Spermien *in vitro* an einer genügend großen Stichprobe an Hengsten an jeweils ein und demselben Ejakulat einander gegenübergestellt und deren Beziehung zu den Fertilitätsergebnissen der Hengste ermittelt.

2. Literatur

2.1 Untersuchungsgänge zur Feststellung der Zuchttauglichkeit von Hengsten

Die Fertilität des Hengstes ist ein wichtiger Faktor für den Erfolg des Zuchtbetriebes, da eine gute Samenqualität die Voraussetzung für eine befriedigende Durchführung der künstlichen Besamung ist. Daher ist es von großer Wichtigkeit, die Reproduktionsfähigkeit eines Hengstes vor der ersten und jeder weiteren Zuchtsaison zu bestimmen. Hierbei werden die Hengste bezüglich der externen Genitalorgane (Präputium, Penis, Hoden, Nebenhoden, akzessorische Geschlechtsdrüsen) und der Samenqualität überprüft. Die andrologische Untersuchung der Hengste sollte nach einem bestimmten Schema (Abb.1) ablaufen, damit die Untersuchung vollständig und objektiv durchgeführt wird und jeder Hengst nach identischen Maßstäben bewertet werden kann. Dabei können jedoch auch Einzelaspekte des Untersuchungsganges intensiviert werden, sofern der Vorbericht des Hengstes oder Ergebnisse der Untersuchung dazu Anlaß geben.

Es werden auch von anderen Autoren Untersuchungsgänge beschrieben, die sich aber nicht wesentlich von dem in Abbildung 1 dargestellten unterscheiden (DOWSETT 1987; MERKT u. KLUG 1989; PICKETT 1993; AURICH et al. 1995; PARLEVLIT 1999).

2.2 Klinische Untersuchung

Obwohl bei der Zuchttauglichkeitsuntersuchung die Geschlechtsgesundheit eines Hengstes im Vordergrund stehen sollte, kann auf eine Allgemeinuntersuchung des Tieres nicht verzichtet werden. So ist zum einen auf den äußeren Gesamteindruck des Hengstes zu achten, gefolgt von der Beurteilung seines Exterieurs. Vor allem auf Anzeichen von Erkrankungen, die das Paarungsverhalten beeinflussen können, muß verstärkt geachtet werden. Hierbei sind grundsätzlich temporäre Störungen (z.B. Hinterhandlahmheit, Rückenerkrankungen) von potentiell erblichen Mängeln (z.B. Kryptorchismus, Dämpfigkeit, Kieferanomalien, spinale Ataxie) (MERKT u. KLUG 1989) zu unterscheiden.

Die Allgemeinuntersuchung eines Hengstes umfaßt folgende Punkte: Die Haltung, das Verhalten, den Habitus, den Ernährungs- und Pflegezustand, die Atemfrequenz und den Atemtyp, die Pulsfrequenz und -qualität, die rektal gemessene Körperinnentemperatur, die Adspektion der Konjunktiven, die Palpation der Mandibularlymphknoten und sonstige Auffälligkeiten bzw. Umfangsvermehrungen an Haarkleid und Haut.

1. Identifizierung2. Anamnese

Zuchalter, Zuchtnutzungsstatus (Maiden-, Deckhengst), letzter Einsatz in Paarung oder Samenübertragung; Besonderheiten im Paarungsverhalten, Befruchtungsleistung (Befruchtungshundertsatz, korrigierter Befruchtungshundertsatz, sonstige Berechnungsverfahren); Verbandsanerkennung.

3. Allgemeine Untersuchung

Extragenitale Gesundheit; Ausschluß zuchtnutzungsbeschränkender Mängel und/ oder Erkrankungen (Hauptmängel, Augenerkrankungen; Kiefer-, Gebiß-, Genitalanomalien).

4. Spezielle Untersuchung

Morphologische Untersuchung

-äußere Geschlechtsorgane: Penis, Vorhaut, Hodensack und Inhalt (Hoden, Nebenhoden, extrainguinale Anteile der Samenstränge, Bandsysteme)

-innere Geschlechtsorgane: Urethrabckenstück, akzessorische Geschlechtsdrüsen (Samenleiterampullen, Prostata, Samenblasen, Bulbourethraldrüsen)

Die Untersuchung erfolgt je nach Zugang durch Adspektion, Palpation, Sonographie, Testikulometrie, Urethroskopie.

Funktionelle Untersuchung

Libido sexualis (Erkennen des Sexualpartners Stute/ Phantom, Hindrängen, Flehmen, Ausschachten, Aufsprungintentionen, Erektion).

Paarungsreflexkette (Aufsprung, Umklammerung, Intromission, Friktionen, Ejakulation, Descensus, Beruhigung).

Die Befunderhebung erfolgt durch Beobachtung ggf. durch Bilddokumentation (Video) bei der Samentnahme oder beim Paarungsakt.

Samenbiologische Untersuchung

Spermogramm (Ejakulatvolumen, -farbe, -konsistenz, pH-Wert, Samenzellzahl pro ml und pro Ejakulat, Samenzellmotilität (vorwärts- und ortsbewegliche), Samenzellmorphologie; ggf. Eignung für Frisch- und Gefrierkonservierung).

Die Untersuchung erfolgt mit laborüblichen Methoden unter Unterstützung objektivierender Meßverfahren (z.B. Motion analyzer).

Mikrobiologische Untersuchung

Mikrobiologische Untersuchung von Genitalsekreten (Smegma, Vorsekret, Samen)

Endokrinologische Untersuchung

Bestimmung von FSH, LH, Testosteron, Östrogenen (Basiswerte) und nach Stimulation mit GnRH.

5. Diagnose

Umfaßt Gesundheit (allgemeine, klinische mikrobiologische, Genital-, Erb-), Potentia coeundi et generandi.

Abb. 1: Schematische Darstellung des andrologischen Untersuchungsganges nach KLUG (1999)

Am Ende der Allgemeinuntersuchung sollte der Untersuchende den allgemeinen Gesundheitszustand des Hengstes erfaßt haben und, sofern das Tier nicht gesund ist, den vermutlichen Sitz der Erkrankung bestimmen können.

Nach diesem Untersuchungsabschnitt schließen sich die verschiedenen speziellen und weitergehenden Untersuchungen der verschiedenen Körperregionen an (Respirationstrakt, Verdauungstrakt, Herz- Kreislauf- System, Nervensystem, Auge), und bei der Untersuchung auf Zuchttauglichkeit die klinisch andrologische Untersuchung eines Hengstes.

2.2.1 Klinisch- genitalfunktionelle Untersuchung

2.2.1.1 Sexualverhalten

Bei der Prüfung des Paarungsvermögens ist der Ausprägungsgrad der Libido und der Paarungsreflexkette zu beurteilen. Hierzu gehört, daß dem Hengst eine im Östrus befindliche Stute zugeführt wird, welche entweder im Natursprung gedeckt oder bei Samenentnahme mit einer künstlichen Vagina auf einem Phantom zur Stimulation des Hengstes anwesend ist.

Die Begattungspotenz (*Potentia coeundi*) ist gegeben, wenn der Hengst bei ausreichender Libido binnen 10 Minuten in der Lage ist, den vollständigen Paarungsakt mit Vorspiel (*excitatio*), Aufsprung (*ascensus*), Suchphase (*adiustatio*), Friktionsphase (*frictio*), Ejakulationsphase (*eiaculatio*), Absprung (*descensus*) und Nachspiel (*calmatio*) auszuführen (MERKT u. KLUG 1989).

Diese Zeitvorgaben sollen auch saisonalen Schwankungen unterliegen, da etwa im Spätherbst und im Winter eine signifikant herabgesetzte Libido sexualis bei Hengsten zu beobachten ist (PICKETT et al. 1970).

Die Ausprägung der Libido sexualis beinhaltet die Aufnahme verschiedener sensorischer Signale wie Geruch, Geräusche und bestimmte Verhaltensmuster der Stute, deren Verarbeitung im Zentralnervensystem erfolgt, und die Übertragung der Signale über efferente Nervenbahnen zu den Genitalorganen und anderen somatischen Steuerungsregionen. Ferner ist der Einfluß der Jahreszeit, des Alters, der sexuellen Erfahrung und des Umganges mit dem Tier bei der Vorbereitung zum Deckakt mitentscheidend. Gerade in der Anlernphase von jungen unerfahrenen Hengsten ist auf einen störungsfreien Ablauf bei den ersten Deckversuchen zu achten, damit der Hengst nicht durch schlechte Erfahrungen in seinem Paarungsverhalten geprägt wird (KLUG et al. 1999).

Für einen Junghengst ist es hilfreich, wenn er an Personen gewöhnt ist und Kommandos zum Stoppen, Stehen und zum Zurückgehen bereits vorher erlernt hat. So kann der Hengst diszipliniert an die Stute herangeführt und bei jeder Situation schonend kontrolliert werden. Andererseits kann ein Negativerlebnis schon frühzeitig zu einer Störung im Sexualverhalten führen (MC DONNELL 2000a).

Untersuchungen bei freilebenden und im Sozialverband auf der Koppel gehaltenen Pferden ergaben, daß der ständige, über das ganze Jahr erfolgende Kontakt zwischen Hengst und Stuten positiv mit der Libido korreliert (MC DONNELL 2000b). Im frühen Östrus gehen fast alle Interaktionen zwischen Hengst und Stute von der Stute aus, und erst gegen Ende des Östrus nimmt die Kontaktaufnahme seitens des Hengstes zu.

Hierbei wird dem Kopf-zu-Kopf- Kontakt, Ausweich- und Abwehrbewegungen, Ausschlagen oder den wiegenden Bewegungen der Stute ein nicht geringer Einfluß auf die Geschlechtslust des Hengstes zugeschrieben. 88 % der Kontakte zwischen Hengst und Stute, die zu einer erfolgreichen Bedeckung führen, gehen von der Stute aus (MC DONNELL 2000b)

In den heutigen Hengsthaltungen ist ein Kontakt zu Stuten nicht erwünscht, da im Zuge einer rasch wechselnden Stutenzahl während der Decksaison die Zuchthygiene nicht eingehalten werden könnte. Ferner ist durch die Etablierung der künstlichen Besamung die räumliche Trennung von Hengst und Stute möglich geworden, so daß die sexuelle Beeinflussung der Hengste durch anwesende Stuten weitestgehend unterbunden wird. Lediglich bei der Samenentnahme ist eine rossende Stute anwesend, jede Art der Interaktion wird aber weitestgehend durch die Hengstführer und durch die Isolation der Stute im Zwangsstand oder durch Ausbinden unterbunden.

MC DONNELL und MURRAY (1995) fanden heraus, daß ein Zuwachs an Libido, Testosteronwerten, Hodengröße und Samenzellproduktion zu verzeichnen ist, wenn ein Hengst gemeinsam mit Stuten aufgestallt wird.

Die Tatsache, daß lange Zeit im Rennsport gegangene Hengste einen Mangel an Libido zeigen, liegt oftmals in der Verwendung von libidosuppressiven Maßnahmen begründet. So werden sogenannte Spontanerektionen, die nach MC DONNELL (2000 b) bei Hengsten etwa alle 90 Minuten für eine Dauer von ungefähr drei Minuten auftreten, mit sogenannten Penisringen unterbunden, indem diese auf Höhe des vorderen Umschlagrandes des Präputiums auf den Penis aufgezogen werden. Ein Ausschachten bleibt möglich, jedoch wird die Erektion durch Schmerz unterbunden (KLUG et al. 1999). Dieses führt zu einer funktionellen Traumatisierung der Reflexkette und bei längerer Anwendung zu einer Penisstrangulation. Bei einem solchen Verdacht muß versucht werden, das Paarungsverhalten des Hengstes vorsichtig zu trainieren und wiederholte Untersuchungen durchzuführen.

Eine hormonelle Beeinflussung des Sexualverhaltens von Hengsten ist sehr begrenzt. So wird zwar durch die Verabreichung von GnRH die Ausschüttung der nachgeschalteten Gonadotropine erhöht, jedoch ohne Effekt auf die testikuläre Hormonfreisetzung und die Libido (ROSER u. HUGHES 1991).

KLUG et al. (1999) berichten hingegen, daß die ein- bis dreimalige Applikation eines GnRH-Implantates pro Woche eine Steigerung der Libido beim Hengst bewirkt.

Störungen der Reflexkette betreffen die Erektion (bei Libidoschwäche, Schmerzzuständen, Reizleitungsstörungen) und das Ausbleiben der Ejakulation trotz vollständiger Erektion und

arttypischer Friktionsphase ohne klinisch manifeste Veränderungen (KLUG 1982). Hierbei ist neben der Penishypoplasie, der Phimose, der Paraphimose, der Pseudoparaphimose und neoplastischer Veränderungen am Penis die erektile spongiöse Dysfunktion des Hengstes zu nennen, der eine cavernomuskuläre Fehlregulation zu Grunde liegt. Intrazellulär liegt hierbei die Phosphodiesterase in höherer Konzentration als zyklisches Guaninmonophosphat bei niedrigem Stickoxidgehalt vor, was einen verminderten Calciumausstrom bewirkt; die kavernomuskulösen Zellen bleiben kontrahiert und somit bleibt der Penis schlaff. Dadurch wird kein venöses Blutreservoir im Eichel- und Urethraschwellkörper erzeugt, was dann auch die Ejakulation hemmt. Mit einer dem Hengst kurz vor der Immissio auf Höhe des externen Umschlagsrandes der Vorhaut um den Penis angelegten Manschette kann diese Erektionsstörung behoben werden (KLUG et al. 1999).

2.2.1.2 Methoden der Samenentnahme

Ziel eines guten Hengstmanagements muß die effiziente Gewinnung eines qualitativ hochwertigen Ejakulates sein, damit der Erfolg für die künstliche Besamung oder für die Tiefgefrierkonservierung gegeben ist. Die Samenentnahme ist somit ein wichtiger Punkt für die Zuchttauglichkeitsuntersuchung, da schon hierbei das Sperma Schaden nehmen kann und somit der Grund für eine Fehldiagnose im Hinblick auf die Befruchtungspotenz eines Hengstes sein kann (HURTGEN 2000). Zur Samengewinnung eignen sich vier verschiedene Entnahmetechniken: Die Benutzung eines Kondoms, eine pharmakologisch induzierte Entnahme, der Gebrauch einer künstlichen Vagina und die Masturbation des Hengstes.

Bei Verwendung eines Kondoms ist zu sagen, daß der Samen durch den direkten Kontakt zum Penischaft und die dadurch stattfindende mikrobielle Kontamination (*Pseudomonas*, *Klebsiella*, *E. coli*, *Taylorella equigenitalis*) in seiner Qualität negativ beeinflusst werden kann (HURTGEN 2000).

So gewonnenes Sperma führt bei Verwendung in der künstlichen Besamung zu einer Kontamination der Stute, welche der eines Natursprunges gleichkäme. Ferner lassen sich nicht alle Hengste ein Kondom anlegen und zeigen des öfteren Deckstörungen. Diese Methode bietet sich an bei Hengsten, die vom Natursprung zur manuellen Samenentnahme umgewöhnt werden müssen und eine künstliche Scheide nicht annehmen (HURTGEN 2000).

Eine pharmakologisch auslösbare Ejakulation ex copula bei Hengsten ist mit Xylazin, Imipramin, Kombinationen aus beiden oder mit Prostaglandin beschrieben (MC DONNELL et al. 1987; MC DONNELL 1992; MC DONNELL 2000 a).

Der mit dieser Methode gewonnene Samen zeichnet sich durch ein geringes Volumen und eine sehr hohe Dichte aus und kann für jede Form der Samenübertragung genutzt werden. Dem Hengst wird in einer ruhigen Umgebung das Pharmakon verabreicht und je nach verwendetem Medikament erfolgt eine Masturbation des Penis. Solch eine Samengewinnung ist bei Hengsten indiziert, die nicht mehr in der Lage sind, den Paarungsakt auf natürliche Weise auszuführen, beispielsweise nach Fraktur einer Gliedmaße (TURNER et al. 1995). Ein Nachteil ist der geringe Erfolg des Verfahrens. So fanden MC DONNELL und DIEHL (1994) bei ihren Versuchen an Ponies heraus, daß nur 10 von 24 Versuchen zur Ejakulation führten, was der Verwendung dieser Technik im praktischen Besamungseinsatz entgegen steht.

Die meistgebrauchte Methode stellt die Gewinnung des Samens mit einer künstlichen Scheide dar. Die verschiedenen Modelle (Hannover, Missouri, Colorado, Krakow) sind sich in ihrem funktionellen Aufbau gleich. Sie bestehen aus einem äußeren Mantel mit einem Gummi-Innenschlauch, zwischen denen sich 41- 43°C warmes Wasser befindet, und der sich nach hinten verjüngt. Zur Verbesserung der Hygiene wird ein weiterer Innenschlauch aus dünnem Kunststoff eingezogen, der mit Vaseline schlüpfrig gemacht wird, und dessen Ende in ein angeschraubtes Samenauffanggefäß mündet. Zur Abtrennung der Gel Fraktion ist dem Auffangglas ein Sterilfilter vorgeschaltet, in dem sich das Sekret der Samenblasendrüsen sammelt. Die Samenentnahme findet in der Regel auf einem Phantom unter Beisein einer rossenden Stute statt. Nach der Ejakulation ist die künstliche Vagina senkrecht abzusenken, damit der Samen aus dem Mantel in das Auffangglas läuft, um ein zu langes Ausgesetztsein des Spermas oberhalb der Körpertemperatur zu vermeiden.

Im Gegensatz hierzu ist die "Polnische Scheide" am Ende offen und erlaubt es, den Samen fraktioniert und frei von bakterieller Kontamination zu sammeln.

Bei der manuellen Samengewinnung wird der Penis des stehenden Hengstes mit warmem Wasser gewaschen. Der ausgeschachtete Penis wird durch manuelle Stimulation zur Erektion gebracht. Während die eine Hand des Samenabnehmers die Glans des Tieres stimuliert, übt die andere einen leichten Druck auf die Penisbasis und die Urethra aus. Der Samen wird in einem sterilen Gefäß aufgefangen (CRUMP u. CRUMP 1988; MC DONNELL u. LOVE 1990).

Nachteilig auf die Samenbeschaffenheit wirkt sich bei Verwendung einer künstlichen Vagina eine Temperatur von über 43°C im Wassermantel aus. Samenzellen, die einer großen Hitze ausgesetzt werden, zeigen eine vermehrte Kreisbewegung, haben eine reduzierte Lebensfähigkeit in Roh- und verdünntem Samen und verlieren bei mehr als 20 sekündigem Verweilen ihre

Befruchtungsfähigkeit (HURTGEN 2000). Ferner ist bei dem Gebrauch von Gleitcreme darauf zu achten, daß diese nicht spermizid ist. Nach der Entnahme ist der Samen unverzüglich zu untersuchen und zu verdünnen, wobei darauf zu achten ist, daß der Verdüner wie auch alles Untersuchungsgerät auf eine Temperatur von 37°C vorgewärmt ist, um einen Temperaturschock der Samenzellen zu vermeiden.

2.2.2 Klinisch assoziierte Techniken

2.2.2.1 Mikrobiologische Untersuchung

Der zuchthygienischen Überwachung und Betreuung der im Besamungseinsatz befindlichen oder dafür vorgesehenen Hengste gilt im Rahmen der Samenübertragung besondere Beachtung, zumal die künstliche Besamung als medizinisches Kontrollinstrument der beim Deckakt übertragbaren Krankheiten etabliert wurde. Dieses Ziel läßt sich aber nur verwirklichen, wenn ausschließlich Samen gesunder Hengste zum Einsatz kommt (KLUG u. SIEME 1999).

Krankheitserreger, die venerisch übertragen werden können und heute in Europa eine Rolle spielen, sind sowohl bakterieller als auch viraler Herkunft. Die durch das Protozoon *Trypanosoma equiperdum* hervorgerufene Beschälseuche kommt in unseren Breiten praktisch nicht mehr vor. Hengstsamen beinhaltet eine Vielzahl an verschiedenen Bakterienarten, welche durch den Kontakt zur Penisoberfläche von dieser in das Ejakulat gelangen (CLEMENT et al. 1995 b). Bedeutsame Bakterien, welche beim Hengst nachweisbar sind und bei der Stute zu Genitalaffektionen führen können, sind *Taylorella equigenitalis*, Streptokokken, Staphylokokken, Pseudomonaden, Proteus, Pasteurellen, Klebsiellen, *E. coli*, Corynebakterien und *Bazillus*-Subspezies. Diese Keime bilden beim Hengst lediglich eine periphere (äußere) und meist eine temporäre (vorübergehende) Genitalbesiedlung, welche beim Deckakt aufgenommen werden. Der Nachweis der Bakterienflora geschieht über Abstriche am Penisschaft, aus der Eichelgrube und der Harnröhre, kann aber auch aus den Genitalsekreten Smegma, Vorsekret und Samen erfolgen (KLUG et al. 1998). Für das Zuchtgeschehen bedenkliche Viren, die venerisch übertragen werden, sind das equine Herpesvirus III und das Virus der equinen Virusarteriitis (EVA). Die Übertragung des EHV-I und IV verläuft in der Regel aerogen. Die Übertragung über den Samen ist zwar möglich, jedoch hoch unwahrscheinlich (MAYR 1975). Der Virustyp III wird klassisch beim Deckakt übertragen und wird daher bei der nahezu flächendeckenden instrumentellen Samenübertragung kaum noch beobachtet.

Anders dagegen das Arteriitisvirus, welches beim Hengst die akzessorischen Geschlechtsdrüsen besiedelt und mit dem Samen ausgeschieden werden kann. Die Viruspersistenz ist von

Hengst zu Hengst unterschiedlich, so daß es eine Unterscheidung zwischen Nicht-, Kurzzeit- und Dauerausscheidern gibt. Der Nachweis EAV-positiver Hengste geschieht über eine Antikörperbestimmung im Serum oder mittels direkter Virusanzüchtung aus dem Sperma (KLUG u. SIEME 1999). Zuchthygienisch sollten ausschließlich Hengste als Samenspender fungieren, deren Genitalsekret kulturell unbedenklich ist. Ferner sollten alle möglichen Kontaminationsquellen des Samens nach der Entnahme so gering wie möglich gehalten werden. Durch Verwendung von antibiotikahaltigen Verdünnermedien und einer kontinuierlichen Kühlung kann das mikrobielle Wachstum im Ejakulat reduziert werden (CLEMENT et al. 1995 b). Ferner verbietet es sich, Hengste sowohl im Natursprung als auch in der Besamung zu verwenden, da eine über den Natursprung aus dem weiblichen Genitale erfolgende mikrobielle Kontamination des Hengstes in der Folge auch die für die Besamung genutzten Samenportionen verunreinigen würde (KLUG et al. 1998).

2.2.2.2 Spermatologie

Die Untersuchung des Ejakulates eines Hengstes stellt einen wichtigen und aussagekräftigen Teil der Zuchttauglichkeitsuntersuchung dar. Ziel eines solchen Verfahrens muß es sein, ein objektivierbares und vergleichbares Untersuchungsmuster zu entwerfen, so daß am Ende eine Aussage über die mögliche Befruchtungspotenz des Hengstes gefällt werden kann.

Makroskopisch wird das Ejakulat hinsichtlich der Farbe und auf etwaige Beimengungen untersucht. Eine rötliche Färbung deutet auf Blut, eine bräunliche auf Entzündungsprodukte, flockige Beimengungen auf Eiter und gelbliche Färbung auf Urin im Ejakulat hin. Routinemäßig wird bei einem Ejakulat das Volumen, der Schleimanteil aus den Samenblasendrüsen, die Spermienzahl pro ml, die Gesamtspermienzahl und der pH- Wert bestimmt. Der pH- Wert liegt im Hengstejakulat zwischen 6,8 und 7,4 und kann leicht mit einem pH- Papier bestimmt werden. Das Volumen wird um den Schleimanteil korrigiert, da sich das Samenblasensekret in vitro negativ auf die Haltbarkeit des Samens auswirkt. Die Dichte des Samens wird mittels einer Zählkammer, eines Photometers oder eines Zell Counters ermittelt. Die Gesamtspermienzahl ist in Hinblick auf das Spermienbildungsvermögen und den Spermienausstoß eines Hengstes ein wichtiges Kriterium und eng mit der Leistungsfähigkeit des Hodens korreliert (PICKETT 1993).

Um hieraus Rückschlüsse hinsichtlich der Fertilität eines Hengstes ziehen zu können, müssen von dem betreffenden Hengst mindestens zwei Ejakulate innerhalb einer Stunde entnommen (PICKETT et al. 1989) oder besser über fünf Tage in der Frequenz des zu erwartenden Zuchteinsatzes Samen gewonnen werden (PALMER u. FAUQUENOT 1984).

2.2.2.2.1 Motilität

Die Bewegungsaktivität der Samenzelle ist ihre eindeutigste Lebensäußerung, die zudem verhältnismäßig einfach festzustellen ist. Üblicherweise wird bei der mikroskopischen Untersuchung zwischen Vorwärtsbewegung und Ortsbewegung der Spermien unterschieden und deren prozentualer Anteil an der Gesamtbewegungsaktivität geschätzt. Hengstsamen weist als Besonderheit einen relativ hohen Anteil (20 bis 50 %) an Spermien mit Kreisbewegungen auf. Hierfür wird der paraxiale Schwanzansatz der Hengstspermien verantwortlich gemacht. Rohsamen eignet sich nicht zur Motilitätsanalyse, da die Samenzellen zur Agglutination untereinander neigen. Hengstsamen muß daher mit einem geeigneten Verdünnungsmedium aufgefüllt werden, bis eine Samenzellkonzentration von 25 bis 50 Millionen Spermien pro Milliliter erreicht ist (SIEME et al. 2001).

Die lichtmikroskopische Untersuchungsmethode wird mit einem Phasenkontrastmikroskop (Vergrößerung 150 bis 200-fach) mit beheizbarem Tisch (37°C) durchgeführt (SIEME et al. 2001), und ist ohne großen Aufwand in jeder Hengsthaltung vorzunehmen.

Da eine Schätzung immer der Subjektivität des Untersuchenden unterliegt, sind computergesteuerte videomikrographische Geräte entwickelt worden, die ein objektives und quantifizierbares Ergebnis über die Bewegungsaktivität lebender Samenzellen übermitteln (AMANN u. HAMMERSTEDT 1980). Computergestützte Samenanalysegeräte wie das Cell Soft System (Strömberg Mika, Montreux, Schweiz) oder der Hamilton Thorne Motility Analyzer (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA) wurden für eine objektive Beurteilung spezifischer Charakteristika der Samenmotilität entwickelt (SIEME et al. 2001). Ursprünglich für den humanen Gebrauch gedacht, hat sich das System Computer Assisted Spermatological Analysis (CASA) für den Einsatz bei der Untersuchung von Motilitätskriterien bei Hengstsamen bewährt (JASKO et al. 1988; BLACH et al. 1989). Diese Instrumente erlauben die Motilitätsanalyse mit einer größeren Vergleichbarkeit als die konservativen lichtmikroskopischen Schätzungen (MAGISTRINI 2000).

Die Korrelation der Motilität von Hengstspermien mit der Fruchtbarkeit erbrachte sehr unterschiedliche Ergebnisse. In einigen Studien hat der Prozentsatz vorwärtsmotiler Samenzellen

keinen Einfluß auf die Fertilität der Hengste (VOSS et al. 1981; DOWSETTE u. PATTIE 1982).

Dagegen wiesen SAMPER et al. (1991) eine positive Korrelation zwischen der Vorwärtsmotilität und der Fruchtbarkeit in Frischsamen nach. JASKO et al. (1992) fanden heraus, daß der mikroskopisch geschätzte Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien die höchste Korrelation zur Fruchtbarkeit von Hengsten gegenüber anderen Samencharakteristika aufweist.

Die aussagekräftigste Korrelation mit der Fruchtbarkeit von Hengsten besteht für den Prozentsatz der motilen Samenzellen in verdünnten, bei 4°C konstant gekühlten Halteproben nach 24 und 48 Stunden (CLEMENT et al. 1995 a; INSTITUT DU CHEVAL 1996).

Bei der Untersuchung von Hengstsamen mit dem CASA- System gibt es eine Korrelation der Geschwindigkeit der Spermien mit der Fruchtbarkeit, nicht aber mit der Geradlinigkeit vorwärtsmotiler Samenzellen (JASKO et al. 1988).

2.2.2.2 Morphologie

Spermienmorphologie ist ein wichtiger Parameter zur Einschätzung und Beurteilung der Samenqualität von Hengsten. Liegen hierbei Abweichungen von der Norm vor, so sind die Ursachen dafür in den Organen der Spermienbildung und -reifung zu suchen (MALMGREN 1997).

Zur Untersuchung der Morphologie von Samenzellen können ungefärbte, in gepuffertem Formolcitrat flüssigfixierte Samenproben oder mit verschiedenen Färbungen versehene Ausstriche verwendet werden. Für Hengstsamen sind die Spermac®- Färbung (OETTLE 1986) und die Eosin- Nigrosin- Färbung (DOTT u. FOSTER 1972) routinemäßig in Gebrauch. Des weiteren gibt es Färbungen nach WILLIAMS (1920), KARRAS (1950) und eine Eosin- Anilin- Blau- Färbung nach SCHAAF (1952), mit Hilfe derer sich die Gestalt der Spermien darstellen und beurteilen läßt.

Entscheidend ist der Anteil an normal gestalteten Samenzellen im Ejakulat. Bei der morphologischen Spermienbeurteilung kommen folgend aufgeführte Anomalien in Betracht: Abnormes Akrosom und Kopffehler, Halsfehler, Schäden am Mittelstück, Rollschwänze und Plasmatropfen am Spermienhals oder am Mittelstück (PARLEVLIET 1999). Diese Defekte lassen sich in zwei Gruppen einteilen, nämlich in "major und minor defects", wobei abnorme Köpfe, ein proximaler Plasmatropfen und abnorme Mittelstücke als major defects und abgelöste Kopfkappen, distale Plasmatropfen und Schwanzfehler als minor defects angesehen werden. Diese beiden nach Defekten geordneten Gruppen wurden in Anlehnung an die klassische Einteilung in primäre und sekundäre Spermiendefekte vorgenommen (JASKO et al. 1990).

Ferner geben die verschiedenen Färbungen Auskunft über die Membranzustände der Spermien. So sind z.B. bei der Eosin- Nigrosin- Färbung lebende Zellen ungefärbt, wohingegen sich Zellen mit Membrandefekten rot-violett darstellen.

Die Beziehung der Spermienmorphologie zur potentiellen Fruchtbarkeit eines Hengstes fällt in den einzelnen Studien verschieden aus.

VOSS et al. (1981) sowie DOWSETT und PATTIE (1982) belegen keine Beziehung zwischen spermatomorphologischen Aspekten und der Fertilität eines Hengstes, während BIELANSKI (1975), JASKO et al. (1990) und CLEMENT et al. (1991) herausfanden, daß es bei einem Anstieg der abnorm geformten und gestalteten Samenzellen zu einem Absinken der Fruchtbarkeit der betreffenden Hengste kommt. Die Übertragbarkeit dieser Studien ist vorsichtig zu beurteilen, da sie von der Hengstzahl in den Versuchen und von der Anzahl und der Vorgeschichte der bedeckten Stuten abhängig ist.

Die Morphometrie der Samenzellen wird mit Hilfe der Feulgen- oder Hämatoxilin- Färbung unter Verwendung computervideographischer Mikroskopie in Speziallaboratorien vorgenommen. Die Messungen berücksichtigen die Länge, die Breite, den Durchmesser und die Fläche der Spermienköpfe. Bei der Untersuchung der morphometrischen Daten der Ejakulate von 10 fertilen und 10 subfertilen Hengsten waren die aufgeführten Parameter signifikant größer bei der Gruppe der subfertilen Hengste (CASEY et al. 1997). Dagegen ergab eine mit Feulgen-Färbung an 11 Hengsten durchgeführte Untersuchung, daß lediglich ein Hengst eine signifikant kleinere durchschnittliche Fläche des Spermienkopfes aufwies und dieser in den letzten drei Zuchtsaisons eine Trächtigkeitsrate von jeweils 13% aufwies (MAGISTRINI et al. 1996).

Neuere Untersuchungen beziehen die DNA der Samenzellen mit ein. So wird bei dem sperm chromatin structure assay (SCSA) die Empfänglichkeit der Spermien DNA für eine saure Denaturierung untersucht. Als Farbstoff kommt Akridin Orange in Frage, welches nach Aufnahme in die Zelle eine rote Fluoreszenz emittiert, sofern er an denaturierter DNA oder Einzelstrang DNA gebunden hat. Hat der Farbstoff hingegen an doppelsträngiger DNA gebunden, zeigt er eine grüne Fluoreszenz. Die Untersuchung des Grades der Denaturierung wird mit Hilfe der Flow Cytometrie durchgeführt (EVENSON et al. 1994).

KENNEY et al. (1995) fanden in einem Versuch mit 106 Hengsten heraus, daß hohe Denaturierungswerte der Spermatozoen DNA negativ mit der Trächtigkeitsrate, der Anzahl morphologisch intakter und vorwärtsmotiler Samenzellen korreliert sind.

2.2.2.2.3 Spermien- Funktionsprüfung

Die Befruchtungsfähigkeit von Hengstspermien ist von der Integrität ihrer einzelnen Kompartimente abhängig (MAGISTRINI 2000). Zur funktionalen Untersuchung eignen sich Färbungen mit fluoreszierenden Farbstoffen, der hypoosmotische Schwellungstest, der Spermien-Filtrations- Test und der Oozyten- Bindungstest (SIEME et al. 2001).

Fluoreszenz- Färbungen

Die Unversehrtheit der Plasmamembran ist essentiell für die Aufrechterhaltung genereller Zellfunktionen. Durch die Verwendung verschieden mit der Plasmamembran interagierender Farbstoffe durch Kombination von Carboxyfluoreszeindiacetat mit Propidiumiodid ist es möglich, die einzelnen Teilbereiche einer Samenzelle farblich in funktionsfähige und nicht funktionsfähige Areale zu unterteilen.

So können Carboxyfluorescein und Calcein AM (Acetoxy- Methyl) die intakte Membran permeieren und die DNA der funktionsfähigen Zelle anfärben, Farbstoffe wie Propidiumjodid und das Ethidium Homodimer hingegen nur die DNA von Zellen mit zerstörter Plasmamembran (HARRISON u. VICKERS 1990). Kombinationsfärbungen erlauben somit die lebend- tot Darstellung der Zellkompartimente, also von Akrosom, Spermienkopf, Mittelstück und Spermischwanz, und sind zur Einschätzung des Prozentsatzes an funktionsfähigen Spermien bei der Samenuntersuchung aussagefähiger als die Bewertung der Motilität (ALTHOUSE u. HOPKINS 1995). SIEME et al. (1996) fanden unter Verwendung von CFDA/ PI, MAGISTRINI et al. (1997) und VIDAMENT et al. (1998) mit der Kombinationsfärbung SYBR®-14/PI eine signifikante Korrelation zwischen der Motilität und der Integrität der Samenzellmembran heraus.

Im Zuge des Kapazitationsprozesses kommt es durch einen Calciumeinstrom in die Zelle zur Akrosomreaktion, in deren Verlauf eine löchrige Permeabilisierung der äußeren Akrosommembran auftritt, welche mit Hilfe von Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) konjugierten, an der Membran bindenden Lektinen von der Ackererbse *Pisum sativum* (PSA) oder der Erdnuß *Arachis hypogaea* (PNA), fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden kann (CASEY et al. 1993).

Mit Hilfe dieser Färbemethode kann der akrosomale Status der Samenzellen eines Ejakulates festgestellt werden. MEYERS et al. (1995) zeigten mit FITC- PSA Unterschiede zwischen fertilen und subfertilen Hengsten bei in vitro mit Progesteron ausgelöster Akrosomreaktion auf, wobei die Zahl akrosomreagerter Spermien nach der Induktion bei fertilen Hengsten höher lag. Mit der in vitro induzierten Akrosomreaktion könnte es nach VARNER et al. (2000) bei Verwendung von FITC- PSA zu falsch positiven Ergebnissen kommen, da die Inkubation zum Teil zu einer Fragmentierung der akrosomalen Membran führt und so eine Akrosomreak-

tion vortäuscht, weswegen er der Untersuchung mittels Transmissionselektronenmikroskopie den Vorzug gibt.

Ferner bietet die Chlortetracyclin- Färbung die Möglichkeit der Ermittlung und Darstellung der Kapazitation und der Akrosomreaktion von Samenzellen (VARNER et al. 1993).

Mit monoklonalen Antikörpern gegen ein Antigen der Innenfläche der äußeren Akrosommembran kann die Membranintegrität des Akrosoms überprüft werden (BLACH et al. 1989). Eine Fluoreszenz zeigt sich nach Zugabe des zweiten FITC gekoppelten Antikörpers nur bei den Zellen, deren Plasmamembran geschädigt ist. In einer Studie von SCHROP (1992) wurden zur Feststellung des akrosomalen Status bei Verwendung dieser antikörpervermittelten Darstellung gegenüber der Spermac- Färbung 6 % weniger geschädigte Akrosome nachgewiesen, was die Sensitivität dieses Verfahrens verdeutlicht.

Für eine ausreichende Energieversorgung zur Vorwärtsbewegung der Samenzelle sind die im Mittelstück lokalisierten Mitochondrien verantwortlich, welche den Zellbrennstoff Adenosin-Triphosphat (ATP) synthetisieren. Voraussetzung dafür ist die Integrität der Mitochondrien, welche man mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 123 überprüfen kann (JOHNSON et al. 1980). Mit diesem Farbstoff versetzte Spermien emittieren eine verschieden starke Fluoreszenz, abhängig von der Zahl ihrer intrazellulär vorhandenen Mitochondrien. EVENSON et al. (1994) fanden heraus, daß die so demonstrierte Mitochondrienfunktion mit der Lebensfähigkeit der Spermien korreliert ist. GRAVANCE et al. (2000) nutzte zur Erfassung der Mitochondrienaktivität die Carbocyanin- Jodid Färbung (JC-1), welche Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials widerspiegelt. Ferner kann auf die Mitochondrienfunktion durch den Gehalt an ATP geschlossen werden, der mit Hilfe der Biolumineszenztechnik unter Verwendung der ATP- Luciferase vorgenommen wird. Es besteht eine Korrelation zwischen dem ATP-Gehalt, der Motilität und der Fruchtbarkeit (FOULKES u. MC DONALD 1979; WOODS et al. 1986).

Hypoosmotischer Schwelltest (HOST)

Der Schwellungstest für Samenzellen in einem hypoosmotischen Medium gilt als ein wichtiges Kriterium für die funktionale Integrität der Plasmamembran und beruht auf einem osmotisch bedingten Wassereinstrom in die Zelle zum Ausgleich des osmotischen Gradienten durch die semipermeable Zellmembran. Optisch ist dieser Vorgang am Aufrollen und Anschwellen des Spermischwanzes erkennbar. Da eine intakte Spermatozoenmembran für die Vitalität einer Zelle unabdingbar ist, wird ein fehlendes Anschwellen bei hypoosmotischer Belastung als ein sicheres Kriterium für eine gestörte Membranintegrität gewertet. Die Volumenänderungen der Zelle im HOST weisen auf eine zelluläre Regulationsfähigkeit und demnach auf das Bestehen einer funktionstüchtigen Membran hin (JEYENDRAN et al. 1984,

TAKAHASHI et al. 1990, PETZOLDT u. ENGEL 1994). Die Unversehrtheit der Membran und deren Funktionsfähigkeit ist als dort lokalisierter Erkennungs- und Wirkungsort im Fusionsprozeß mit der Eizellmembran äußerst wichtig, da alle zellulären Transportvorgänge und die zur Ernährung der Zelle notwendige Substrataufnahme über die Plasmamembran vollzogen werden. Der hypoosmotische Schwellungstest ist ein brauchbares Verfahren, um eine Prognose für die Spermatozoen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Befruchtung einer Eizelle zu stellen (JEYENDRAN et al. 1984). Ein besonderer Vorteil des HOST ist, daß im Gegensatz zu den Färbeverfahren keine Beeinflussung der Spermien durch Zusatz chemischer Komponenten stattfindet (PETZOLDT u. ENGEL 1994).

Der hypoosmotische Schwellungstest eignet sich zur Beurteilung der Membranintegrität von Frisch- und Tiefgefriersamen (PETZOLDT et al. 1996), bei der Überprüfung der Widerstandsfähigkeit der Samenzellmembran unter osmotischer Belastung und bei der Analyse der Ionenpumpe während oder nach dem Tiefgefrierprozeß (CAIZA DE LA CUEVA et al. 1997). MAGISTRINI et al. (1997) und VIDAMENT et al. (1998) zeigten im Vergleich von Rohsamen und aufgetautem Tiefgefriersperma eine signifikante Korrelation zwischen den HOST-Ergebnissen von Rohsamen mit dem ATP- Gehalt und der Auftaumotilität des TG- Spermias. Eine positive Korrelation der HOST- Ergebnisse mit der Fruchtbarkeit von Hengsten stellte DE ALBUQUERQUE LAGARES (1995) bei der Untersuchung von 156 Ejakulaten von 13 Hengsten dar.

Spermien- Oozyten- Bindungstest

Die Voraussetzung für die Befruchtung einer Eizelle ist das Binden der Samenzelle an der Zona pellucida. Die Penetration der Oozyte erfordert von der Samenzelle Vorwärtsbeweglichkeit, die Fähigkeit mit den entsprechenden Rezeptoren an der Zona pellucida zu binden und die Akrosomreaktion auszulösen. Der Zona- Penetrationstest dient dazu, diese Eigenschaften der Spermien herauszustellen (GRAHAM 1997). In der Regel wird in speziellen Laboratorien der ”homologous hemizona assay” (HZA) durchgeführt, bei dem zwei Hälften der Zona pellucida einer Stuteneizelle mit einer definierten Menge bzw. Konzentration an Hengstsperma inkubiert werden. Die Samenzellen binden je nach ihrem Vermögen an der Hemizona (FAZELI et al. 1993). Die absolute Zahl der gebundenen Spermien korreliert nicht mit dem Fertilitätsgrad des untersuchten Hengstes, da es einen Überlappungsbereich bezüglich der Zona-Bindungs Kapazität von Spermien fertiler und subfertiler Hengste gibt (PANTKE et al. 1994). Im direkten Vergleich von fertilen mit subfertilen Hengsten an jeweils einer Zonahälfte einer Stuteneizelle, war die Zahl der gebundenen Spermatozoen bei den fertilen Hengsten signifikant höher, als die der subfertilen (FAZELI et al. 1993). Eine andere Studie zeigt eine

signifikant positive Korrelation zwischen der Zahl an der Zona pellucida gebundener Samenzellen und der Trächtigkeitsrate im ersten Rossezyklus (FAZELI et al. 1995).

Ferner existiert der heterologe Penetrationstest mit zonafreien Hamsteroozyten, wodurch mehrere Spermien gleichzeitig in die Hamstereizelle eindringen können. Dieser Test zeigt, inwieweit die Samenzellen akrosomreagiert sind (GRAHAM 1997).

2.2.2.2.4 Seminalplasma

Bevor es bei Säugetieren zur Verschmelzung von männlicher und weiblicher Gameten kommt, sind spezifische Interaktionen beider mit den Zellen des jeweiligen Genitaltraktes notwendig. Für die Spermien kommt es bei Eintritt in das weibliche Genital zur Kapazitation und zur Akrosomreaktion und schließlich im Eileiter zur Bindung an die Zona pellucida und nachfolgender Fusion mit der Eizelle (TÖPFER-PETERSEN et al. 1998).

Die Voraussetzungen für die Ausführung der einzelnen Sequenzen erlangen die Spermatozoen während der Nebenhodenpassage. Direkt aus dem Hoden gewonnene Samenzellen sind prinzipiell zwar zur Befruchtung fähig, jedoch erfährt die Samenzelle im Nebenhoden im Zuge der Reifung die Voraussetzung, sich progressiv fortzubewegen. Durch die Interaktion mit den epididymidalen Sekreten und später mit dem Seminalplasma erfolgt ein wichtiger Organisationsprozeß, der die Bindung und z. T. auch die Integration neuer Proteine an bzw. in die Doppelmembran beinhaltet. Diese Interaktion der dominanten Proteine des equinen Seminalplasmas mit der Spermienoberfläche moduliert verschiedene Schritte des Befruchtungsprozesses (TÖPFER-PETERSEN et al. 1998).

Diese Proteine aus der Superfamilie der Cystein Rich Secretory Proteins (CRISP) werden im Hoden (CRISP-1), im Nebenhoden (CRISP-2) und von den akzessorischen Geschlechtsdrüsen, beim Hengst in den Samenblasen (CRISP-3) gebildet, und binden an der Spermienmembran. Mit Hilfe eines kompetitiven Inhibitionstestes auf Basis des ELISA's (DOSTALOVA et al. 1994) kann die Anzahl der auf dem Spermium gebundenem CRISP ermittelt werden. Diese korreliert mit der Fertilität von Hengsten (REINEKE et al. 1999). Dieses biochemische Verfahren stellt eine gute Ergänzung zu den spermatologischen Parametern in Bezug auf die Fruchtbarkeit von Hengsten dar.

Des weiteren existiert ein heparin bindendes Protein, welches als Horse Seminal Protein (HSP1 u. 2) bezeichnet wird. Es ist ähnlich dem Fibronectin Typ II und wird beim Pferd hauptsächlich in der Ampulle gebildet wohingegen HSP-1 schon im Nebenhoden an dem

Spermium bindet. Diese Proteine lagern sich an der Samenzellmembran an und ermöglichen es, Heparin im Zuge des Kapazitationsprozesses zu binden.

Die dritte Gruppe von Proteinen im Seminalplasma stellen die Spermadhäsine dar. Beim Hengst werden diese bereits im Hoden und entlang des gesamten Genitaltraktes sezerniert, binden am Äquatoralsegment des Spermienkopfes und befähigen die Samenzelle, mit der Zona pellucida der Oozyte zu interagieren (REINERT et al. 1996, 1997).

2.2.2.2.5 Spermatologische Mindestanforderungen

Im heutigen Zuchtgeschehen sind an den Samen hohe Ansprüche zu stellen, da das Sperma nicht nur frisch und unmittelbar versamt wird, sondern über längere Zeit kühl gelagert und häufig auch verschickt wird. Wird Hengstsamen zur Tiefgefrierkonservierung beurteilt, gelten zudem nochmals schärfere Kriterien hinsichtlich der Samenbeschaffenheit.

Tab.1 : Durchschnittswerte und Mindestanforderungen samenbiologischer Parameter bei Hengsten

	Durchschnittswerte		Mindestanforderungen	
	Klug (1982)	Pickett et al. (1988)	Dowsett u.Pattie (1982)	Clement et al. (1995 a)
Hengste (n)	332	417	47	-
Gelfreies Volumen (ml)	45	45	25	-
Dichte (Mio/ml)	150	335	20	73 (2,8)
GSZ (Mrd)	10	11,9	1,3	2,5 (1,9)
GSZ lebende (Mrd)	-	-	1,1	-
V-motile (%)	15	-	-	>55 (>31)
V24h-motile (%)	-	-	-	>15 (>3)
morphologisch normale (%)	30	51	-	>64
pH- Wert	-	7,52	-	-

Werte

KLUG (1982): Doppelte Standardabweichung der Mittelwerte 332 untersuchter Hengste (7- 17 Jahre)

Hannoveraner und Englisches Vollblut

PICKETT et al. (1988): Durchschnittswerte von zuchttauglich befundenen Hengsten der Rassen Quarter Horse,

Englisches und Arabisches Vollblut, Appaloosa und Paint Horse

DOWSETT u. PATTIE (1982): Minimalstandards von 47 untersuchten Hengsten der Rassen Vollblut, Australian

Stock Horse, Quarter Horse, Australisches Warmblut, Appaloosa, Shetland Pony

CLEMENT et al. (1995a): Mindestanforderungen für Warm- und Kaltbluthengste (Werte in Klammern) der

Französischen Landeszucht.

2.2.2.2.6 Beziehung andrologischer Parameter zur Fertilität

Die Untersuchung eines Hengstes auf Zuchttauglichkeit zielt darauf ab, anhand der erhobenen Befunde eine Aussage über dessen zu erwartende Fruchtbarkeitsleistung treffen zu können. In diesem Abschnitt wird versucht, fertilitätsrelevante Parameter der andrologischen Untersuchung und deren Bedeutung für die Befruchtungsfähigkeit von Hengsten darzustellen.

Hoden:

Ort der Samenproduktion ist das Hodenparenchym. Da ein großer Hoden einen höheren Anteil an funktionellem Parenchym aufweist als ein kleinerer, und nach AMANN (1993) die Effizienz des täglichen Spermienausstoßes pro Gramm Hodenparenchym definiert ist, nimmt die Hodengröße und daraus folgend der Gesamtspermienausstoß Einfluß auf die Fertilität eines Hengstes (PICKETT 1993).

Spermabiologische Parameter

SAMPER et al. (1991) und JASKO et al. (1992) fanden eine positive Korrelation zwischen der Anfangsmotilität in Frischsamen und der Fruchtbarkeitsleistung von Hengsten. Der Prozentsatz an vorwärtsbeweglichen Spermien nach 24 und 48 Stunden bei Lagerung des Samens bei 4°C ist nach CLEMENT et al. (1995a) der aussagekräftigste Parameter in Bezug zur Fertilität.

Hinsichtlich morphologischer Kriterien kommt es nach BIELANSKI (1975), JASKO et al. (1990) und CLEMENT et al. (1991) bei einem hohen Anteil an abnorm gestalteten Samenzellen im Ejakulat zu einem Absinken der Fertilität. KENNEY et al. (1995) fanden mit Hilfe des Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) einen negativen Zusammenhang zwischen hohen Denaturierungswerten der Spermien DNA und der Fertilität heraus.

Die Auslösbarkeit der Akrosomreaktion in vitro ist nach MEYERS et al. (1995) positiv mit der Fertilisierungsfähigkeit von Hengsten korreliert.

Es besteht nach FOULKES und MC DONALD (1979) sowie WOODS et al. (1986) ein positiver Zusammenhang zwischen dem ATP Gehalt der Samenzellen und der Fruchtbarkeit von Hengsten.

Die Ergebnisse des HOST korrelieren nach DE ALBUQUERQUE LAGARES (1995) positiv mit der Fruchtbarkeit.

Mittels Spermien Oozyten Bindungstest- in Gestalt des Hemizona assays- fanden FAZELI et al. (1993) und PANTKE et al. (1994) bei fertilen Hengsten einen signifikant höheren Anteil an der Eizelle gebundener Samenzellen als bei subfertilen. MALMGREN (1997) hält den Hemizona Bindungstest für eine aussagekräftige Untersuchungsmethode zur Einschätzung der

Fruchtbarkeit eines bis dato unbekanntes Hengstes, wenn dieser parallel dazu mit einem Hengst bekannter Fruchtbarkeit verglichen wird.

Der Anteil der an der Spermienmembran gebundenen Proteine der Superfamilie der Cystein Rich Secretory Proteins (CRISP 1- 3), kann mit Hilfe eines kompetitiven Inhibitionstestes mittels ELISA dargestellt werden und korreliert nach REINEKE et al. (1999) mit der Fertilität von Hengsten.

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Untersuchungskonzeption

Die eigenen Untersuchungen wurden in die Abschnitte Teil I und Teil II gegliedert:

Teil I: Retrospektive Analyse spermatologischer Daten während der Zuchtsaison

- Beziehung der spermatologischen Parameter zur Befruchtungs- und Abfohlrate
- Korrelationen der Ejakulatparameter untereinander
- Einfluß des Sexualverhaltens auf die qualitativen und quantitativen Ejakulatparameter
- Beziehung der Samementnahmefrequenz und des Samementnahmeintervalles zur Befruchtungs- und Abfohlrate

Teil II: Experimenteller Teil

Spermabiologische Funktionsprüfung bei Hengsten unter Berücksichtigung saisonaler Effekte und der Fertilität

- Gewinnung und Vorbereitung der Proben

Untersuchungen der Spermienmotilität

- CASA Computer Assisted Spermatological Analysis
- Vitalitätsprüfung (Halteproben)

Spermienfunktionsprüfung

- CFDA/ PI- Färbung
- Hypoosmotischer Schwelltest (HOST) mittels CASY
- FITC- PSA/PI- Färbung
- Induktion und mikroskopische Beurteilung der Akrosomreaktion

Die in Teil II aufgeführten Versuche wurden zu drei Terminen innerhalb eines Jahres (Juli, November und März) durchgeführt und sollen ein saisonales Profil der Samenbeschaffenheit einer ausreichend großen Stichprobe an Hengsten (n 69) liefern.

3.1.2 Samenspender

Als Spendertiere der Samenproben standen sämtliche im Besamungseinsatz stehenden Hengste des Niedersächsischen Landgestütes Celle zur Verfügung.

Für den Teil I waren dieses 71 Hengste, welche auf den Besamungsstationen in Niedersachsen verteilt waren. Die durchschnittlich 108 Ejakulate pro Hengst (Min: 29; Max: 179) wurden während der Stationszeit von Ende Februar bis Anfang Juli gewonnen.

Für den Teil II wurden die Ejakulate von 69 Hengsten im Juli 2000 (Versuchsdurchgang 1), November 2000 (Versuchsdurchgang 2) und im März 2001 (Versuchsdurchgang 3) untersucht.

3.1.3 Gewinnung und Aufbereitung der Ejakulate

Die Gewinnung der Ejakulate erfolgte mit einer künstlichen Scheide Modell "Hannover". Diese enthält einen zusätzlichen Innenschlauch, der in ein Auffanggefäß mit eingesetzter steriler Gaze mündet, welche die Schleimfraktion vom übrigen Ejakulat abtrennt. Es folgt eine grobsinnliche Prüfung der Samenprobe auf unerwünschte Beimengungen und die Bestimmung von Farbe und Konsistenz. Mit Hilfe der Skalierung des Auffanggefäßes wird das Volumen ermittelt und dann mit einem Photometer ("Spermacue®", Fa. Minitüb, Landshut) die Samenzellkonzentration (Samendichte) bestimmt. Aus dem Produkt des Volumens und der Dichte wird die Gesamtspermienzahl (in Milliarden) errechnet. Anschließend wird ein Tropfen des Samens auf einem 37°C vorgewärmten Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas abgedeckt und auf einem ebenfalls beheizten Mikroskoptisch mit einem Phasenkontrastmikroskop (Okular 10fach, Objektiv 20fach) auf Motilität untersucht. Der prozentuale Anteil vorwärts-, orts- und unbeweglicher Samenzellen wird durch Schätzung ermittelt. Eine Kreisbewegung, deren Radius in etwa der Länge eines Spermiums entspricht, wurde als Ortsbewegung angesehen.

Daraufhin wird der Samen mit einem Verdünner INRA- 82 (Institut National Recherche Agronomique) auf Magermilchbasis auf eine Konzentration von 50 Millionen Samenzellen pro ml verdünnt und bei +5°C im Kühlschrank gelagert.

Nach 24 Stunden erfolgt eine erneute Schätzung der Motilität des bei +5°C gelagerten Samens.

3.1.4 Fertilitätsdaten

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse mit der Befruchtungsrate und der Abfohlrate der betreffenden Hengste in Relation gesetzt. Die Befruchtungsrate ist die bislang gebräuchlichste Methode zur Beurteilung der männlichen Fruchtbarkeit in der Pferdezucht. Sie gibt an, wieviel Prozent der im Verlauf der Zuchtsaison besamten Stuten insgesamt tragend wurden. Die hier verwandten Werte entsprechen den positiven Rückmeldungen der Stutenbesitzer nach Trächtigkeitskontrolle ihrer Stuten.

Als zweiter Fertilitätsparameter dient die Abfohlrate, ein Wert, der die Befruchtungsrate um den Anteil der nicht paternal bedingten Fruchtverluste korrigiert. Die hier verwendeten Daten beruhen auf der Zahl der geborenen Fohlen, die an das Gestüt zurückgemeldet wurden.

3.1.5 Teil I: **Retrospektive Analyse spermatologischer Daten während der Zuchtsaison**

In diesem Abschnitt wurden die Samenuntersuchungsprotokolle der Saison 1999 von 71 Hengsten des Niedersächsischen Landgestütes Celle statistisch ausgewertet. Es sind dieses die Protokolle während der Stationszeit der Hengste von Ende Februar bis Anfang Juli. Dabei wurden alle Ejakulate ($n = 7655$) der Hengste in diesem Zeitraum berücksichtigt.

Es wurden tabellarisch folgende Parameter erfaßt:

Identität: Hengstname, Datum und Ejakulatnummer des Tages

Sexualverhalten: Geschlechtslust und die Anzahl der Aufsprünge

Quantitative Ejakulatparameter: Volumen, Dichte und Gesamtspermienzahl

Qualitative Ejakulatparameter: Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen (mikroskop. Schätzung) direkt nach Samenentnahme und nach 24 Stunden Lagerung bei +5°C

3.1.5.1 Einfluß des Alters auf die Fertilität

Mittels einer multifaktoriellen Kovarianzanalyse wurde der Einfluß des Alters der Hengste auf die Befruchtungs- und Abfohlrate ermittelt. Ferner wurden die Hengste in Altersgruppen eingeteilt, um zu prüfen, ob eine Beziehung zwischen den einzelnen Altersstufen und der Fruchtbarkeit besteht.

Zusammenstellung der Altersgruppen:

Alter in Jahren	Hengste (n)
5	13
6 - 8	16
9 - 12	25
13 - 16	8
> 16	9

3.1.5.2 Einfluß der Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten auf die Fertilität

Das Maß der Einflußnahme der durchschnittlichen Stutenzahl pro Hengst auf die Fruchtbarkeitsparameter wurde mit einer multifaktoriellen Kovarianzanalyse dargestellt.

Um den Faktor Stutenzahl und seinen Einfluß auf die Fertilität näher zu charakterisieren, wurden die Hengste entsprechend der Anzahl der ihnen zugeführten Stuten in Gruppen eingeteilt.

Zusammenstellung der Hengstgruppen nach der Anzahl der ihnen zugeführten Stuten:

Stuten (n) pro Hengst	1 - 20	21 - 50	51 - 100	101- 150	151 - 200	> 200
Hengste (n)	14	18	13	13	8	5

3.1.5.3 Beziehung der biologischen Ejakulatparameter zur Fertilität

Für die Beurteilung der Beziehung der einzelnen spermatologischen Parameter zur Befruchtungs- und Abfohlrate wurden die Mittelwerte der geprüften Merkmale aller Ejakulate eines Hengstes gebildet und mit dessen Fruchtbarkeit verglichen.

3.1.5.4 Korrelation der Ejakulatparameter untereinander

Um eine Aussage über Zusammenhänge zwischen den einzelnen erhobenen Ejakulatparametern treffen zu können, wurden diese einander gegenüber gestellt. Es wurden die quantitativen (Volumen, Dichte, Gesamtspermienzahl) und qualitativen (Vorwärtsbewegliche Samenzellen direkt nach Samenentnahme und nach 24 Stunden bei Lagerung bei +5°C) Merkmale miteinander in Beziehung gesetzt.

3.1.5.5 Intra- und interindividuelle Schwankungen der Ejakulatparameter

Mit dieser Untersuchung sollte geprüft werden, inwieweit die Ejakulatmerkmale eines Hengstes über den Zeitraum der Zuchtsaison individuellen Schwankungen unterworfen sind.

Es wurden für jeden Hengst die Mittelwerte aller quantitativen und qualitativen spermatologischen Parameter gebildet, und die Streuung ermittelt. Die Streuung wurde als anteilige Abweichung vom Mittelwert in Prozent ausgedrückt. Für jedes Merkmal wurde pro Hengst die minimale und maximale Streuung (intraindividuelle Schwankung) sowie die durchschnittliche Streuung bei allen Hengsten (interindividuelle Schwankung) aufgeführt.

3.1.5.6 Einfluß des Sexualverhaltens auf die quantitativen und qualitativen Ejakulatparameter

Um den Einfluß des Sexualverhaltens auf die quantitativen und qualitativen Sameneigenschaften darzustellen, wurden die Ejakulate unter Berücksichtigung der Anzahl der für die Gewinnung erforderlichen Aufsprünge ausgewertet. Ferner wurde geprüft, inwieweit die Aufsprunghäufigkeit und die daran gekoppelte Sameneigenschaft auf individuellen Eigenarten der Hengste beruht.

3.1.5.7 Einfluß der Samenentnahmefrequenz und des Samenentnahmeintervalles auf die Fertilität

Für die Fragestellung des Einflusses der Samenentnahmefrequenz und des Samenentnahmeintervalles auf die Befruchtungs- und Abfohlrate wurden die einzelnen Hengste in Gruppen zusammengefaßt.

Die Samenentnahmefrequenz kennzeichnet die durchschnittliche Anzahl der Samenentnahmen pro Tag. Dabei wurde die Anzahl der Ejakulate eines Hengstes durch die Anzahl der Ta

ge auf der Besamungsstation dividiert. Es ist dieses eine modellhafte Darstellung, da etwaige Ruhetage, beispielsweise am Wochenende, unberücksichtigt bleiben.

$$\text{Samenentnahmefrequenz} = \frac{\text{Summe der Samenentnahmen (n)}}{\text{Stationszeit (d)}}$$

Zusammenstellung der Hengstgruppen nach ihrer Samenentnahmefrequenz:

Samenentnahmefrequenz	Hengste (n)
0,5	8
0,5 - 1	51
> 1	12

Von Hengsten mit einer Samenentnahmefrequenz von > 1 wurde im Durchschnitt der Saison gelegentlich mehr als einmal pro Tag Samen gewonnen.

Das Samenentnahmeintervall definiert die Anzahl der Tage zwischen den einzelnen Samenentnahmen, d.h. wie regelmäßig dem Hengst Samen entnommen wurde. Auch hierfür gilt der Modell- Charakter.

$$\text{Samenentnahmeintervall} = \frac{\text{Stationszeit (d)}}{\text{Tage mit Samenentnahme (d)}}$$

Zusammenstellung der Hengstgruppen nach dem Samenentnahmeintervall:

Samenentnahmeintervall	Hengste (n)
0,5 - 1	7
> 1 -1,5	49
> 1,5 - 2	8
> 2 - 2,5	3
> 2,5	4

Bei einem Hengst mit einem Samenentnahmeintervall von > 2,5 lagen im Durchschnitt der Zuchtsaison mehr als zweieinhalb Tage zwischen den Samenentnahmen.

3.1.6 Teil II: Experimenteller Teil

Spermabiologische Funktionsprüfung bei Hengsten unter Berücksichtigung saisonaler Effekte und der Fertilität

3.1.6.1 Spermienmotilität

3.1.6.1.1 Computervideomikrographische Motilitätsanalyse

Die computergestützte Motilitätsanalyse (CASA) der Samenproben wurde 30 Minuten, 24 und 48 Stunden nach Gewinnung der Ejakulate mit dem Strömberg- Mika Cell Motion Analysis System (Strömberg Mika Medical, Montreux, Schweiz) unter Nutzung der Software "Cell motion analysis, Version 4,4" durchgeführt.

Den auf 50 Millionen Samenzellen pro Milliliter verdünnten Samenproben wurde für die Untersuchung je 5 µl entnommen und auf eine auf 37°C vorgewärmten Zählkammer nach Mika (Strömberg Mika Medical, Montreux, Schweiz) pipettiert. Für die Videomikrographie wurde ein Phasenkontrastmikroskop mit beheizbarem Kreuztisch benutzt, welches mittels einer aufgesetzten Kamera die mikroskopischen Bilder auf den Computer übertrug. Es wurden pro Kammer fünf Gesichtsfelder pro Probe gemessen und im Computer gespeichert. Die Messung der einzelnen Felder wurde zu einem Gesamtergebnis zusammengefaßt und der prozentuale Anteil motiler, lokal motiler und immotiler Spermien nach 30 Minuten, nach 24 und 48 Stunden protokolliert.

Zusammenstellung der Parametereinstellung für die Motilitätsanalyse:

Anzahl der Bilder der Sequenz	32
Mindestbildanzahl	15
minimale Fläche des Objektes	16 [pix]
maximale Fläche des Objektes	300 [pix]
maximale Fläche der unbeweglichen Objekte	60 [pix]
Geschwindigkeitsklassenbreite	3 [µm/s]
Geschwindigkeitsgrenze für immobile Objekte	15 [µm/s]
Geschwindigkeitsgrenze für lokalmotile Objekte	30 [µm/s]
Tiefe der Meßkammer	10 [µm/s]
Temperatur der Probe	37 [°C]
Schwanzdetektion	ja
Empfindlichkeit der Schwanzdetektion	1,1

3.1.6.1.2 Vitalitätsprüfung

Zur Überprüfung der Haltbarkeit der Samenproben wurden diese bei +5°C gelagert. 24 und 48 Stunden nach der Samenentnahme wurde der Samen hinsichtlich seiner Motilität mit dem Strömberg- Mika Cell Motion Analysis System (Strömberg Mika Medical, Montreux,

Schweiz) untersucht und der prozentuale Anteil an vorwärtsbeweglichen und ortsbeweglichen Spermien computervideomikrographisch erfaßt und aufgezeichnet.

3.1.6.2 Spermienfunktionsprüfung

3.1.6.2.1 Carboxyfluoreszeindiazetat- Propidiumiodid Färbung (CFDA/PI)

Die Integrität der Spermienmembranen wurde mit der Kombinationsfärbung CFDA/ PI untersucht.

Herstellung der Färbelösung

CFDA- Stammlösung:

0,46 mg CFDA (Calibiochem La Jolla Ca, Frankfurt)

1,00 ml DMSO (Sigma Chemical Co., Deisenhofen)

PI- Stammlösung

0,50 mg PI (Sigma Chemical Co., Deisenhofen)

1,00 ml 0,9 %ige NaCl- Lösung

Es ist darauf zu achten, daß das Lösen der beiden Farbstoffe in Dunkelheit geschieht. Die Färbestammlösungen wurden in Eppendorfreagenzgefäße® (Fa. Eppendorf- Netheler- Hintz- GmbH, Hamburg) abgefüllt. Beide so hergestellte Lösungen ließen sich bei -18°C lagern.

Zur Immobilisation der lebenden Spermien wurde Formolcitrat (1,7mM) benutzt:

2,0 mg NaCitrat

ad. 100 ml Aqua bidest

Davon werden 125 µl entnommen und durch 125 µl Formalin ersetzt

Färbelösung

10 µl Formolcitrat

25 µl CFDA

20 µl PI

1 ml Frischsamenverdünner INRA-82 (Institut National Recherche Agronomique)

Beide Stammlösungen wurden im Dunkeln mit dem Verdünner gemischt. Von dieser Färbelösung wurden 300 µl mit 100 µl Samen, der im Verhältnis 1+1 mit Verdünner auf Magermilchbasis (INRA- 82, PALMER u. FAUQUENOT 1984) verdünnt worden war, gemischt. Die so gefärbte Probe wird im abgedunkelten Wasserbad bei 38°C für 15 Minuten inkubiert und dann fluoreszenzmikroskopisch (Axioscop®, Carl Zeiss, Oberkochen) bei 1000- facher Vergrößerung und Ölimmersion mit einem Fluoreszenzfilter mit einem Wellenlängenbereich von 450 bis 490 nm beurteilt. Es werden pro Untersuchung 200 Samenzellen nach folgendem Schema ausgewertet:

- | | |
|---|----------------------|
| • CFDA 1 <i>Akrosom und Mittelstück grün</i> | Kategorie I |
| Membran des Akrosoms und Mittelstückes erhalten | |
| • CFDA 2 <i>Samenzelle grün</i> | Kategorie I |
| Membran insgesamt erhalten | |
| • CFDA 3 <i>Spermienkopf rot</i> | Kategorie III |
| Membran vollständig geschädigt | |
| • CFDA 4 <i>Spermienkopf rot, Mittelstück grün</i> | Kategorie III |
| nur die mitochondriale Membran ist erhalten | |
| • CFDA 5 <i>Spermienkopf rot, Akrosom grün</i> | Kategorie II |
| nur die akrosomale Membran ist erhalten | |

Kategorie I : Zellmembran intakt

Kategorie II : Akrosomale Membran intakt

Kategorie III: Zellmembran geschädigt

3.1.6.2.2 Hypoosmotischer Schwelltest (HOST)

Gerätebeschreibung und Meßprinzip

Das "Cell Analyzer System CASY 1" Modell TTC (Schärfe System GmbH, Reutlingen) besteht aus den folgenden funktionellen Einheiten:

- Meßstand mit Meßeinheit, Drucksystem und Netzspannungsversorgung
- Präzisionsmeßkapillare (60 µm)
- Rechner mit Tastatur und Maus
- LCD Monitor

Das CASY 1 Modell TTC kombiniert eine Partikelmessung nach dem Widerstandsmeßprinzip mit einer Signalauswertung durch Pulsflächenanalyse.

Zur Messung werden die Zellen suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt. Die Präzisionsmeßpore ist als Bohrung in einem Rubin realisiert, der in den Kapillarkörper eingegossen ist. Während der Messung wird über zwei Platinelektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Da intakte Zellen in erster Linie als Isolator betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke.

Nach dem Ohmschen Gesetz gilt: $U=R \times I$. Wird dabei der Strom konstant gehalten, ergibt sich die Spannung als eine Funktion des Widerstandes. Der Spannungsanstieg ist dem Zellvolumen proportional: $U = f(R) = f(V)$. Diese Spannungsänderung wird verstärkt an einen Diskriminator-Schaltkreis weitergeleitet. Die Impulse, welche den festgelegten Schwellenwert überschreiten, werden an der Zählleinrichtung erfaßt. Die Messungen bei CASY 1 werden mittels hochfrequenter Pulsflächenanalyse durchgeführt. Dieses ermöglicht die hohe Meßgenauigkeit der erfaßten Daten. Das Gerät ist im Stande, die Daten über Populationen von mehreren Tausend Zellen pro Kanal zu erheben. Aus den Einzelmessungen berechnet das Gerät das Integral des Meßsignals und bestimmt zusätzlich aus der volumenlinearen Originalverteilung die durchmesserlineare Größenverteilung mit einer Auflösung von 1024 Kanälen.

Für die zellvolumetrischen Messungen müssen die Ejakulate definiert verdünnt und die Spermien durch schonendes Umschwenken gleichmäßig in der Probe verteilt werden.

Als isotones Verdünnungsmedium (300 mOsmol/kg) wurde die von der Fa. Schärfe System GmbH, Reutlingen, für das Gerät vorgesehene Elektrolytlösung Casyton® eingesetzt, welches vor der Verwendung mittels einer Einwegspritze durch einen Minisart- Filtervorsatz (Fa. Sartorius, Göttingen) zur Vorreinigung filtriert wurde.

Bei der Untersuchung wurde eine Probe nativen Samens von 2 µl in 10 ml isotone Elektrolytlösung gegeben, was einem Verdünnungsverhältnis von 1:5000 entspricht.

Die Kalibrierung des CASY 1 ist abhängig von der verwendeten Meßkapillare und dem gewählten Meßbereich (x- Achsenskalierung). Im System sind feste Kalibrierungen gespeichert. Bei den eigenen Messungen wurde eine Meßkapillare von 60 µm verwendet, und der Meßbereich auf der x-Achse wurde auf 0 bis 20 µm skaliert.

Es wurden jeweils Zweifachmessungen durchgeführt, wobei das Meßvolumen 200 µl pro Messung betrug.

Zur Auswertung der Meßergebnisse wurden Cursor gesetzt, was den Vorteil hat, den ersten Gipfel der Verteilungskurve, welcher den Schmutzpartikeln entspricht, unberücksichtigt zu lassen. So wurde mittels zweier Cursor die Verteilungskurve in dem Bereich zwischen 2,22 und 10 µm eingegrenzt und bei der Analyse nur dieser Teilbereich erfaßt.

Für die unterschiedlichen osmotischen Bedingungen wurde die Elektrolytlösung Casyton® entsprechend der errechneten Osmolaritäten mit Aqua bidest verdünnt.

Zusammenstellung der Mischungsverhältnisse der einzelnen Verdünnungsstufen:

6 Teile Casyton® : 0 Teil Aqua bidest	300mOsmol/kg
5 Teile Casyton® : 1 Teil Aqua bidest	250mOsmol/kg
4 Teile Casyton® : 2 Teile Aqua bidest	200mOsmol/kg
3 Teile Casyton® : 3 Teile Aqua bidest	150mOsmol/kg
2 Teile Casyton® : 4 Teile Aqua bidest	100mOsmol/kg
1 Teil Casyton® : 5 Teile Aqua bidest	50mOsmol/kg

Bei den Untersuchungen wurden 2 µl Nativsamen für 3 Minuten in 10ml der entsprechend verdünnten Elektrolytlösung inkubiert.

Das Gerät wurde vor jedem Meßvorgang auf die jeweilige Osmolaritätsstufe geeicht. Dazu wurde das Vorratsgefäß mit der hypotonen Lösung gefüllt und das Gerät mit drei Reinigungszyklen gespült. Es folgten zwei Probemessungen mit einem Meßvolumen von 400 µl als Dreifachmessung. Zur Überprüfung der Meßgenauigkeit wurde das CASY® 1 Modell TTC mit Hilfe von Latexpartikeln definierter Größe geeicht. Zum Einsatz kamen Latexpartikel (Standard Dow Latex®, Serva, Heidelberg) mit einem Durchmesser von 5,08 +/- 0,404 µm (Angaben des Herstellers)

Für die Korrelation der hypoosmotischen Verdünnungsstufen mit der Fertilität wurden Volumenquotienten wie folgt gebildet:

$$\text{Volumenquotient} = \frac{\text{Volumen [fl] (hypoosmotisch)}}{\text{Volumen [fl] (isoosmotisch)}}$$

In die Formel wurden die Mittelwerte der Spermiovolumina aller Hengste des betreffenden Untersuchungszeitpunktes eingesetzt.

3.1.6.2.3 Fluoreszein Isothiocyanat- PSA/ Propidiumiodid- Färbung

Zur Feststellung des Anteils an spontan akrosomreagierten Samenzellen im Nativsamen wurde die Kombinationsfärbung FITC- PSA/ PI eingesetzt.

Dabei ist ein Lektin von *Pisum sativum* mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC konjugiert. Im Zuge der Verschmelzung der Plasmamembran mit der äußeren Akrosommembran während der Akrosomreaktion sind diese Lektine in der Lage, an Kohlenhydratresten des akrosomalen Inhaltes zu binden und somit die stattgefundenene Akrosomreaktion zu signalisieren. Wird die FITC- PSA- Färbung mit einem Lebend- Tot- Farbstoff (PI) kombiniert, so ist zudem eine Unterscheidung zwischen einer "echten" Akrosomreaktion und der Degeneration des Akrosoms toter Spermien zu unterscheiden.

Herstellen der Färbelösung:

FITC- PSA- Stammlösung:

2,00 mg FITC-PSA (Sigma L 0770)

2,00 ml 0,9%ige NaCl- Lösung

PI- Stammlösung

0,50 mg PI (Sigma Chemical Co., Deisenhofen)

1,00 ml 0,9 %ige NaCl- Lösung

100 µl Nativsamen werden zuerst mit Formolcitrat (1,7 mM) fixiert, mit 6 µl FITC- PSA- Stammlösung versetzt und unter Lichtabschluß für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 2 µl PI Stammlösung hinzupipettiert und für 2 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß inkubiert.

Die Beurteilung der Akrosomreaktion erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (Axioskop®, Carl Zeiss, Oberkochen) bei 1000-facher Vergrößerung und Ölimmersion unter Verwendung eines Fluoreszenzfilters mit einer Wellenlänge von 450-490 nm.

Es wurden 200 Zellen nach folgendem Schema ausgewertet:

- **FITC 1** = grüne Fluoreszenz des Akrosoms, ungefärbtes Spermium
akrosomreagiert, Membran erhalten
- **FITC 2** = keine Fluoreszenz des Akrosoms, ungefärbtes Spermium
nicht akrosomreagiert, Membran erhalten
- **FITC 3** = keine Fluoreszenz des Akrosoms, rot gefärbtes Spermium
nicht akrosomreagiert, Membran nicht erhalten
- **FITC 4** = grüne Fluoreszenz des Akrosoms, rot gefärbtes Spermium
akrosomreagiert, Membran nicht erhalten

3.1.6.2.4 Induktion und mikroskopische Beurteilung der Akrosomreaktion

In- vitro Kapazitation von Hengstspermien

Zur In- vitro- Kapazitation der Spermien wurde das Tyrodemedium nach BAVISTER und YANAGIMACHI (1977), welches in Anlehnung an die Literatur (CHRISTENSEN et al. 1996) für die Inkubation von Hengstspermien modifiziert wurde, verwendet.

Zusammensetzung des modifizierten Tyrodemediums:

		mM	g/l
NaCl	Sigma S 9625	100	5,844
KCl	Sigma P 9333	2,7	0,2
NaHCO ₃	Sigma S 5761	10	0,84
NaH ₂ PO ₄	Sigma S 5011	0,4	0,048
Na-Laktat-Sirup	Sigma L 7900	25	2,802
MgCl ₂ (anhydr.)	Sigma M 8266	0,5	0,047
HEPES	Sigma H 0891	25	6
Glucose	Fluka 49140	6	1,087
Na-Pyruvat	Biochrom L 0473	1	10ml
BSA	Fluka 05477	0,6%	6
Aqua bidest			ad 1 l
pH 7,4			
300mOsmol			

Lebend- Tot- Färbung und Akrosomdarstellung

Auch bei diesen Untersuchungen wurde die Kombinationsfärbung von FITC- PSA und Propidiumiodid in der beschriebenen Form (3.1.6.2.3) verwendet.

Induktion der Akrosomreaktion

Die Akrosomreaktion wurde mit Heparin (Sigma H 7405) induziert. Hierbei wird 1 ml Samenflüssigkeit mit 3 ml modifizierter Tyrodelösung gemischt und für zwei Stunden in einem Wasserbad bei 38,5°C inkubiert. Die Induktion der Akrosomreaktion wird durch Zugabe von 100 µg Heparin/ml bei einer weiteren Inkubation von 20 Minuten im Wasserbad erreicht.

Darstellung der induzierten Akrosomreaktion

100 µl der mit Heparin versetzten Probe werden zuerst mit Formolcitrat (1,7 mM) fixiert, mit 6 µl FITC- PSA-Stammlösung versetzt und unter Lichtabschluß für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 2 µl PI Stammlösung hinzupipettiert und für 2 min ebenfalls bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß inkubiert. Die Beurteilung der in vitro induzierten Akrosomreaktion erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (Axioskop®, Carl Zeiss, Oberkochen) bei 1000-facher Vergrößerung und Ölimmersion unter Verwendung eines Fluoreszenzfilters mit einer Wellenlänge von 450-490 nm. Es wurden 200 Zellen ausgewertet.

Folgende Spermienkategorien können fluoreszenzmikroskopisch unterschieden werden:

- **FITCH 1** = *grüne Fluoreszenz des Akrosoms, ungefärbtes Spermium*
akrosomreagiert, Membran erhalten
- **FITCH 2** = *keine Fluoreszenz des Akrosoms, ungefärbtes Spermium*
nicht akrosomreagiert, Membran erhalten
- **FITCH 3** = *keine Fluoreszenz des Akrosoms, rot gefärbtes Spermium*
nicht akrosomreagiert, Membran nicht erhalten
- **FITCH 4** = *grüne Fluoreszenz des Akrosoms, rot gefärbtes Spermium*
akrosomreagiert, Membran nicht erhalten

Der Gesamtzuwachs an akrosomreagierten Samenzellen (AR) nach Inkubation im Kapazitationsmedium und Inkubation mit Heparin errechnet sich wie folgt:

- **Zuwachs AR** = (FITCH 1 + FITCH 4) - (FITC 1 + FITC 4)

3.1.6.3 Statistische Methoden zur Auswertung der Ergebnisse

Die statistischen Analysen der Versuchsergebnisse wurden im Institut für Biometrie und Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover unter Verwendung der SAS®- Software erstellt. Zur Auswertung der Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Einzelergebnissen für jeden Parameter errechnet.

Teil I

Für den Vergleich des Alters bzw. der Anzahl der den Hengsten zugeführten Hengsten wurde die Korrelation nach Pearson angewendet. Zur Bewertung der intra- und interindividuellen Schwankungen der Ejakulatparameter wurde ein Mittelwertsvergleich mit gepaartem t- Test durchgeführt.

Der Einfluß des Sexualverhaltens (Anzahl der Aufsprünge) auf die Ejakulatparameter wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse errechnet. Zur Differenzierung, welcher Einfluß auf die Änderung der Ejakulatparameter vom Hengst als Individuum ausgehen oder dem Faktor Aufsprung zuzuordnen sind, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt.

Zur Auswertung des Einflusses der Ejakulatparameter, der Samenentnahmefrequenz und des Samenentnahmeintervalles auf die Fertilität wurde eine multifaktorielle Kovarianzanalyse angewandt.

Teil II

Zur Bestimmung der Zusammenhänge zwischen den Samenparametern, den Untersuchungsergebnissen untereinander und zur Fertilität, wie auch der Alterseinfluß auf die Fertilität wurde die Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt.

Zur Bestimmung des Saisoneinflusses auf die CFDA- und FITC- Färbung, die Motilität und die Ergebnisse des HOST wurde ein gepaarter t- Test gerechnet.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 TEIL I

Retrospektive Analyse spermatologischer Daten während der Zuchtsaison

3.2.1.1 Einfluß des Alters auf die Fertilität

In Tabelle 2 ist die Einflußnahme des Alters auf die Fruchtbarkeitsleistung der Hengste verdeutlicht.

Tab.2: Einfluß des Alters der Hengste ($n = 71$) auf die Befruchtungs- und Abfohlrate(%)

			Befruchtung	Abfohlung
	\bar{X}	\pm SD	r	r
Alter (Jahre)	10	4,84	-0,272^a	-0,281^a

a = $p \leq 0,05$

Tabelle 2 zeigt den Grad der Beeinflussung der Fruchtbarkeitsleistung durch das Alter der Hengste.

Hierbei ist ein statistisch signifikanter Zusammenhang des Alters mit der Befruchtungs- und der Abfohlrate ($p \leq 0,05$) ersichtlich.

Um den Einfluß des Alters auf die Fruchtbarkeit anschaulicher darzustellen, wurden die Hengste in Altersgruppen eingeteilt (Tab. 3).

Tab. 3: Mittlere Befruchtungs- und Abfohlrate (\bar{X}) der Hengste und deren Beziehung zu dem Alter der Hengste

Alter (Jahre)	< 5	6 – 8	9 – 12	13 – 16	>16
Hengste (n)	13	16	25	8	9
Befruchtung [%] \bar{X}	75,2 ^a	72,2	66,8 ^b	76,3	64,9
\pmSD	9,02	8,36	14,52	9,07	12,37
Abfohlung [%] \bar{X}	61,9	57,1	53,2	64,3	53,5
\pmSD	12,75	7,04	13,32	9,32	12,11

a, b = $p \leq 0,05$

Das schlechteste Befruchtungsergebnis zeigen die Hengste, die über 16 Jahre alt sind. Zwischen der Altersgruppe unter fünf Jahren und Hengsten mit einem Alter von neun bis zwölf Jahren ist der Unterschied der Befruchtungsrate ($p \leq 0,05$). Hinsichtlich der Abfohlresultate läßt sich kein Zusammenhang mit dem Alter herstellen.

3.2.1.2 Einfluß der Anzahl der dem Hengst zugeführten Stuten auf die Fertilität

Die Bedeutung der Anzahl an Stuten, welche einem Hengst zugeführt werden, auf die Fruchtbarkeit, verdeutlicht Tabelle 4.

Tab. 4: Einfluß der Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten auf die Befruchtungs- und Abfohlrate (%)

			Befruchtung	Abfohlung
	\bar{X}	\pm SD	r	r
Stuten (n)	89	97,94	0,431^c	0,426^c

c = p ≤ 0,001

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, ist ein Zusammenhang zwischen der durchschnittlichen Stutenzahl pro Hengst und der Fruchtbarkeit zu erkennen.

Sowohl die Befruchtungsrate als auch der Abfohlhundertsatz verhalten sich zur Stutenanzahl signifikant (p ≤ 0,001).

Um den Faktor Stutenzahl und seinen Einfluß auf die Fruchtbarkeit der Hengste näher zu charakterisieren, wurden die Hengste entsprechend der Anzahl der von ihnen bedeckten Stuten in Gruppen eingeteilt (Tab. 5).

Tab. 5: Mittlere Befruchtungs- und Abfohlrate der Hengste und deren Beziehung zur Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten

Stuten	1 bis 20	21 bis 50	51 bis 100	101 bis 150	151 bis 200	> 200
Hengste (n)	14	18	13	12	9	5
Befruchtung [%] \bar{X}	62,3 ^{a,c}	64,2 ^{a,c}	71,4 ^b	74,8 ^{b,d}	77,4 ^d	81,2 ^d
\pmSD	16,20	12,60	9,42	7,85	8,00	4,72
Abfohlung [%] \bar{X}	54,4 ^c	57 ^{a,c}	61,3	65,9 ^{b,d}	67,9 ^{b,d}	72,2 ^d
\pmSD	15,01	12,38	10,05	7,75	7,17	5,30

Statistische Unterschiede innerhalb Zeilen

a, b = p ≤ 0,05; c, d = p ≤ 0,01

Bei steigender Stutenzahl pro Hengst war sowohl eine Zunahme der Befruchtungsrate als auch der Abfohlrate zu verzeichnen (Tabelle 5). So liegen die Befruchtungsergebnisse bei den Hengstgruppen mit unter 50 Stuten pro Saison signifikant unter den Ergebnissen der Hengste mit einer höheren Stutenzahl und sind bei Hengsten mit über 200 Stuten um 17 % höher. Die Abfohlrate zeigt ein ähnliches Verhältnis zur Anzahl der besamten Stuten und nimmt von der Gruppe mit unter 20 Hengsten zur Gruppe mit mehr als 200 Stuten pro Hengst um 17,8 % zu. Die Streuung der Befruchtungs- und der Abfohlrate nimmt bei steigender Stutenzahl pro Hengst ab.

3.2.1.3 Beziehung der Ejakulatparameter zur Befruchtungs- und Abfohlrate

In Tabelle 6 sind die Mittelwerte der quantitativen und qualitativen Ejakulatparameter aller 71 Hengste der Zuchtsaison 1999 in Beziehung zur Befruchtungs- und Abfohlrate aufgeführt.

Tab. 6: Beziehung der spermatologischen Parameter der Hengste ($n = 71$) zur Befruchtungs- und Abfohlrate (%)

			Befruchtung[%]	Abfohlung [%]
	\bar{X}	\pm SD	p	p
Volumen [ml]	47	17	0,6928	0,1012
Dichte [$\times 10^6$/ml]	186	74	0,4632	0,4195
GSZ [Mrd]	7,88	3,5	0,5013	0,2041
V 0 [%]	66	8	0,1955	0,2978
V 24 [%]	37	22	0,0295	0,0686

GSZ = Gesamtspermienzahl

V 0 = Anfangsmotilität

V 24 = Motilität 24h bei +5°C

Der Vergleich der quantitativen Ejakulatparameter Volumen, Dichte und Gesamtspermienzahl mit dem Befruchtungs- bzw. dem Abfohlhundertsatz ergibt keine signifikanten Abhängigkeiten. Ebenso läßt sich kein statistischer Zusammenhang zwischen der Anfangsmotilität nach Samenentnahme und den Fruchtbarkeitskriterien herstellen.

Lediglich für die Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen nach 24 Stunden ist ein signifikanter Bezug zur Befruchtungsrate zu verzeichnen ($p = 0,0295$).

3.2.1.4 Korrelationen der Ejakulatparameter untereinander

Tab. 7: Beziehung der spermatologischen Parameter zueinander
(Korrelationskoeffizient nach Pearson)

	Volumen [ml]	Dichte[x10 ⁶ /ml]	GSZ [Mrd]	V 0 [%]
Volumen [ml]				
Dichte [x10 ⁶ /ml]	- 0,488 ^c			
GSZ [Mrd]	0,526 ^c	0,523 ^c		
V 0 [%]	- 0,080	0,159	0,094	
V 24 [%]	- 0,051	0,197	0,149	0,402 ^c

c = p ≤ 0,001

GSZ = Gesamtspermienzahl

V 0 = Anfangsmotilität

V 24 = Motilität 24h bei +5°C

Wie Tabelle 7 zeigt, ist das Volumen mit der Dichte negativ korreliert und zeigt einen positiven Bezug zur Gesamtspermienzahl. Die Samenzellkonzentration ist ebenfalls mit der Gesamtspermienzahl positiv korreliert. Der Anteil vorwärtsmotiler Spermien nach 0 Stunden im Ejakulat korreliert positiv mit den vorwärtsbeweglichen Samenzellen in der Halteprobe nach 24 Stunden.

3.2.1.5 Intra- und interindividuelle Schwankungen der Ejakulatparameter

Anhand aller Ejakulate von 71 Hengsten der Saison 1999 soll gezeigt werden, wie sehr die quantitativen und qualitativen Ejakulatparameter beim einzelnen Hengst und innerhalb der Population um den Mittelwert streuen.

Hierzu wurden die Mittelwerte aller Ejakulate eines Hengstes gebildet und die Standardabweichung bestimmt. Die prozentuale Abweichung der Standardabweichung vom Mittelwert ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: Intra- und interindividuelle Schwankungen der Ejakulatparameter
 Prozentuale Abweichung der Standardabweichung [SD] vom Mittelwert

	Min	Max	Gesamt \bar{X}	\pm SD Min [%]	\pm SD Max [%]	\pm SD Gesamt [%]
Volumen [ml]	4	230	47	18,3	58,4	36,1
Dichte [10⁶/ml]	10	840	186	15,4	62,6	39,8
GSZ [Mrd]	0,6	64,4	7,88	17,4	62,7	44,4
V 0 [%]	10	90	66	2,8	22,1	12,1
V 24 [%]	0	80	36	4	586,7	59,5

GSZ = Gesamtspermienzahl

V 0 = Anfangsmotilität

V 24 = Motilität 24h bei +5°C

Das Merkmal Volumen streut intraindividuell von 18,3 % bis 58,4 %. Über die Hengste insgesamt beträgt die Schwankung im Durchschnitt 36,1 %. Die Samenzellkonzentration pro Milliliter liegt innerhalb der einzelnen Hengste zwischen 15,4 % und 62,6 %. Im Mittel schwankt das Merkmal Dichte um 39,8 %. Bei Betrachtung der Gesamtspermienzahl streut diese intraindividuell von 17,4 % bis 62,7 % um den Mittelwert und beträgt interindividuell über alle Hengste 34,3 %. Die intraindividuelle Streuung des Anteils vorwärtsmotiler Spermien direkt nach Samenentnahme liegt zwischen 2,8 % und 22,1 %. Interindividuell ist die Schwankung in diesem Merkmal mit 12,1 % gering. Bezüglich der Motilität in den 24 Stunden Halteproben ist intraindividuell eine erhebliche Streuung von 4 % bis 586,7 % festzustellen, und im Hengst zu Hengst Vergleich streut das Merkmal um 59,5 %.

Die interindividuellen Schwankungen der samenbiologischen Parameter von Monat zu Monat sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Mittelwerte der spermatologischen Parameter über die Monate Februar bis Juli

	Ejakulate (n)	Volumen [ml]	Dichte [10^6 /ml]	GSZ [Mrd]	V 0 [%]	V 24 [%]
\bar{X} Februar	290	47 ^{c,e}	230	9,65 ^e	62 ^e	39 ^e
±SD		23,81	124,57	5,56	12,75	20,59
\bar{X} März	1737	44 ^{c,d,e}	194 ^e	7,38 ^{e,f}	65 ^f	36 ^{a,c,f}
±SD		22,71	93,13	3,87	11,24	26,03
\bar{X} April	1755	46 ^d	167	6,98 ^f	66 ^f	32 ^{a,c,f}
±SD		21,62	82,72	4,25	10,36	27,43
\bar{X} Mai	1774	50 ^{d,f}	162 ^f	7,26	66 ^{a,f}	31 ^{a,b,f}
±SD		24,09	81,84	4,12	9,6	26,56
\bar{X} Juni	1679	50 ^f	167 ^f	7,67	67 ^{a,f}	33 ^{a,b,d,f}
±SD		21,66	75,15	4,31	9,78	26,52
\bar{X} Juli	420	49 ^f	179 ^f	8,05	66 ^{b,f}	37 ^{b,d}
±SD		21,53	82,74	4,65	10,04	28,5
\bar{X} Gesamt	7655	47	183	7,83	65	35
±SD ges.		22,57	90,025	4,46	10,62	25,93

Statistische Unterschiede innerhalb Spalten
a, b = $p \leq 0,05$; c, d = $p \leq 0,01$; e, f = $p \leq 0,001$

GSZ = Gesamtspermienzahl
V 0 = Anfangsmotilität
V 24 = Motilität 24h bei +5°C

Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, weisen die Ejakulatparameter zwischen den Monaten Februar bis Juli gewisse Schwankungen auf. Das mittlere Volumen variiert zwischen 44 und 50 ml und es kommt nach einem signifikanten Abfall im März ($p \leq 0,01$) zu einem fast steten Ansteigen in den darauffolgenden Monaten ($p \leq 0,001$). Die Samenzellkonzentration pro ml nimmt ebenfalls zu Beginn der Saison deutlich ab. Sie ist im März statistisch signifikant höher als im Mai, Juni und Juli ($p \leq 0,001$), aber der Juli-Wert zeigt gegen Ende der Zuchtseason einen leichten Anstieg gegenüber dem Vormonat. Die Gesamtspermienzahl in den Ejakulaten nimmt von Februar bis April und von März zu April statistisch deutlich ab ($p \leq 0,001$), steigt dann ab Mai wieder langsam an. Die Vorwärtsmotilität der Samenzellen direkt nach Ejakulatgewinnung steigt in den ersten Monaten von 62 % auf 67 % an ($p \leq 0,001$) und nimmt dann zum Juli auf 65 % ab ($p \leq 0,05$). Die Haltbarkeit des Samens, ermittelt nach 24 Stunden, nimmt bis Mai signifikant ab, um von Juni bis Juli wieder anzusteigen. Im Durchschnitt sind nach 24 Stunden noch 35 % der Samenzellen progressiv motil.

3.2.1.6 Einfluß des Sexualverhaltens auf quantitative und qualitative

Ejakulatparameter

In den Samenentnahmeprotokollen war die Zahl der Aufsprünge bis zur Samengewinnung von 1- 6 angegeben. In Tabelle 10 und in Abbildung 2 sind die Beziehungen zwischen der Anzahl der benötigten Aufsprünge und dem Volumen, der Dichte, der Gesamtspermienzahl, dem prozentualen Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien direkt nach der Gewinnung und nach 24 Stunden dargestellt.

Tab. 10: Einfluß des Sexualverhaltens (Anzahl der Aufsprünge 1- 6) auf die spermato-logischen Parameter

Aufsprünge(n)	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Hengste (n)	71	70	55	25	10	8
Ejakulate (n)	4601	1775	386	91	26	18
Volumen [ml] \bar{X}	44^{c,e}	49^{c,d,e}	60^{a,c,d,e,f}	69^{a,b,f}	78^{d,f}	85^{b,f}
±SD	15	17	24	21	35	28
Dichte [x10⁶/ml] \bar{X}	190^a	180^a	174	144^b	128^b	132^b
±SD	79	78	94	73	34	49
GSZ [Mrd] \bar{X}	7,62	7,99	8,98	9,09	9,36	10,39
±SD	3,79	3,58	4,84	4,00	4,07	2,74
V 0 [%] \bar{X}	66,4	65,4	63,8	63,3	64,9	62,1
±SD	7,96	8,45	10,20	9,54	10,51	13,95
V 24 [%] \bar{X}	40,0^{a,c,e}	37,3^{c,e}	23,9^{d,f}	17,8^f	20,2^b	14,7^d
±SD	21,96	22,72	24,26	23,36	22,33	25,66

Statistische Unterschiede in Zeilen

a, b = $p \leq 0,05$; c, d = $p \leq 0,01$; e, f = $p \leq 0,001$

GSZ = Gesamtspermienzahl

V 0 = Anfangsmotilität

V 24 = Motilität 24h bei +5°C

Das Ejakulatvolumen nimmt mit der Anzahl der Aufsprünge zu. Die Steigerung des Volumens nach drei, vier fünf und sechs Aufsprüngen im Vergleich zum Volumen nach nur einem Aufsprung ist signifikant ($p \leq 0,001$), wobei sich das durchschnittliche Volumen vom ersten Aufsprung zum sechsten fast verdoppelt.

Die Samenzellkonzentration nimmt entsprechend der Anzahl benötigter Aufsprünge ab. Die Unterschiede der Samendichte nach einem Aufsprung und nach vier, fünf und sechs Aufsprüngen sowie nach zwei Aufsprüngen gegenüber der Dichte nach vier und fünf Aufsprüngen sind signifikant ($p \leq 0,05$).

Die Gesamtpermienzahl nimmt nach mehreren Aufsprüngen auf das Phantom zu. Hinsichtlich der Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen ist kein Einfluß des Sexualverhaltens zu verzeichnen. Die Vorwärtsbeweglichkeit in den 24- Stunden Halteproben der Ejakulate, die nach mehreren Aufsprüngen des Hengstes gewonnen wurden, nimmt ab. So ist der Anteil an motilen Spermien nach 24 h- Lagerung bei $+5^{\circ}\text{C}$ in den Ejakulaten, die mit nur einem Aufsprung gewonnen wurden, gegenüber den Halteproben, die beim dritten, vierten, sechsten ($p \leq 0,001$) und beim fünften ($p \leq 0,05$) Aufsprung gewonnen wurden, signifikant höher. Im zweiten Aufsprung gewonnene Ejakulate weisen im Vergleich zu den im dritten ($p \leq 0,01$) und sechsten ($p \leq 0,05$) bzw. im vierten ($p \leq 0,001$) gewonnenen ebenfalls eine signifikant höhere Vorwärtsbeweglichkeit auf.

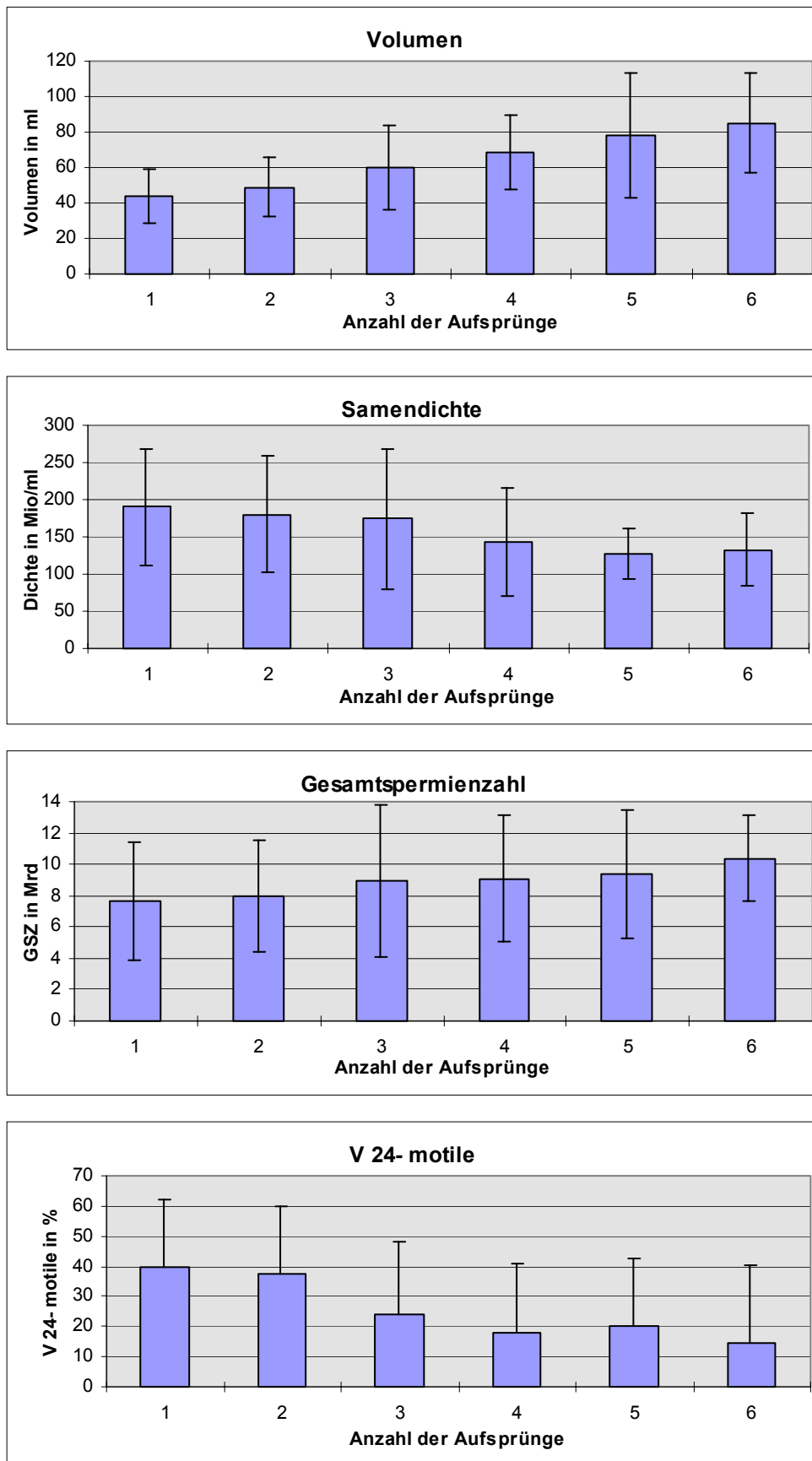


Abb. 2: Volumen, Samendichte, Gesamtpermienzahl und Motilität nach 24h in Abhängigkeit von der Anzahl der Aufsprünge pro Ejakulatgewinnung

Tab. 11: *Bezug zwischen hengsteigenem Einfluß und durch die Anzahl der Aufsprünge hervorgebrachten Änderungen der Ejakulatparameter (r Bestimmtheitsmaß)*

	r^2	Hengst einfluß	Aufsprung	Hengst x Aufsprung
Volumen [ml]	0,56	90%	7%	3%
Dichte [$\times 10^6$/ml]	0,65	97%	1%	2%
GSZ [Mrd]	0,56	95%	1,5%	3,5%
V 0 [%]	0,63	97%	0,5%	2,5%
V 24 [%]	0,71	94%	2,25%	3,75%

GSZ = Gesamtpermienzahl

V 0 = Anfangsmotilität

V 24 = Motilität 24h bei +5°C

Die Tabelle 11 zeigt den prozentualen Einfluß der Faktoren Hengst und Anzahl der Aufsprünge auf die Änderungen der Ejakulatparameter. Ferner wurde die Schnittmenge der beiden Faktoren (Änderung sowohl dem Hengst als auch dem Aufsprungverhalten des Hengstes zuzuordnen) berücksichtigt.

Die Variationen in den quantitativen und qualitativen Sameneigenschaften lassen sich in diesem Modell zu mindestens 90% bei allen Parametern durch den Faktor Hengst erklären, und ist mit einem Prozentsatz von 97 bei der Samenzellkonzentration und der Vorwärtsbeweglichkeit besonders hoch. Die Einflußnahme des Faktors Anzahl der Aufsprünge auf die Ejakulateigenschaften liegt beim Volumen bei 7 %, bei der Vorwärtsbeweglichkeit hingegen nur bei 0,5 %.

Die Variationen der spermatologischen Parameter, die sowohl vom Faktor Hengst als auch vom Faktor Aufsprung beeinflusst werden, reichen von 2 % bei der Dichte bis 3,75 % beim Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen nach 24 Stunden Lagerung bei +5°C.

3.2.1.7 Einfluß der Samenentnahmefrequenz und des Samenentnahmeintervalles auf die Fertilität

Tab. 12: Einfluß von Samenentnahmefrequenz und Samenentnahmeintervall auf die Befruchtungs- und Abfohlrate (%)

	\bar{X}	\pm SD	Befruchtung p	Abfohlung p
Samenentnahmefrequenz	0,82	0,222	0,0732	0,0240
Samenentnahmeintervall	1,4	0,645	0,1088	0,0457

Tabelle 12 zeigt den Einfluß der Samenentnahmefrequenz und des Samenentnahmeintervalles auf die Befruchtungs- und Abfohlrate. Die Samenentnahmefrequenz (Anzahl der Samenentnahmen pro Tag) korreliert signifikant ($p = 0,0240$) zur Abfohlrate.

Das Samenentnahmeintervall (Anzahl der Tage zwischen den Samenentnahmen) hat einen signifikanten Einfluß ($p = 0,0457$) auf den Abfohlhundertersatz.

Tab. 13: Beziehung zwischen der Samenentnahmefrequenz und der Befruchtungs- und Abfohlrate

Samenentnahmen pro Tag	< 0,5	0,5- 1	>1
Hengste (n)	12	51	8
\bar{X} Befruchtung [%] \pm SD	66,3 9,24	69,1^a 13,49	77,9^b 8,31
\bar{X} Abfohlung [%] \pm SD	55,6^a 7,80	60,9^c 12,91	70,6^{b,d} 6,47

Statistische Unterschiede in Zeilen

a, b = $p \leq 0,05$; c, d = $p \leq 0,01$

Tabelle 13 zeigt die Beziehung zwischen der Häufigkeit der Samenentnahme und der Befruchtungsrate bzw. Abfohlrate der untersuchten Hengste. Dabei zeigt sich eine signifikante Zunahme der Befruchtungsleistung ($p \leq 0,05$) bei den Hengsten, bei denen pro Tag im Regelfall einmal und gelegentlich zweimal (> 1) Samen abgenommen wurde gegenüber denen, die seltener zur Samenentnahme herangezogen wurden. Auch die Abfohlrate steht in direktem Zusammenhang mit der Samenentnahmefrequenz. So besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Hengsten mit geringer oder mittlerer geschlechtlicher Beanspruchung ($p \leq 0,05$) und den Hengsten mit einer Samenentnahmefrequenz von mindestens einer Samenentnahme pro Tag ($p \leq 0,01$).

Tab.14: Beziehung zwischen dem Samenentnahmeintervall und der Befruchtungs- und Abfohlrate

Tage zwischen den Samenentnahmen	0,5 – 1	1 – 1,5	1,5 - 2	2 – 2,5	>2,5
Hengste (n)	4	52	8	3	4
\bar{X} Befruchtung% ±SD	80,3 4,71	69,5 12,37	75,9 15,54	73,4 4,54	62,1 10,20
\bar{X} Abfohlung% ±SD	77,4 ^c 4,25	61,1 ^d 11,27	66,8 17,04	62,4 5,44	52,8 ^d 7,04

c, d = $p \leq 0,01$

Bezüglich des Samenentnahmeintervalles war kein Einfluß auf die Befruchtungsrate zu erkennen, wenngleich der Befruchtungshundertsatz bei den Hengsten, die am häufigsten und regelmäßigsten zur Samenentnahme herangezogen wurden, den höchsten Wert aufweist (Tab. 14).

Die Zahl der geborenen Fohlen nimmt tendenziell ab, je weniger häufig ein Hengst zum Einsatz kam. Dabei unterscheidet sich die Abfohlrate der Hengste mit mindestens täglicher Samenentnahme signifikant von derjenigen der Hengste mit einer ein- bis eineinhalbtägigen und einer mehr als zweieinhalbtägigen Geschlechtsruhe ($p \leq 0,01$).

3.2.2 TEIL II (experimenteller Teil)

Spermabiologische Funktionsprüfung bei Hengsten unter Berücksichtigung saisonaler Effekte und der Fertilität

3.2.2.1 Einfluß des Alters und der Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten auf die Fertilität

Tab. 15: Einfluß des Alters der Hengste ($n = 69$) auf die Befruchtungs- und Abfohlrate ($r =$ Korrelationskoeffizient nach Pearson)

			Befruchtung	Abfohlung
	\bar{X}	\pm SD	r	r
Alter (Jahre)	10,2	5,06	- 0,259^a	- 0,217

a = $p \leq 0,05$

Wie in Tabelle 15 dargestellt, hat das Alter einen Einfluß auf die Fertilität der Hengste. So zeigt sich eine negative Korrelation (nach Pearson) des Alters zur Befruchtungsrate ($p \leq 0,05$).

Zwischen dem Alter und der Abfohlrate läßt sich abweichend von den Ergebnissen im Teil I (Kapitel 3.2.1.1) kein signifikanter Zusammenhang herstellen.

Tab. 16: Bedeutung der Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten auf die Befruchtungs- und Abfohlrate der Hengste ($r =$ Korrelationskoeffizient nach Pearson)

			Befruchtung	Abfohlung
	\bar{X}	\pm SD	r	r
Stuten (n)	103	103	0,486^c	0,474^c

c = $p \leq 0,001$

Tabelle 16 verdeutlicht einen statistischen Zusammenhang zwischen der Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten und der Befruchtungsleistung der Hengste. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ist sowohl für die Befruchtungs- als auch für die Abfohlrate signifikant ($p \leq 0,001$).

3.2.2.2 Quantitative Ejakulatparameter unter Berücksichtigung der Jahreszeit

Tab. 17: Mittelwerte (\bar{X}) der quantitativen Ejakulatparameter Volumen, Dichte und Gesamtspermienzahl unter Berücksichtigung der Jahreszeit

	JULI	NOVEMBER	MÄRZ	GESAMT
Ejakulate (n)	69	65	56	190
\bar{X} Volumen [ml]	57 ^{a,c}	45 ^{a,d}	41 ^b	47
±SD	22,2	20,8	19,7	19,0
\bar{X} Dichte [$\times 10^6$ /ml]	264 ^{c,e}	315 ^{e,f}	228 ^{d,f}	268
±SD	81,4	123,6	98,9	95,4
\bar{X} GSZ [Mrd]	14,57 ^e	13,47 ^e	8,52 ^f	11,8
±SD	6,24	7,58	4,22	6,7

Statistische Unterschiede in Zeilen

GSZ = Gesamtspermienzahl

a, b = $p \leq 0,05$; c, d = $p \leq 0,01$; e, f = $p \leq 0,001$

Wie in Tabelle 17 dargestellt, läßt sich bezüglich des Volumens ein saisonaler Effekt aufzeigen, wobei es von Juli zum November und zum März abnimmt. Die Unterschiede zwischen Juli und November ($p \leq 0,05$) und zwischen Juli und März bzw. November und März ($p \leq 0,01$) sind signifikant.

Die Samenzellkonzentration steigt von Juli zu November signifikant an ($p \leq 0,001$) und ist im darauffolgenden März wieder signifikant geringer. Bei der Gesamtspermienzahl ist eine abnehmende Tendenz von Juli bis März zu verzeichnen, wobei die Unterschiede signifikant ($p \leq 0,001$) zwischen Juli und November einerseits und März andererseits ausfallen.

3.2.2.3 Unterschiede in der Vorwärtsmotilität unter Berücksichtigung der Jahreszeit

Tab. 18: Mittelwerten (\bar{X}) der Motilität sofort, 24 und 48 Stunden nach Samenentnahme unter Berücksichtigung der Jahreszeit

	JULI	NOVEMBER	MÄRZ	GESAMT
Ejakulate (n)	69	65	56	190
\bar{X} V 0	61,5 ^{a,c}	52,6 ^{d,e}	69,8 ^{b,f}	61
±SD	19,40	16,98	14,93	18,58
\bar{X} V 24	40,5 ^c	30,3 ^{d,e}	53,6 ^{d,f}	41,1
±SD	23,26	21,56	17,95	23,05
\bar{X} V 48	21,9 ^a	16,3 ^{b,e}	29,9 ^{b,f}	22,5
±SD	20,91	18,72	19,64	20,46

Statistische Unterschiede in Zeilen

a, b = $p \leq 0,05$; c, d = $p \leq 0,01$; e, f = $p \leq 0,001$

V 0 = Anfangsmotilität

V 24 = Vorwärtsmotilität nach 24 h

V 48 = Vorwärtsmotilität nach 48 h

Tabelle 18 und Abbildung 3 zeigen den Mittelwertsvergleich des Anteils vorwärtsmotiler Samenzellen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

Die Ejakulate vom März weisen einen signifikant höheren Anteil an vorwärtsbeweglichen Samenzellen gegenüber Juli und November auf. Auch im Juli liegt der Anteil an vorwärtsmotilen Spermien signifikant über denen im November ermittelten Werten. Das Niveau der Anfangsmotilität (V 0) spiegelt sich auch in den Halteproben nach 24 und 48 Stunden wider, wobei sich prozentuale Verteilung von Juli zu November und März erhält.

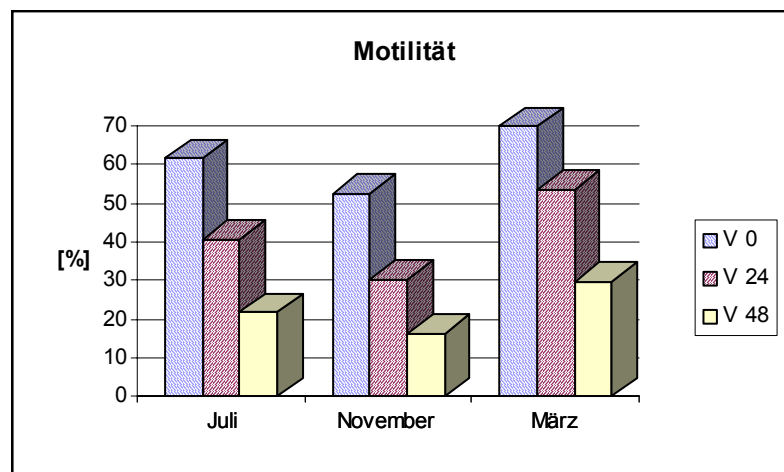


Abb. 3: Saisonale Unterschiede der Vorwärtsmotilität der Samenzellen sofort nach

Samenentnahme (V 0) sowie nach 24 (V 24) und 48 Stunden (V 48) Lagerung bei +5°C

3.2.2.4 Integrität der Plasmamembran unter Berücksichtigung der Jahreszeit

Tab. 19: Prozentuale Verteilung membranintakter und -geschädigter Spermien zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten

	Kategorie	JULI	NOVEMBER	MÄRZ	GESAMT
Ejakulate (n)		69	65	56	190
\bar{X} CFDA1 [%]	I	8,8 ^{c,e}	4,1 ^{d,e}	0,7 ^{d,f}	4,6
±SD		8,68	4,35	2,22	6,67
\bar{X} CFDA2 [%]	I	45,0	42,1	41,7	43,5
±SD		18,05	19,49	20,15	18,75
\bar{X} CFDA3 [%]	III	25,2 ^e	24,2 ^c	13,7 ^{d,f}	21,4
±SD		14,65	18,30	13,25	16,28
\bar{X} CFDA4 [%]	III	13,5 ^e	24,8 ^{c,f}	32,4 ^{d,f}	23,6
±SD		16,53	16,07	17,15	18,14
\bar{X} CFDA5 [%]	II	7,5 ^a	4,8 ^{b,c}	8,1 ^d	6,8
±SD		7,14	5,03	5,75	6,17

Statistische Unterschiede in Zeilen

a, b = $p \leq 0,05$; c, d = $p \leq 0,01$; e, f = $p \leq 0,001$

CFDA 1 Membran des Akrosoms und Mittelstückes erhalten

CFDA 2 Membran insgesamt erhalten

CFDA 3 Membran vollständig geschädigt

CFDA 4 nur die mitochondriale Membran ist erhalten

CFDA 5 nur die akrosomale Membran ist erhalten

Kategorie I: Zellmembran intakt

Kategorie II: akrosomale Membran intakt

Kategorie III: Zellmembran geschädigt

Wie aus Tabelle 19 hervorgeht, ist der Anteil an CFDA 1 gefärbten Spermien im Juli signifikant höher als im November ($p \leq 0,01$) und im März ($p \leq 0,001$). Bei den insgesamt membranintakten Samenzellen gibt es keine statistisch relevanten Unterschiede bei den drei Entnahmezeitpunkten (siehe auch Abb. 4). Die CFDA 3 gefärbten Samenzellen nehmen von Juli zu November nur geringgradig ab, jedoch ist die Abnahme von November zu März ($p \leq 0,01$) wie auch von Juli zu März signifikant ($p \leq 0,001$). CFDA 4 gefärbte Spermien nehmen von Juli zum März kontinuierlich zu, mit einer Signifikanz von $p \leq 0,001$ von Juli zu November sowie von Juli zum März. Der Anteil an CFDA 5 gefärbten Spermien nimmt von Juli zu November signifikant ab ($p \leq 0,05$) und von November zum März wieder signifikant zu ($p \leq 0,01$).

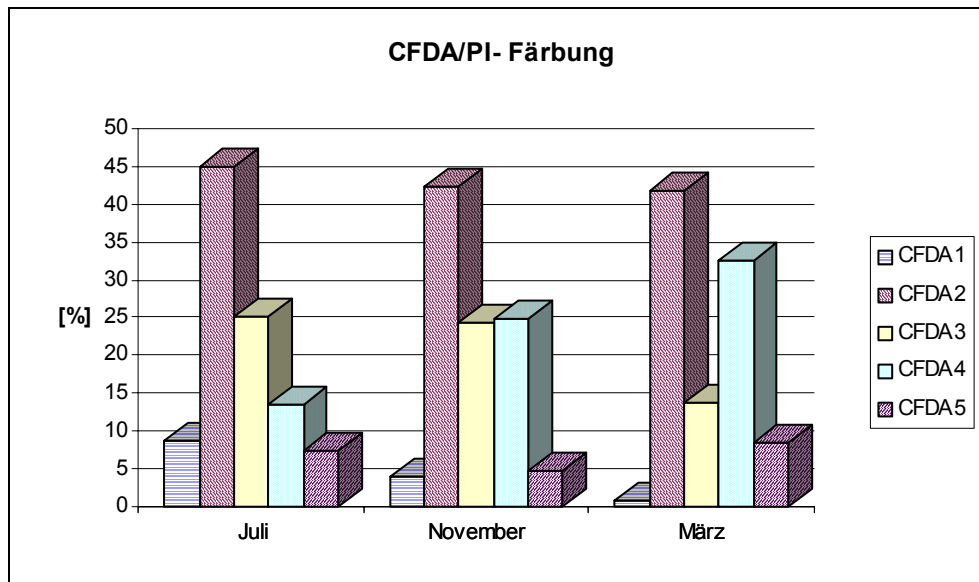


Abb.4: Saisonalen Unterschiede der Plasmamembranintegrität

3.2.2.5 Volumenregulationsfähigkeit der Spermien im hypoosmotischen Schwellungstest (HOST) unter Berücksichtigung der Jahreszeit

Das Schwellvermögen der Samenzellen in hypotonen Lösungen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten wird in Tabelle 20 und in den Abbildungen 5 und 6 dargestellt.

Tab.20: Darstellung des mittleren Volumens der Samenzellen bei den verschiedenen Osmolaritäten im hypoosmotischen Schwellungstest (HOST)

	JULI	NOVEMBER	MÄRZ	GESAMT
Ejakulate (n)	69	65	56	190
\bar{X} 300 mOsmol	40,0	40,2	40,8	40,3
±SD	5,34	4,56	4,20	4,75
\bar{X} 250 mOsmol	42,8^a	41,0^b	41,5	41,8
±SD	5,05	4,47	5,11	4,92
\bar{X} 200 mOsmol	41,7^e	38,9^f	37,9^f	39,6
±SD	4,43	3,49	4,23	4,35
\bar{X} 150 mOsmol	39,2^e	37,2^{c,f}	35,8^{d,f}	37,5
±SD	4,24	3,60	3,55	4,06
\bar{X} 100 mOsmol	36,4^e	34,5^{a,f}	33,3^{b,f}	34,8
±SD	3,80	3,10	3,30	3,64
\bar{X} 50 mOsmol	27,0^e	27,3^e	24,2^f	26,2
±SD	3,31	3,04	2,40	3,26

Statistische Unterschiede in Zeilen

a, b = $p \leq 0,05$; c, d = $p \leq 0,01$; e, f = $p \leq 0,001$

Das durchschnittliche Volumen der Samenzellen im isoosmotischen Medium (300 mOsmol) ist bei allen Hengsten zu allen Entnahmezeitpunkten annähernd gleich (Tab. 22). Bezüglich der hypoosmotischen Verdünnungsstufen ist ein saisonaler Effekt ersichtlich.

Bei 250 mOsmol ist im Juli das mittlere Zellvolumen signifikant höher ($p \leq 0,05$), als im November. Ab einer Verdünnungsstufe von 200 mOsmol ist die Volumenregulation der Spermien im Juli im Vergleich zu November und März signifikant erhöht ($p \leq 0,001$). Bei 150 mOsmol zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen November und März ($p \leq 0,01$), wie auch bei 100 mOsmol die Zellvolumina aus November signifikant höher sind, als die aus dem März ($p \leq 0,05$). Bei einer Osmolarität von 50 sind die Zellvolumina aus Juli bzw. November gegenüber den Märzwerten signifikant höher ($p \leq 0,001$).

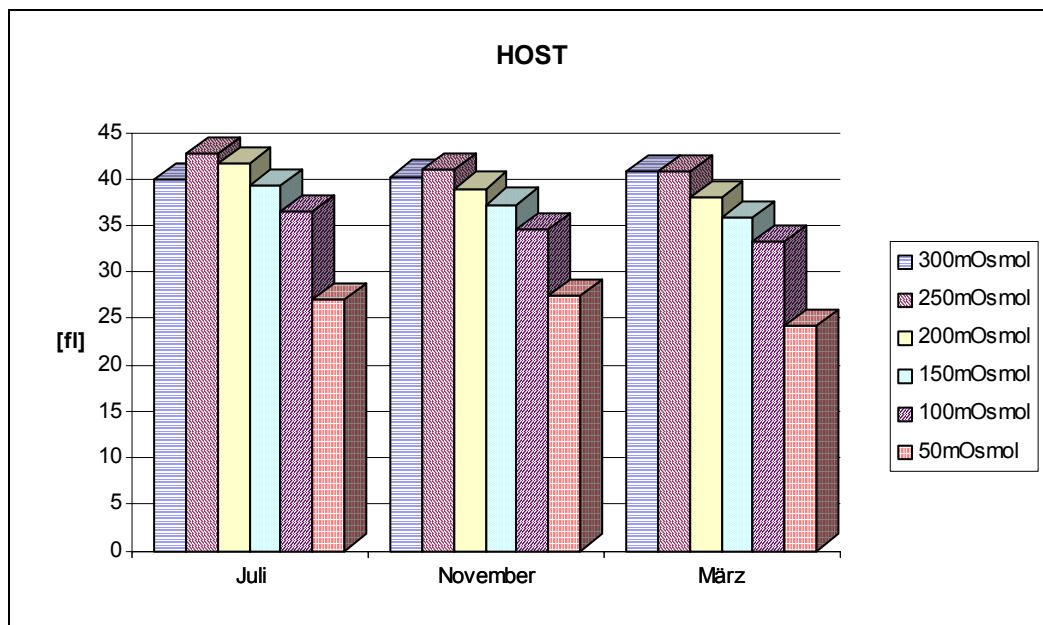


Abb. 5: Saisonale Unterschiede der Samenzellvolumina unter isotoner (300 mOsmol) und hypotoner Belastung (250- 50 mOsmol)

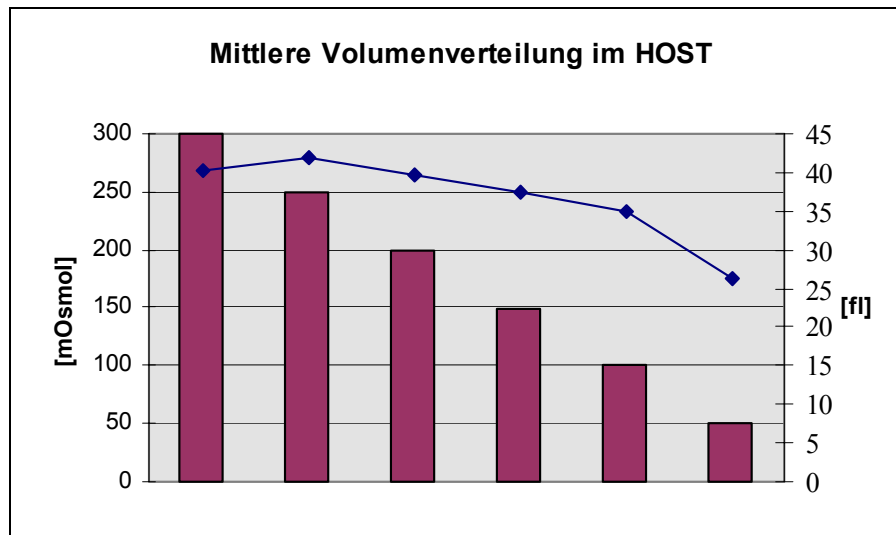


Abb. 6: Durchschnittliches Volumen der Samenzellen (Gesamtergebnis) unter isotoner (300 mOsmol) und hypotoner Belastung (250- 50 mOsmol)

Wie Abb. 6 zeigt, schwellen die Samenzellen im hypoosmotischen Medium bei 250 mOsmol an, bei weiterer Verringerung des Salzgehaltes im Umgebungsmedium nimmt das mittlere Zellvolumen als Folge des Flüssigkeitseintrittes in die Zelle und nachfolgendem Zerreißen der Membranen ab.

3.2.2.6 Integrität der akrosomalen Membranen unter Berücksichtigung der Jahreszeit

Die Ergebnisse der FITC-PSA/PI- Färbung an unverdünntem Rohsamen sind in Tabelle 21 und in Abbildung 7 dargestellt.

Tab. 21: Darstellung des Anteils akrosomreagierter membranintakter und -geschädigter Samenzellen im Rohsamen mit der FITC- PSA/PI- Färbung

	JULI	NOVEMBER	MÄRZ	GESAMT
Ejakulate (n)	69	65	56	190
\bar{X} FITC 1[%]	5,8^e	1,8^{a,f}	0,9^{b,f}	3,1
±SD	6,29	3,08	1,47	4,76
\bar{X} FITC 2[%]	49,0^e	53^a	59,2^{b,f}	53,4
±SD	14,74	18,89	16,88	17,29
\bar{X} FITC 3[%]	30,1^e	41,2^{e,f}	28,6^f	33,4
±SD	11,85	19,07	14,22	16,22
\bar{X} FITC 4[%]	14,8^{c,e}	3,9^{e,f}	11,1^{d,f}	10,0
±SD	9,55	5,14	8,60	9,21

Statistische Unterschiede in Zeilen a, b = $p \leq 0,05$; c, d = $p \leq 0,01$; e, f = $p \leq 0,001$

FITC 1 = akrosomreagiert, Membran erhalten

FITC 2 = nicht akrosomreagiert, Membran erhalten

FITC 3 = nicht akrosomreagiert, Membran nicht erhalten

FITC 4 = akrosomreagiert, Membran nicht erhalten

Der Anteil an FITC 1 gefärbten Samenzellen liegt im Juli mit 5,8 % gegenüber November mit 1,8 % und März mit 0,9 % signifikant ($p \leq 0,001$) höher. Der Unterschied von November zu März ist ebenfalls signifikant ($p \leq 0,05$). FITC 2 gefärbte Spermien sind im Juli mit 49 % im Ejakulat signifikant geringer vorhanden als im März mit 59,2 % ($p \leq 0,001$). Von November (53 %) zu März nehmen die FITC 2 gefärbten Zellen ebenfalls signifikant ($p \leq 0,05$) zu. Der Anteil an FITC 3 gefärbten Samenzellen liegt im November mit 41,2 % signifikant ($p \leq 0,001$) höher als im Juli (30,1 %) und März (28,6 %). FITC 4 gefärbte Spermien sind mit 14,8 % in den Juli- Ejakulaten am häufigsten vertreten und unterscheiden sich signifikant von den im November mit 3,9 % ($p \leq 0,001$) und März mit 1,1 % ($p \leq 0,01$) erhobenen Befunden. Der Anstieg der so gefärbten Samenzellen von November zum März ist signifikant ($p \leq 0,001$).

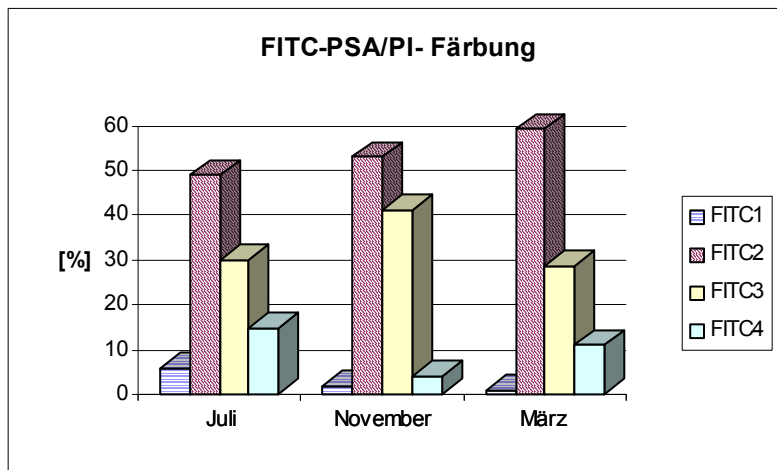


Abb. 7: Saisonale Unterschiede des Anteils akrosomreagerter membranintakter und geschädigter Samenzellen im Rohsamen

3.2.2.7 Auslösbarkeit der Akrosomreaktion unter Berücksichtigung der Jahreszeit

Nach Inkubation der Samenproben im Kapazitationsmedium wurde die Akrosomreaktion (AR) mit Heparin induziert. Die Auslösbarkeit der AR wurde mit Hilfe der FITC-PSA/PI Färbung untersucht (Tabelle 22 und Abbildung 8).

Tab. 24: Anteil der Spermien mit heparininduzierter Akrosomreaktion

	JULI	NOVEMBER	MÄRZ	GESAMT
Ejakulate (n)	69	65	56	190
\bar{X} FITCH 1 [%]	9,4 ^a	9,6	12,6 ^b	10,4
±SD	7,47	7,10	9,54	8,11
\bar{X} FITCH 2 [%]	24,8 ^e	22,9 ^c	16,9 ^{d,f}	21,8
±SD	13,94	15,49	11,34	14,11
\bar{X} FITCH 3 [%]	28,6	33,9 ^c	24,9 ^d	29,3
±SD	11,16	17,82	13,86	14,85
\bar{X} FITCH 4 [%]	37,1 ^e	33,4 ^e	45,3 ^f	38,3
±SD	12,67	17,40	14,99	15,78
\bar{X} Zuwachs AR [%]	25,9 ^e	37,2 ^{e,f}	45,9 ^f	35,7
±SD	12,77	18,87	19,47	18,89

Statistische Unterschiede in Zeilen

a, b = $p \leq 0,05$; c, d = $p \leq 0,01$; e, f = $p \leq 0,001$

FITCH 1 = akrosomreagiert, Membran erhalten

FITCH 2 = nicht akrosomreagiert, Membran erhalten

FITCH 3 = nicht akrosomreagiert, Membran nicht erhalten

FITCH 4 = akrosomreagiert, Membran nicht erhalten

Zuwachs AR = (FITCH 1 + FITCH 4) - (FITC 1 + FITC 4)

Nach Inkubation der Samenproben im modifizierten Tyrode- Medium und anschließender Induktion der Akrosomreaktion mit Heparin lag der Prozentsatz an FITCH 1 gefärbten Samenzellen mit 12,6 % im März signifikant ($p \leq 0,05$) über den 9,4 % im Juli. Mit fast 24,8 % im Juli ($p \leq 0,001$) und 22,9 % im November ($p \leq 0,01$) ist der Anteil FITCH 2 gefärbter Spermien gegenüber den 16,9 % im März statistisch signifikant höher. Die Samenzellen der Färbekategorie FITCH 3 sind im November mit 33,9 % gegenüber 24,9 % im März signifikant ($p \leq 0,01$) höher vertreten. Der Anteil an FITCH4 gefärbten Samenzellen ist im März mit 45,3 % im Vergleich zu Juli und November signifikant ($p \leq 0,001$) höher. Der Gesamtzuwachs an akrosomreagierten Samenzellen nach Inkubation im Kapazitationsmedium und Zugabe von Heparin nimmt von Juli zu November und von November zu März signifikant ($p \leq 0,001$) zu.

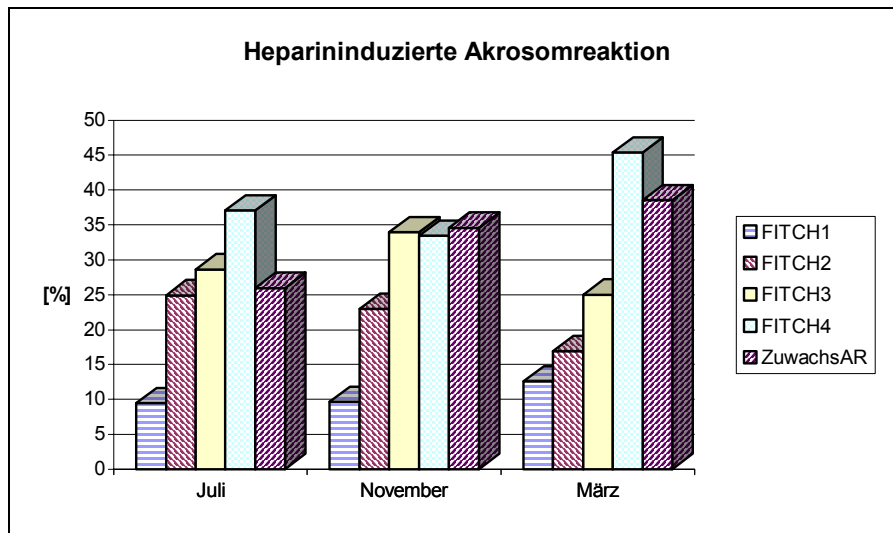


Abb. 8: Anteil akrosomreagierter Samenzellen nach Inkubation im Kapazitationsmedium und Induktion der Akrosomreaktion mit Heparin

3.2.2.8 Korrelation der Laboruntersuchungsergebnisse

In Tabelle 23 ist der Zusammenhang der Versuchsverfahren untereinander dargestellt. In der Tabelle ist der Korrelationskoeffizient nach Pearson angegeben.

Tab. 23: *Korrelation der Ergebnisse der Motilitätsanalyse, CFDA/PI- Färbung, HOST, FITC- PSA/PI- Färbung und Induzierbarkeit der Akrosomreaktion (Korrelationskoeffizient nach Pearson)*

	V 0	V 24	V 48	CFDA 1	CFDA 2	CFDA 3	CFDA 4	CFDA 5
V 0								
V 24	0,679 ^c							
V 48	0,467 ^c	0,747 ^c						
CFDA 1	0,017	-0,091	-0,049					
CFDA 2	0,394 ^c	0,372 ^c	0,376 ^b	0,042				
CFDA 3	-0,515 ^c	-0,030	-0,209 ^b	-0,032	-0,448 ^c			
CFDA 4	-0,013	-0,116	-0,177	-0,357 ^c	-0,569 ^c	-0,353 ^c		
CFDA 5	0,157 ^a	0,106	-0,006	-0,090	-0,232 ^b	-0,200 ^b	0,126	
HOST 300	0,038	0,069	0,011	0,017	0,155 ^a	-0,158 ^a	-0,026	-0,027
HOST 250	0,287 ^c	0,206 ^b	0,241 ^c	0,107	0,386 ^c	-0,345 ^c	-0,162 ^a	0,068
HOST 200	0,255 ^c	0,170 ^a	0,184 ^b	0,207 ^b	0,422 ^c	-0,214 ^b	-0,315 ^c	-0,043
HOST 150	0,279 ^c	0,203 ^b	0,255 ^c	0,224 ^b	0,462 ^c	-0,229 ^b	-0,327 ^c	-0,099
HOST 100	0,244 ^c	0,160 ^a	0,231 ^b	0,214 ^b	0,397 ^c	-0,173 ^a	-0,311 ^c	-0,088
HOST 50	0,025	0,001	0,078	0,137	0,214 ^b	-0,048	-0,186 ^a	-0,146 ^a
FITC 1	0,019	-0,021	0,055	0,471 ^c	0,154 ^a	-0,068	-0,276 ^c	-0,018
FITC 2	0,502 ^c	0,381 ^c	0,314 ^c	-0,066	0,492 ^c	-0,493 ^c	-0,054	0,038
FITC 3	-0,553 ^c	-0,412 ^c	-0,324 ^c	-0,119	-0,479 ^c	0,540 ^c	0,112	-0,143
FITC 4	0,025	0,021	-0,042	0,096	-0,155 ^a	0,004	0,046	0,189 ^a
FITC H1	0,322 ^c	0,237 ^b	0,127	-0,045	0,397 ^c	-0,318 ^c	-0,123	0,033
FITC H2	0,185 ^a	0,269 ^c	0,221 ^b	0,296 ^c	0,303 ^c	-0,100	-0,321 ^c	-0,021
FITC H3	-0,408 ^c	-0,301 ^c	-0,186 ^a	-0,013	-0,277 ^c	0,452 ^c	-0,050	-0,174 ^a
FITC H4	0,065	-0,080	-0,090	-0,227 ^b	-0,205 ^b	-0,172 ^a	0,389 ^c	0,161 ^a
Zuwachs AR	0,176 ^a	0,031	-0,012	-0,366 ^c	0,035	-0,261 ^c	0,313 ^c	0,059

a = $p \leq 0,05$ b = $p \leq 0,01$ c = $p \leq 0,001$

Fortsetzung Tab. 23

	HOST 300	HOST 250	HOST 200	HOST 150	HOST 100	HOST 50	FITC 1	FITC 2	FITC 3	FITC 4	FITC H1	FITC H2	FITC H3	FITC H4
V 0														
V 24														
V 48														
CFDA 1														
CFDA 2														
CFDA 3														
CFDA 4														
CFDA 5														
HOST 300														
HOST 250	0,553 ^c													
HOST 200	0,491 ^c	0,813 ^c												
HOST 150	0,422 ^c	0,807 ^c	0,900 ^c											
HOST 100	0,398 ^c	0,742 ^c	0,864 ^c	0,908 ^c										
HOST 50	0,225 ^b	0,411 ^c	0,526 ^c	0,602 ^c	0,619 ^c									
FITC 1	-0,072	0,128	0,242 ^c	0,245 ^c	0,266 ^c	0,293 ^c								
FITC 2	0,185 ^a	0,315 ^c	0,206 ^b	0,244 ^c	0,177 ^a	0,028	-0,203 ^b							
FITC 3	-0,143	-0,366 ^c	-0,338 ^c	-0,343 ^c	-0,271 ^c	-0,086	-0,205 ^b	-0,765 ^c						
FITC 4	-0,060	-0,019	0,076	0,010	-0,000	-0,059	0,265 ^c	-0,405 ^c	-0,211 ^b					
FITC H1	-0,034	0,116	0,118	0,083	0,052	0,007	0,245 ^c	0,211 ^b	-0,314 ^c	0,027				
FITC H2	0,302 ^c	0,222 ^b	0,287 ^c	0,293 ^c	0,270 ^c	0,127	-0,071	0,324 ^c	-0,223 ^b	-0,186 ^a	-0,121			
FITC H3	-0,119	-0,327 ^c	-0,236 ^b	-0,229 ^b	-0,205 ^b	-0,043	-0,096	-0,396 ^c	0,515 ^c	-0,105	-0,474 ^c	-0,225 ^b		
FITC H4	-0,156 ^a	0,042	-0,098	-0,089	-0,078	-0,088	0,034	-0,033	-0,115	0,251 ^c	0,046	-0,628 ^c	-0,484 ^c	
Zuwachs AR	-0,097	0,062	-0,129	-0,106	-0,110	-0,116	-0,248 ^c	0,320 ^c	-0,077	-0,332 ^c	0,397 ^c	-0,469 ^c	-0,532 ^c	0,723 ^c

a = $p \leq 0,05$ b = $p \leq 0,01$ c = $p < 0,001$

Die in der CFDA- Färbung membranintakten Samenzellen (CFDA 2) sind mit der Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen nach Samenentnahme, 24 und 48 Stunden positiv korreliert. Ferner besteht eine signifikant positive Korrelation zum Zellvolumen unter hypotoner Belastung. Zu den akrosomreagierten (FITC 1) und nicht akrosomreagierten (FITC 2) membranintakten Spermien der FITC- PSA- Färbung vor Inkubation mit Heparin besteht eine positive und zu den akrosomreagierten (FITC 4) und nicht akrosomreagierten (FITC 3) membrangeschädigten Spermien eine negative Korrelation. Nach der heparininduzierten Akrosomreaktion läßt sich eine signifikant positive Korrelation der membranintakten Zellen (CFDA 2) zu den membranintakten akrosomreagierten (FITCH 1) und nicht akrosomreagierten (FITCH 2) Samenzellen ableiten, sowie eine negative signifikante Korrelation zu den akrosomreagierten (FITCH 4) und nicht akrosomreagierten (FITCH 3) membrangeschädigten Samenzellen.

Der Anteil membrangeschädigter Samenzellen (CFDA 3) ist negativ korreliert mit den vorwärtsbeweglichen Spermien nach Samenentnahme, dem Zellvolumen bei 250 mOsmol, dem Anteil akrosomreagierter membranintakter Samenzellen vor (FITC 1) und nach Inkubation mit Heparin (FITCH1). Mit dem Anteil nicht akrosomreagierter membrangeschädigter Spermien vor und nach Inkubation mit Heparin (FITC 3; FITCH 3) besteht eine positive Korrelation.

Die Samenzellen mit erhaltener mitochondrialer Membran (CFDA 4) sind mit den Zellvolumen im hypotonen Medium von 250 bis 50 mOsmol und dem Anteil nicht akrosomreagierter membranintakter Samenzellen nach heparininduzierter Akrosomreaktion (FITCH 2) negativ korreliert. Positiv korrelieren diese mit den akrosomreagierten membrangeschädigten Samenzellen nach Heparininkubation und mit dem Zuwachs an akrosomreagierten Samenzellen insgesamt.

Der Prozentsatz der vorwärtsbeweglichen Spermien nach Samenentnahme (V 0), 24 (V 24) und 48 Stunden (V 48) ist positiv korreliert mit dem Zellvolumen der Spermien der hypotonen Verdünnungsstufen von 250 bis 100 mOsmol und den nicht akrosomreagierten membranintakten (FITC 2) und negativ korreliert mit den nicht akrosomreagierten membrangeschädigten Samenzellen (FITC 3) im Ejakulat vor Inkubation mit Heparin. Ferner besteht eine positive signifikante Korrelation der vorwärtsmotilen Spermien nach Samenentnahme (V 0) mit dem Anteil akrosomreagierter membranintakter Samenzellen (FITCH 1) nach Heparingabe. Eine negative Korrelation besteht zwischen den vorwärtsbeweglichen Samenzellen nach Entnahme (V 0) und nach 24 Stunden (V 24) und den nach Heparinzusatz nicht akrosomreagierten membrangeschädigten Spermien (FITCH 3).

Das Zellvolumen der Spermien im isoosmotischen Medium ist positiv mit dem Anteil nicht akrosomreagierte membranintakter Samenzellen (FITC 2) nach Heparinzusatz korreliert. Die Volumenzunahme bei 250 mOsmol weist eine positive Korrelation zum Anteil nicht akrosomreagierte membranintakter Spermien (FITC 2) und eine negative Korrelation zu den nach Heparinabgabe membrangeschädigten nicht akrosomreagierten Samenzellen (FITC 3) auf. Das mittlere Zellvolumen der hypotonen Verdünnungsstufen 250 bis 100 mOsmol ist negativ korreliert mit den nicht akrosomreagierten membrangeschädigten Spermien (FITC 3) vor Inkubation im Kapazitationsmedium.

Der Anteil nicht akrosomreagierte membranintakter Samenzellen (FITC 2) vor Inkubation im Kapazitationsmedium korreliert positiv mit dem Zuwachs an akrosomreagierten Samenzellen nach Heparininduktion.

3.2.2.9 Korrelation der Laboruntersuchungsergebnisse mit der Fertilität

In Tabelle 24 sind die im Juli, November und März erzielten Laboruntersuchungsergebnisse in Beziehung zur Fertilität aufgeführt.

Tab. 24: Korrelation der Laboruntersuchungsergebnisse mit der Befruchtungs- und Abfohlrate unter Berücksichtigung der Jahreszeit (Korrelationskoeffizient nach Pearson)

	JULI		NOVEMBER		MÄRZ		GESAMT	
Ejakulate (n)	69		65		56		190	
	Be-frucht%	Ab-fohl%	Be-frucht%	Abfohl %	Be-frucht%	Abfohl %	Befrucht %	Ab-fohl%
V 0	0,231 ^a	0,195	0,163	0,059	0,231	0,177	0,302^b	0,201
V 24	0,258 ^a	0,154	-0,102	-0,123	0,2	0,231	0,205	0,119
V 48	0,02	-0,018	0,159	0,134	0,107	0,141	0,113	0,095
CFDA 1	-0,093	-0,026	0,156	0,109	-0,129	-0,065	-0,088	-0,019
CFDA 2	0,042	-0,055	0,163	0,166	0,284 ^a	0,305 ^a	0,212	0,185
CFDA 3	0,038	0,071	-0,235	-0,191	-0,035	0,031	-0,150	-0,066
CFDA 4	-0,010	0,036	0,040	0,004	0,029	-0,139	0,057	-0,043
CFDA 5	-0,035	-0,038	0,047	0,005	-0,180	-0,257	-0,031	-0,108
250/300	0,181	0,169	0,400 ^b	0,310 ^a	0,215	0,237	0,260^a	0,234^a
200/300	0,251 ^a	0,233 ^a	0,445 ^c	0,371 ^b	0,025	0,052	0,215	0,202
150/300	0,250 ^a	0,236 ^a	0,418 ^c	0,368 ^b	0,051	0,087	0,233^a	0,227
100/300	0,270 ^a	0,262 ^a	0,382 ^b	0,316 ^a	-0,011	0,024	0,212	0,202
50/300	0,251 ^a	0,276 ^a	0,144	0,186	-0,071	-0,061	0,119	0,152
FITC 1	-0,172	-0,106	-0,207	-0,173	-0,385 ^b	-0,383 ^b	-0,318^b	-0,230^a
FITC 2	0,115	0,051	0,358 ^b	0,319 ^a	0,301 ^a	0,356 ^b	0,373^b	0,335^b
FITC 3	-0,156	-0,159	-0,333 ^b	-0,303 ^a	-0,151	-0,218	-0,301^b	-0,299^a
FITC 4	0,131	0,191	0,01	0,02	-0,289 ^a	-0,287 ^a	-0,05	-0,011
FITCH 1	0,131	0,191	0,127	0,085	0,134	0,089	0,155	0,171
FITCH 2	0,053	0,002	0,079	0,057	0,226	0,258 ^a	0,153	0,126
FITCH 3	-0,224	-0,211	-0,303 ^a	-0,273 ^a	-0,288 ^a	-0,279 ^a	-0,404^b	-0,360^b
FITCH 4	0,038	0,121	0,184	0,193	0,004	-0,05	0,16	0,175
Zuw. AR	0,097	0,071	0,234	0,203	0,258	0,154	0,324^b	0,233^a

a = $p \leq 0,05$ b = $p \leq 0,01$ c = $p \leq 0,001$

Fettdruck: Signifikante Werte aller Ejakulate zur Befruchtungs- und Abfohlrate

Unter Berücksichtigung aller Ejakulate aus Juli, November und März korreliert der Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien direkt nach Samengewinnung (V 0) signifikant positiv mit der Befruchtungsrate ($p \leq 0,01$). Der Anteil an membranintakten akrosomreagierten

Samenzellen (FITC 1) ist signifikant negativ mit der Befruchtungs- ($p \leq 0,01$) und mit der Abfohlrate ($p \leq 0,05$) korreliert. Der Anteil membranintakter nicht akrosomreagierte Spermien (FITC 2) vor Heparininduktion korreliert signifikant positiv mit beiden Fertilitätsparametern ($p \leq 0,01$). Der Anteil an membrangeschädigten Spermien (FITC 3) vor Induktion der Akrosomreaktion ist signifikant negativ mit den Befruchtungs- ($p \leq 0,01$) und Abfohlresultaten ($p \leq 0,05$) korreliert. Die membrangeschädigten nicht akrosomreagierten Spermien (FITC 3) nach Heparinbehandlung sind negativ mit der Befruchtungsrate und dem Abfohlhundertatz korreliert ($p \leq 0,01$). Die Gesamtzunahme an akrosomreagierten Samenzellen nach Auslösung der Akrosomreaktion ist positiv korreliert mit der Befruchtungsrate ($p \leq 0,01$) und der Abfohlrate ($p \leq 0,05$). Der Volumenquotient (Volumen iso/Volumen hypo) bei dem 250 mOsmol konzentrierten Medium korreliert signifikant positiv mit der Befruchtungs- und Abfohlrate ($p \leq 0,05$).

Die Volumenquotienten bei dem 150 mOsmol konzentrierten Medium korreliert signifikant mit dem Befruchtungshundertatz ($p \leq 0,05$).

4. Diskussion

Die im Teil I durchgeführte Auswertung der Samenaufbereitungsprotokolle des Niedersächsischen Landgestütes Celle der Zuchtsaison 1999 mit insgesamt 7655 Einzelejakulaten bietet eine aussagekräftige Basis für den statistischen Vergleich der in den Protokollen erhobenen Parameter Volumen, Samenzellkonzentration, Gesamtspermienzahl, Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach Samenentnahme und nach 24 Stunden Lagerung bei +5°C. Diese wurden mit den Fruchtbarkeitsdaten der betreffenden Hengste verglichen.

Im Teil II sollte anhand etablierter sowie neuerer Samenuntersuchungsmethoden eine Aussage über die Beziehung der Testverfahren zur Fertilisierungsfähigkeit von Hengsten gemacht werden. Dabei wurden verschiedene Samenuntersuchungsmethoden an einem Ejakulat durchgeführt und einander gegenübergestellt werden. Ferner sollten die erzielten Ergebnisse daraufhin geprüft werden, im Zuge einer Zuchttauglichkeitsuntersuchung zur Einschätzung der Fertilisierungsfähigkeit eines Hengstes verwendet werden zu können. Um die Fertilität eines Hengstes zu bewerten, wurden in dieser Arbeit sowohl die Befruchtungsraten als auch die Zahl der geborenen Fohlen für den betreffenden Hengst herangezogen.

Teil I: Retrospektive Analyse spermatologischer Daten während der Zuchtsaison

Der Einfluß des Alters auf die Fertilität eines Hengstes konnte für die Befruchtungsraten aufgezeigt werden. Die im Besamungseinsatz stehenden Hengste hatten ein durchschnittliches Alter von 10 Jahren, welches eine signifikante Beziehung zur Befruchtungs- und Abfohlungsrate zeigt. Nach Einteilung der Landbeschäler in Altersgruppen und Korrelation mit den Fertilitätsparametern konnte ein negativer Zusammenhang zur Befruchtungsraten hergestellt werden. Entsprechend wiesen CLEMENT et al. (1991) ein Absinken der Befruchtungs- und Abfohlergebnisse bei Hengsten ab einem Alter von 15 Jahren nach. GUSMAO (1988) machte hierfür eine Verminderung des Transport- und Transformationsystems des Testosteron im Hoden zum tubulären und testikulären Parenchym verantwortlich.

Die Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten hat einen erheblichen Einfluß auf die Fertilität der Hengste. So liegen die Befruchtungsraten der Hengste mit über 200 zugeführten Stuten mit über 80 % deutlich höher als die der Gruppe mit unter 20 Stuten, welche lediglich ein Befruchtungsergebnis von etwas über 60 % erreicht.

Bezüglich der Abfohlungsrate läßt sich der gleiche Zusammenhang erstellen, wobei Hengste mit weniger als 20 Stuten ein Abfohlergebnis von 54 % haben, die Gruppe der Hengste mit mehr als 200 zugeführten Stuten hingegen eine Abfohlrate von durchschnittlich 72 % erreichen. PICKETT und VOSS (1999) stellten bei Deckhengsten und deren Abfohlergebnissen einen Anstieg der Abfohlergebnisse bei 100 gedeckten Stuten pro Hengst fest; höhere Stutenzahlen waren mit einer Abnahme des Abfohlhundertsatzes gekoppelt. Da die in dieser Arbeit untersuchten Hengste in der künstlichen Besamung eingesetzt wurden, kann, die Stutenzahl auf den einzelnen Hengst durchaus erhöht werden. Im Besamungseinsatz werden stark frequentierte Hengste mit Auflagen bedacht, so daß nur vorselektierte Stuten eine Zulassung zu solch einem Hengst erhalten. Darüber hinaus wird durch möglichst ovulationsnahe Besamungen eine bessere Konzeptionschance geschaffen (SIEME et al. 1999).

Beziehung der Ejakulatparameter auf die Befruchtungs- und Abfohlrate

Zwischen den quantitativen Ejakulatparametern (Volumen, Samenzellkonzentration, Gesamtspermienzahl) und der Befruchtungs- und Abfohlrate waren keine Zusammenhänge erkennbar. Der Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien im Ejakulat direkt nach der Samenentnahme zeigte, im Gegensatz zu den Angaben von JASKO et al. (1992), in der retrospektiven Analyse der Zuchtsaison 1999 keinen Einfluß auf die Fertilität. Der Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien nach 24 Stunden bei +5°C ist mit der Befruchtungsrate positiv korreliert. Da im Rahmen der Pferdebesamung die Frischsamenübertragung und zunehmend der Samenversand überwiegt, ist die Erhaltung der Spermabeschaffenheit von ausschlaggebender Bedeutung für die Befruchtungsleistung der Hengste. Untersuchungen von VIDAMENT et al. (1999) ergaben eine signifikante Beziehung zwischen der nach 24 und 48 Stunden gemessenen Motilität und der Trächtigkeitsrate pro Zyklus.

Beziehungen der Ejakulatparameter untereinander

Die quantitativen Ejakulatparameter weisen die übliche Korrelation untereinander auf. So bedingen das Volumen und die Samenzellkonzentration pro ml die Gesamtspermienzahl des Ejakulates, wobei das Ejakulatvolumen des Samens mit der Dichte negativ korreliert ist. Volumen und Samendichte sind positiv mit der Gesamtspermienzahl korreliert. Eine hohe Ausgangsmotilität im Samen bedingt auch eine gute Haltbarkeit der Samenzellen nach 24 Stunden.

Die Bewertung der intra- und interindividuellen Schwankungen der Ejakulatparameter zeigt zum Teil erhebliche Variationen zwischen den Hengsten auf, wenngleich die intraindividuelle Streuung eines Merkmals recht gering ausfällt. Vor allem Unterschiede im Management der einzelnen Hengste schlagen innerhalb der quantitativen Ejakulatparameter zu Buche. Wird ein Hengst wegen geringerer Nachfrage seltener abgesamt, so werden das Volumen, die Dichte und die Gesamtspermienzahl höher ausfallen, als wenn der Hengst jeden Tag oder öfter im Deckeinsatz gewesen wäre (DOWSETT u. PATTIE, 1987).

Die Anfangsmotilität der Samenzellen liegt intraindividuell in einem Streuungsbereich zwischen 2,7 und 22 % und fällt damit relativ konstant aus.

Der Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen nach 24 Stunden bei +5°C streut intraindividuell beträchtlich und zwar von etwa 4 % bis über 580 %. Das mag zum einen darin begründet sein, daß sich initiale Faktoren bei der Samengewinnung (Kühlung, Lagerung) nicht sofort, sondern erst in der Haltbarkeit des Samens bemerkbar machen.

Die Betrachtung der quantitativen Ejakulatparameter über die Monate der Decksaison hinweg läßt saisonale Unterschiede erkennbar werden. So sind die Ejakulate am Anfang der Saison im interindividuellen Vergleich gegenüber den Folgemonaten im Volumen geringer, in der Dichte und der Gesamtspermienzahl aber signifikant höher.

Das Schwankungsmaß fällt intraindividuell nicht so groß aus wie die Streuung innerhalb der Hengstpopulation. Die Unterschiede in der Anfangsmotilität sind ebenfalls sehr gering. Das Streuungsmaß der 24- Stunden- Motilität ist noch weitaus geringer, wenngleich es eine signifikante Abnahme der Haltbarkeit von Februar bis Mai gibt. Danach steigt der Anteil an vorwärtsmotilen Samenzellen nach 24 Stunden wieder an.

Da die Unterschiede der Ejakulatparameter eines Hengstes von einer Samengewinnung zur nächsten, vor allem nach einer längeren Deckruhe, höher ausfallen kann, sollten zur Bewertung der Fertilität eines Hengstes, der die Mindestanforderungen in einem Merkmal nicht erfüllt, weitere Ejakulate in regelmäßigen Abständen gewonnen werden, um eine Fehleinschätzung seines Fertilisierungsvermögens zu vermeiden (PATTIE u. DOWSETT, 1982).

Um den Einfluß des Sexualverhaltens auf die Ejakulatparameter herauszustellen, wurden die Ejakulate aller Hengste nach den für die Samengewinnung notwendigen Aufsprüngen auf das Phantom ausgewertet. Bezüglich des Volumens zeigt sich eine deutliche Zunahme, je häufiger aufgesprungen wurde. Entsprechend nimmt die Samenzellkonzentration pro ml

im gleichen Rahmen ab, die Gesamtspermienzahl nimmt insgesamt mit den Aufsprüngen in leichtem Umfang zu. Die Anfangsmotilität bleibt im Gegensatz zur Motilität nach 24 Stunden, welche mit zunehmenden Aufsprungversuchen signifikant abnimmt, gleich. Die Volumenzunahme resultiert vor allem aus einer Zunahme an Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, welche sich negativ auf die Überlebenszeit der Samenzellen auswirken (JASKO et al., 1992). Hier zeigt sich, wie sich ein hengsteigenes Verhaltensmuster auf die Samenbeschaffenheit auswirken kann. Aber auch ein falscher Umgang mit einem Hengst während der Samenentnahme kann zu Einbußen in der Samenqualität führen und damit zu Lasten der Fruchtbarkeit des Hengstes gehen.

Die Schwankungen von Volumen, Dichte, Gesamtspermienzahl und Motilität beruhen hauptsächlich auf individuellen Eigenschaften eines Hengstes (zu mindestens 90 %). Festzustellen ist, daß sich diese Eigenschaften einzelner Hengste negativ auf die Haltbarkeit des Samens auswirkt. Somit ist es von großer Bedeutung, das Ejakulat nach adäquater Vorbereitung des Hengstes beim ersten Aufsprung zu gewinnen, um eine Qualitätsminderung des Samens durch wiederholte Aufsprünge möglichst gering zu halten (SIEME et al. 2000).

Des weiteren wurde überprüft, inwieweit sich die Samenentnahmefrequenz und das Samenentnahmeintervall der Hengste auf deren Befruchtungsleistung auswirkt. Im Durchschnitt aller Hengste liegt die Samenentnahmefrequenz bei 0,82 Samenentnahmen pro Tag, und das Samenentnahmeintervall bei 1,4 Tagen. Sowohl die Samenentnahmefrequenz als auch das Samenentnahmeintervall steht in signifikantem Zusammenhang mit der Anzahl geborener Fohlen. Die Hengste mit einer Samenentnahmefrequenz ≥ 1 pro Tag hatten gegenüber denjenigen mit $< 0,5$ Samenentnahmen am Tag einen signifikant höheren Abfohlhundertatz. Ebenso stellt sich der Bezug zum Samenentnahmeintervall dar, so daß die regelmäßige tägliche Samengewinnung ohne längere Deckruhe signifikant höhere Abfohl-ergebnisse nach sich zieht.

Teil II: Spermabiologische Funktionsprüfung bei Hengsten unter Berücksichtigung saisonaler Effekte und der Fertilität

Der experimentelle Teil umfaßte die Untersuchungen der Spermienmotilität sowie die Analyse der Spermienfunktion (Membranintegrität, hypoosmotischen Belastbarkeit und Induzierbarkeit und fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Akrosomreaktion).

Die beschriebenen Verfahren wurden an je einem im Juli und November 2000 und März 2001 angewandt.

Anhand einer ausreichend großen Hengstzahl sollten diese Untersuchungsverfahren gegeneinander verglichen werden und die Aussagefähigkeit der Ergebnisse für die Fertilitätsprognose geprüft werden. Ferner galt es, ein saisonales Profil der Ejakulatbeschaffenheit zu drei verschiedenen Untersuchungszeitpunkten herauszustellen.

Der Einfluß des Alters und der Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten auf die Fruchtbarkeitsleistung der Hengste ist statistisch signifikant. Das Alter ist, wie auch in Teil I beschrieben, negativ mit der Befruchtungsrate korreliert. und es besteht eine positive Korrelation zwischen der Stutenzahl pro Hengst und der Befruchtungs- und Abfohrate besteht eine positive Korrelation.

Bei Betrachtung der quantitativen Ejakulatparameter unter Berücksichtigung der Saison sind signifikante Unterschiede festzustellen. Das Volumen nimmt von Juli zu November und zum März kontinuierlich ab, wohingegen die Samenzellkonzentration und die Gesamtspermienzahl zur Zeit der Deckruhe (November) am höchsten ist. Letztgenannte Parameter fallen zum März signifikant ab, um zum Ende der Saison (Juli) wieder anzusteigen. Untersuchungen von DOWSETT und PATTIE (1987) bestätigen diese saisonalen Schwankungen der Samencharakteristika. Der Grund dafür ist zum einen in der steigenden sexuellen Inanspruchnahme am Beginn der Zuchtsaison zu suchen, welche zu einer Erhöhung des Ejakulatvolumens bei gleichzeitiger Verringerung der Samendichte führt. Zum anderen wird bei steigender Lichtkurve im Frühjahr die Zeit der physiologischen Deckruhe durch die Freisetzung der Geschlechtshormone unterbrochen, worauf die akzessorischen Geschlechtsdrüsen mit stärkerer Sekretion reagieren, was ebenfalls zur Volumenzunahme bei gleichzeitigem Absinken der Samendichte führt.

Die Reproduktionsfunktionen der Hengste unterliegen einer annualen Rhythmik. Mit zunehmender Tageslänge beginnt beim Pferd die Paarungssaison. PICKETT (1993) konnte Änderungen der quantitativen Ejakulatparameter durch Lichtprogramme reproduzieren. Wurden die Helligkeitsphasen im Winter verlängert, so konnten für das Volumen, die Dichte und die Gesamtspermienzahl die gleichen Eigenschaften beobachtet werden, wie im Frühjahr.

Die computergestützte Motilitätsanalyse ermöglicht eine objektive Beurteilung der Vorwärtsmotilität der Spermien unter Berücksichtigung der Jahreszeit. Die Samenproben wurden für die Konservierung auf eine Konzentration von 50 Millionen Samenzellen pro

Milliliter verdünnt. Die Lagerung der Spermaproben über 48 Stunden bei +5°C führte bei allen Hengsten zu einem deutlich fortschreitenden Motilitätsverlust. Betrug die Vorwärtsmotilität nach Samenentnahme im Mittel 61 %, wiesen die 24- Stunden Halteproben eine Durchschnittsbeweglichkeit von 41,2 % auf, und die 48- Stundenmotilität betrug 22,5 %.

Die höchsten Motilitätswerte direkt nach Samenentnahme als auch nach 24 und 48 Stunden wurden im März, die geringsten im November beobachtet. Letztere lagen signifikant unter den März- und Juliproben. Hier ist ein deutlicher saisonaler Effekt aufzuzeigen, wobei die Motilität zu Beginn der Besamungssaison (März) die höchsten und in Zeiten der Deckruhe die geringsten Werte aufweist. HOFFMANN und LANDECK (1999) bestätigen dieses Ergebnis und machen hierfür die jahreszeitliche Abhängigkeit der Testosteron- und Östrogenkonzentrationen im Blut verantwortlich, welche besonders die Funktionen der Nebenhoden und der akzessorischen Geschlechtsdrüsen steuern und folglich auch die Motilität beeinflussen. PICKETT (1993) fand weder eine saisonale Beeinflussung der Spermienmotilität, noch konnte er durch ein künstliches Lichtmanagement eine Änderung in der Motilität bewirken.

Zur Beurteilung der Spermiovitalität und -membranintegrität bietet die Carboxyfluoreszeindiazetat- Propidiumiodid- Färbung eine sichere und zudem schnelle Methode (GARNER et al 1986). Bei den eigenen Versuchen waren seitens der lebenden membranintakten Spermien keine signifikanten saisonalen Unterschiede herauszustellen, wohl aber eine signifikante Zunahme der Samenzellen mit einem Membrandefekt im Kopfbereich bei membranintaktem Mittelstück von Juli zu November sowie November zu März.

Auch der Anteil an Spermien mit intakten Akrosommembranen nimmt von Juli bis März von fast 9 % auf unter 1 % signifikant ab. Der Anteil an Spermien mit geschädigter Membran zeigt im März gegenüber Juli und November den geringsten Wert. Festzuhalten ist der im Juli, November und März nahezu konstante Anteil von membranintakten Spermien, welcher zu allen Untersuchungszeitpunkten die Befruchtungsfähigkeit der Ejakulate sichert.

Der hypoosmotische Schwelltest (HOST) ermöglicht eine Aussage über die Volumenregulation der Samenzellen sowohl im isoosmotischen Bereich als auch unter hypoosmotischer Belastung. Die Volumenänderung der Zelle im HOST weist auf das Bestehen einer funktionstüchtigen Zellmembran hin (JEYENDRAN et al. 1984; TAKAHASHI et al. 1990).

Ein saisonaler Unterschied in der Zellgrößenverteilung unter isoosmotischen Bedingungen lag nicht vor. Unter hypotonen Verdünnungen (250 bis 50 mOsmol) erwies sich das

Schwellvolumen im Juli im Vergleich zu November bei allen Osmolaritäten mit Ausnahme von 50 mOsmol als signifikant höher. Im März war die Fähigkeit zur Volumenregulation am größten.

Nach Feststellung des akrosomalen Status der Spermien im Rohsamen wurde nach einer Kapazitation mit Heparin die Akrosomreaktion ausgelöst. Das Heparin simuliert den Kontakt der Samenzelle mit Bestandteilen des weiblichen Genitaltraktes oder der Zona pellucida. Dort werden die Membranen der Samenzelle durch Glucoaminoglykane destabilisiert und damit einem entsprechenden Stimulus zur Auslösung der Akrosomreaktion zugänglich gemacht. Heparinbindende Proteine des Seminalplasmas scheinen in diesem Zusammenhang eine regulative Funktion zu übernehmen (TÖPFER- PETERSEN et al. 1995). An den drei Untersuchungszeitpunkten sind die Anteile an Spermien mit spontaner Akrosomreaktion im Rohsamen unterschiedlich. So liegen im Juli fast 6 % der Samenzellen im Nativsamen akrosomreagiert vor, im März nur etwa 1 %. Der Anteil an membranintakten nicht akrosomreagierten Spermien ist im Juli mit knapp 50 % signifikant geringer als im März mit fast 60 %. Membrangeschädigte nicht akrosomreagierte Spermien finden sich mit fast 40 % im November signifikant mehr als zu den anderen Untersuchungszeitpunkten. Der Anteil membrangeschädigter akrosomreagierte Samenzellen ist im Juli mit fast 15 % signifikant höher als im März mit 11 % und im November mit nur 4 % am niedrigsten.

Nach Inkubation der Samenproben im Kapazitationsmedium und Induktion der Akrosomreaktion mit Heparin liegt der Anteil akrosomreagierte Samenzellen im Juli und November bei etwa 10 %, im März bei fast 13 %. Der Prozentsatz der membranintakten nicht akrosomreagierten Samenzellen nach Heparingabe liegt im März mit ca. 17 % signifikant unter dem Juliwert mit 25 % und dem Novemberwert mit 23 %. Wie im Rohsamen, liegt der Anteil an membrangeschädigten Samenzellen im November mit 33 % signifikant über den im Juli und März erzielten Werten. Der Gesamtzuwachs an akrosomreagierten Spermien nach Heparingabe liegt im März mit fast 45,9 % gegenüber November mit 37,3 % und Juli mit 25,9 % signifikant höher.

Die Korrelationsanalyse mit den verschiedenen Verfahren erzielten Ergebnisse zeigt, daß der Anteil an vorwärtsbeweglichen Samenzellen mit dem Schwellvermögen der Spermien im hypotonen Medium positiv korreliert, was sich mit den Erkenntnissen von JEYENDRAN et al. (1984) an humanen Spermien deckt. Andere Untersuchungen bei Hengsten belegen eine positive Korrelation zwischen dem Schwellvermögen von Frisch-

samen im HOST und dessen Motilität in aufgetautem Gefriersamen (MAGISTRINI et al. 1997). Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien korreliert positiv mit den membranintakten Spermien in der CFDA/ PI- Färbung. MALMGREN (1997) fand einen positiven Zusammenhang zwischen dem Anteil membranintakter Samenzellen in der Calcein/ Ethidium Homodimer- Färbung und dem Gesamtanteil motiler Spermien.

Des Weiteren besteht ein positiver Zusammenhang zwischen der Vorwärtsmotilität in frisch gewonnenem Sperma und nach 24 Stunden mit dem Anteil an membranintakten akrosomreagierten Spermien nach Heparingabe. Darüberhinaus ist die Anfangsmotilität mit dem Zuwachs an akrosomreagierten Samenzellen positiv korreliert.

Die membranintakten Spermien in der FITC- PSA/PI- Färbung korrelieren positiv mit dem Schwellvermögen der Spermien im HOST.

Diese Beziehungen belegen einen Zusammenhang zwischen der Motilität, der Membranintegrität und der Volumenregulationsfähigkeit der Spermischwanzmembran. ROGERS und PARKER (1991) fanden anhand ihrer Untersuchungen an humanen Samenzellen eine signifikante Korrelation zwischen dem Schwellvermögen und dem heterologen Penetrationstest an zonafreien Hamsteroozyten. Als Grund hierfür ist die Integrität der Membranen anzugeben, welche Voraussetzung für ein gutes Schwellvermögen und die Spermien-Oozyten- Interaktion ist. Dagegen postulieren ENGLAND und PLUMMER (1993) für Hundespermien keine Zusammenhänge zwischen der Schwellfähigkeit der Spermienmembranen (HOST) einerseits und der Motilität und morphologischer Membranintegrität andererseits.

Beziehungen der untersuchten Laborparameter zur Fertilität (Befruchtungs- und Abfohlhundertatz)

Der Anteil an vorwärtsmotilen Spermien direkt nach der Samenentnahme korreliert signifikant mit der Befruchtungsrate und bestätigt Untersuchungen von SAMPER et al. (1991), die eine positive Korrelation zwischen der Vorwärtsmotilität in Frischsamen und der Fruchtbarkeit von Hengsten nachwies. JASKO et al. (1992) sprechen diesem Parameter die höchste Aussagefähigkeit für die Fruchtbarkeit von Hengsten zu.

Ein hoher Anteil an spontan akrosomreagierten membranintakten Samenzellen im Rohsamen korreliert negativ mit der Befruchtungs- und Abfohlrate. Nach Ansicht von CUMMINS et al. (1991) ist nur die induzierte Akrosomreaktion für die Penetration der Eihüllen und die Befruchtung verantwortlich. Eine vorzeitige spontane Akrosomreaktion stellt hingegen einen vorzeitigen Verlust der Kopfkappe dar. Daher werden die im Rohsa-

men auftretenden akrosomreagierten Samenzellen als ungünstig angesehen, da sie das Kontingent befruchtungskompetenter Samenzellen vermindern (TESARIK 1989).

Entsprechend besteht ein positiver Zusammenhang zwischen dem Anteil an nicht akrosomreagierten membranintakten Samenzellen im Rohsamen und der Befruchtungs- und Abfohlrate. Die Spermien sind in der Lage, auf einen von der Zona pellucida ausgehenden Stimulus mit den zur Freisetzung der akrosomalen Enzyme erforderlichen Membranveränderungen zu reagieren.

Eine negative Korrelation besteht zwischen dem Anteil an nicht akrosomreagierten membrandefekten Samenzellen vor und nach der Induktion mit Heparin und der Fertilität. Da diese Zellen einen Membrandefekt im Kopfbereich zeigen, fallen sie für die Fertilisierung aus.

Der Gesamtzuwachs an akrosomreagierten Spermien korreliert signifikant mit dem Befruchtungshundertsatz und der Abfohlrate. VARNER et al. (2000) stellten bei vier Hengsten mit idiopathischer Infertilität fest, daß bei nur 20 % der Spermien die Akrosomreaktion induzierbar war, während dies in Ejakulaten fertiler Hengste bei über 80 % der Spermien der Fall war.

Für die Korrelierung der Ergebnisse des HOST mit der Fertilität wurden Volumenquotienten aus hypoton und isoton gebildet, welches eine Betrachtung eines sich ändernden Wertes unter Berücksichtigung des Ausgangswertes erlaubt.

Die Fähigkeit der Samenzellen, im hypoosmotischen Medium bei 200 mOsmol anzuschwellen, korreliert mit dem Befruchtungs- und Abfohlungshundertsatz. Die Volumenzunahme bei 150 mOsmol ist signifikant mit der Befruchtungsrate korreliert. Da es bei der Samenzelle im hypotonen Medium zu einem Wasserinflux im Geißelkompartiment kommt, nimmt das Volumen des Spermiums zu. Abhängig von der Elastizität der Zellmembran, fällt das Maß der Schwellung stärker oder schwächer aus. Da die Samenzellen in einer hypotonen Lösung von 250 mOsmol im Durchschnitt aller Hengste und Untersuchungszeitpunkte mit einer Volumenzunahme reagieren, stellt diese hypotone Belastung noch keine kritische Größe für die Membranen dar. Bei weiterer Verdünnung kommt es infolge eines stärkeren Wassereinstromes zu ersten Membranschäden, was sich in der Abnahme des durchschnittlichen Volumens widerspiegelt. Ein hoher Volumenquotienten steht für eine funktionell intakte Geißelmembran. Aufgrund einer positiven Korrelation der hypotonen Belastbarkeit der Membranen der einzelnen Zellkompartimente

(PETRUNKINA et al. 2000), repräsentieren die Volumenquotienten der 200 und 150 mOsmol- Stufen membranintakte Spermien, deren Anteil mit der Fruchtbarkeit korreliert.

Schlußbetrachtung

In dieser Arbeit sollte anhand einer retrospektiven Analyse der Samenuntersuchungsprotokolle geprüft werden, wie sich samenbiologische Parameter zueinander verhalten, inwiefern sie über den Zeitraum der Zuchtsaison etwaigen Schwankungen unterliegen und inwieweit sich das Hengstmanagement (Samenentnahmefrequenz, Samenentnahmeintervall, Sexualverhalten) auf die quantitativen und qualitativen Ejakulatparameter und somit auch auf die Befruchtungsleistung der Hengste auswirken. Des weiteren sollten die angewandten Untersuchungsverfahren bezüglich ihrer Aussagefähigkeit über die Fertilität geprüft werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß sich Fehler im Management auf die Samenbeschaffenheit auswirken können, und zu einer Herabsetzung der Fruchtbarkeitsleistung der Hengste führen können. Die Beurteilung der Fertilität eines Hengstes anhand der Ejakulatparameter ist wegen saisonaler Schwankungen nur eingeschränkt möglich, so daß gewöhnlich mehr als ein Ejakulat zu untersuchen ist. Für die Prognose der Befruchtungspotenz eines Hengstes eignen sich neben der Motilitätsanalyse vor allem Testverfahren zur Prüfung der Membranstabilität und -funktion. Die Integrität der Membranen und insbesondere die Fähigkeit der Samenzellen zur Akrosomreaktion sind mit der Fertilität positiv korreliert. Die Etablierung dieser spezifisch auf die Spermienfunktion abzielenden Untersuchungsverfahren kombiniert mit einem perfekten Hengstmanagement wird die Identifizierung subfertiler Hengste verbessern.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand einer genügend großen Stichprobe von Hengsten eine Aussage über die Beziehung spermabiologischer Parameter zur Fertilisierungsfähigkeit treffen zu können. Desweiteren sollten etablierte samenbiologische Untersuchungsverfahren zueinander in Beziehung gesetzt und deren Aussagefähigkeit zur Fruchtbarkeit geprüft werden. Mit drei Untersuchungen im Jahr sollte bezüglich der Ejakulatparameter ein saisonales Profil erstellt werden.

Bei der retrospektiven Betrachtung der spermatologischen Daten (Volumen, Dichte, Gesamtspermienzahl, Vorwärtsmotilität direkt nach Samengewinnung und nach 24 stündiger Lagerung bei +5°C) der Zuchtseason 1999 von 71 Hengsten galt es herauszufinden, ob diese mit der Fertilität der Hengste in Zusammenhang stehen, sich gegenseitig beeinflussen und inwiefern sie intra- und interindividuell über die Saison streuen. Die Beobachtungen wurden dahingehend untersucht, wie stark sich das Sexualverhalten der Hengste, das Alter, die Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten, die Samenentnahmefrequenz und das Samenentnahmeintervall auf die Sameneigenschaft und die Fruchtbarkeitsleistung der Hengste auswirkt. Der experimentelle Teil umfaßte neben den Ejakulatparametern Untersuchungen zur Spermienmotilität und der Haltbarkeit des Samens mit der computergestützten Motilitätsanalyse mit dem Strömberg- Mika- Cell- Motion Analysis System (CASA). Zur Spermienfunktionsprüfung wurden die Carboxyfluoreszeindiacetat- Propidiumiodid (CFDA/ PI) Färbung zur Erfassung der Membranintegrität und die Fluoreszein Isothiocyanat- PSA- Propidiumiodid (FITC- PSA/ PI) Färbung zur Ermittlung des akrosomalen Status im Rohsamen durchgeführt. Ferner wurde an den Ejakulaten ein hypoosmotischer Schwelltest durchgeführt und die Volumenveränderungen aufgezeichnet. Die Auslösbarkeit der Akrosomreaktion mit Heparin nach vorheriger Inkubation in einem Kapazitationsmedium wurde überprüft und fluoreszenzmikroskopisch nach Färbung mit FITC-PSA/PI ausgewertet. Die so gewonnenen Ergebnisse wurden zum einen hinsichtlich der saisonalen Schwankung über das Jahr betrachtet, aber auch gegeneinander und zu den Fruchtbarkeitsdaten der Hengste korreliert.

Teil I:

1. In beiden Untersuchungsteilen konnte eine negative Korrelation zwischen dem Alter und der Fertilität der Hengste nachgewiesen werden. Die Anzahl der den Hengsten zugeführten Stuten korreliert signifikant positiv mit der Befruchtungs- und Abfohlrate der Hengste.

2. Für den Anteil an vorwärtsbeweglichen Samenzellen nach 24- stündiger Lagerung bei +5°C kann ein signifikanter Einfluß auf die Befruchtungsleistung der Hengste nachgewiesen werden.
3. Eine hohe Anfangsmotilität im Samen bedingt auch eine signifikant höhere Motilität nach 24 Stunden.
4. Die Schwankungen der Ejakulatparameter interindividuell sind mitunter sehr hoch in den einzelnen Merkmalen, intraindividuell hingegen nicht so ausgeprägt.
5. Hinsichtlich der saisonalen Variationen der samenbiologischen Ejakulatparameter ist festzustellen, daß es am Anfang der Zuchtsaison zu einem Abfallen der Werte des Volumens, der Dichte und der Gesamtspermienzahl kommt, wobei ein Ansteigen selbiger gegen Ende der Saison zu beobachten ist.
6. Die Anzahl der Aufsprünge (> 1), die ein Hengst bis zur Samengewinnung benötigt, führt zu einer signifikanten Volumenzunahme bei gleichzeitig signifikanter Abnahme der Dichte und der Haltbarkeit des Samens nach 24 Stunden.
7. Die Samenentnahmefrequenz eines Hengstes ist mit dessen Fertilisierungsfähigkeit positiv, das Samenentnahmeintervall hingegen mit der Fruchtbarkeit negativ korreliert.

Teil II:

1. Bei allen Verfahren konnte ein signifikanter saisonaler Effekt aufgezeigt werden.
2. Die Korrelation der einzelnen Versuchsverfahren zueinander erbrachte signifikante Zusammenhänge zwischen der Motilität und dem Schwellvermögen der Samenzellen in hypotonen Lösungen, dem Anteil an membranintakten akrosomreagierten Spermien nach Heparininduktion und dem Gesamtzuwachs an akrosomreagierten Samenzellen.
3. Der Anteil an membranintakten Samenzellen in der CFDA- Färbung korreliert positiv mit den Ergebnissen des hypoosmotischen Schwelltest, die membranintakten Samenzellen in der CFDA- Färbung (CFDA 1) korrelieren mit dem Anteil an akrosomreagierten Spermien im Rohsamen.
4. Eine positive Korrelation zur Fertilität besteht für die Anfangsmotilität, den Anteil nicht akrosomreagierter Spermien im Rohsamen, den Gesamtzuwachs an Akrosomreaktionen und den Volumenquotienten der Verdünnungsstufen 250 und 150 mOsmol im HOST.
5. Negativen Einfluß auf die Fertilität haben ein hoher Anteil spontanakrosomreagierter sowie geschädigter nichtakrosomreagierter Samenzellen im Rohsamen und der Anteil toter nichtakrosomreagierter Spermien nach Induktion der Akrosomreaktion mit Heparin.

6. Summary

Echte, Arndt- Friedrich:

Analysis of fertility affecting spermatological parameters with respect to frequency of semen collection and season in stallions

The objective of this study was to determine the relationship between spermatological parameters and the fertilization capacity of stallion by means of the examination of a high number of ejaculates and to compare established methods of semen evaluation with regard to their capability to predict stallion fertility. Furthermore a seasonal profile of spermatobiological parameters by evaluating three ejaculates per stallion and year was prepared.

In experiment I quantitative and qualitative parameters (volume, sperm concentration/ml, motility right after semen collection and after 24 hours storage at +5°C) of the breeding season 1999 of 71 stallions were recorded by means of a retrospective data of semen evaluation protocols and compared to the reproductive performance of each stallion. Findings were correlated between each other, to sexual behaviour, age, number of mares covered and frequency respectively interval of semen collection.

In experiment II, semen evaluation of three ejaculates per year of 69 stallions was performed. This involved the analysis of various functional parameters of equine spermatozoa:

- determination of sperm motility and viability by computer assisted motility analysis using the Stroemberg- Mika- cell motion analysis system (CASA)
- determination of membrane integrity by carboxyfluoresceindiacetat- propidiumiodide staining
- hypoosmotic swelling test (HOST)
- determination of the acrosomal status by fluorescein isothiocyanate- PSA-propidiumiodide (FITC-PSA/PI) and the inducebility of the acrosome reaction after incubation with heparin.

Results of in vitro sperm analysis were analysed with respect to seasonal variation. Furthermore correlation between parameters relationship to fertility was determined.

The following results were obtained in the first part of the study:

1. In both parts of the study age of the stallion and fertility were correlated inversely. Number of mares covered by a stallion correlates statistically significant positive with the rate of fertilization and foaling.

2. Stallions with increased values of progressively motile spermatozoa after storage for 24 hours at +5°C show significant better fertility rates.
3. A high percentage of progressively motile spermatozoa right after semen collection implies a significantly higher motility after 24 hours storage at +5°C.
4. In contrast to the interindividual variations the intraindividual variations of the spermatozoological parameters tend to be obvious for several sperm characteristics.
5. With regard to seasonal variations within breeding season (February to July) volume, concentration and total sperm number decrease at the beginning and increase at the end of the mating season.
6. Mating behaviour influences mainly volume, concentration and semen viability. Volume is significantly positive correlated with number of mounts until ejaculation, whereas the concentration and sperm viability after 24 hours storage at +5°C show a significant inverse correlation.
7. Regular frequency of semen collection resulted in a significant positive effect on fertilizing capacity. Long intervals between semen collections were followed by significant better fertility rates.

The second experimental part obtained the following results:

1. Statistically significant seasonal differences were observed for all parameters.
2. Motility results correlated significantly with the capability of swelling in hypotonic solution, with the percentage of viable acrosome reacted spermatozoa after induction with heparin and with the total increase of acrosome reacted sperm.
3. The percentage of membrane integrity in the CFDA/PI- staining correlated with the results of the HOST and the percentage of spermatozoa that are classified Type one in CFDA/PI correlates with the percentage of acrosome reacted sperms in raw semen.
4. Sperm motility after semen collection, percentage of spermatozoa with an intact acrosome in raw semen, ratio of hypoosmotic volume to isoosmotic volume for the dilutions of 250 and 150 mosmol in HOST and total increase of acrosome reacted spermatozoa are correlated positively with fertility of the stallions.
5. Inversely significant correlation between stallion fertility and percentage of spontaneous acrosome reaction as well as the percentage of damaged, not acrosome reacted spermatozoa in raw semen and percentage of dead spermatozoa that show no acrosome reaction after heparin induction were observed.

7. Literaturverzeichnis

- ALTHOUSE, G.C. u. S.M. HOPKINS (1995):
Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluophores.
Theriogenology 43, 595-603.
- AMANN, R.P. (1993):
Physiology and endocrinology.
in: Mc Kinnon, A.O., J.L. Voss (Hrsg.) *Equine Reproduction*
Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1993, 658-685
- AMANN, R.P. u. R.H. HAMMERSTEDT (1980):
Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm.
Biol. Reprod. 23, 647-656
- AURICH, C., H. BADER u. E. TÖPFER-PETERSEN (1995):
Diagnostik von Fertilitätsstörungen beim männlichen Pferd.
Prakt. Tierarzt 10, 905-918
- BAVISTER, B.D. u. R. YANAGIMACHI (1977):
The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro.
Biol. Reprod. 16, 228-237
- BIELANSKI, W. (1975):
The evaluation of stallion semen in aspects fo fertility control and its use for artificial insemination.
J. Reprod. Fertil. Suppl. 23, 19-24
- BLACH, E.L., R.P. AMANN u. R.A. BOWEN (1989):
Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics.
Theriogenology 31, 283-298
- CAIZA DE LA CUEVA, F., T. RIGAU, S. BONET, J. MIRO u. J.E. RODRIGUEZ-GIL (1997):
Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: Effects of ouabain.
Theriogenology 47, 765
- CASEY, P.J., C.G. GRAVANCE u. R.O. DAVIS (1997):
Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions.
Theriogenology 47, 575-582

- CASEY, P.J., R.B. HILLMAN, K.R. ROBERTSON, A.I. YUDIN, I.K.M. LIU u. E.Z. DROBNIS (1993):
Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm.
J. Androl. 14, 289-297
- CHRISTENSEN, P., C.H. WHITFIELD u. T.J. PARKINSON (1996):
In vitro induction of acrosome reactions in stallion spermatozoa by heparin and A23187.
Theriogenology 45, 1201-1210
- CLEMENT, F., M. MAGISTRINI u. M.T. HOCHEVEAU DE REVIERS (1991):
L'infertilité chez l'étalon: quelques explications.
17th Journée d'étude du CEREOPA, Paris, 12
- CLEMENT, F., M. MAGISTRINI u. M. VIDAMENT (1995 a):
Spermiogramme chez le étalon normal et dans une population d'étalons infertiles.
Andrologie 5, 167-174
- CLEMENT, F., M. VIDAMENT u. B. GUERIN (1995 b):
Microbial contamination of stallion semen.
Biol. Reprod. Mono. 1, 779- 786
- CRUMP, J. u. J. CRUMP (1988):
Stallion ejaculation by manual stimulation of the penis.
Theriogenology 31, 341
- CUMMINS, J.M., S.M. PEMPER, A.M. JEQUIER, J.L. YOVICH u. P.E. HARTMANN (1991):
A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge.
J. Androl. 12, 98-103
- DE ALBUQUERQUE LAGARES, M. (1995):
Bestimmung der osmotischen Resistenz von Hengstsamenzellen.
Hannover, Tierärztl. Hochsch. Diss.
- DOSTALOVA, Z., J.J. CALVETE, L. SANZ u. E. TÖPFER-PETERSEN (1994):
Quantification of boar spermadhesins in accessory sex gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa.
BBA 1200, 48-54
- DOTT, H.M. u. G.C. FOSTER (1972):
A technique for studying the morphologie of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential "live/dead" stain.
J. Reprod. Fertil. 29, 443-445
- DOWSETT, K.F. (1987):
Seminal abnormalities.
in: Robinson, N.E. (Hrsg.) *Current Therapy in Equine Medicine*
WB Saunders, Philadelphia 1987, 564-566

- DOWSETT, K.F. u. W.A. PATTIE (1982):
 Characteristics and fertility of stallion semen.
 J. Reprod. Fertil. Suppl. 32, 1-8
- DOWSETT, K.F. u. W.A. PATTIE (1987):
 Variation in characteristics of stallion semen caused by breed, age, season of year and service frequency.
 J. Reprod. Fertil. Suppl. 35, 645- 647
- ENGLAND, G.C. u. J.M. PLUMMER (1993):
 Hypo- osmotic swelling of dog spermatozoa.
 J. Reprod. Fertil. Suppl. 47, 261- 270
- EVENSON, D.P., Z. DARZYNKIEWICZ u. M.R.MELAMED (1994):
 Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membran potential related to cell motility.
 J. Histochem. Cytochem. 30, 279-285
- FAZELI, A.R., W. STEENWEG, M.M. BEVERS, V.BRACHER, J. PARLEVLIIET u. B. COLENBRANDER (1993):
 Use of sperm binding to homologous hemizona pellucida to predict stallions fertility.
 Equine Vet. J. Suppl. 15, 57-59
- FAZELI, A.R., W. STEENWEG u. M.M. BEVERS (1995):
 Relation between stallions sperm binding to homologous hemizona and fertility.
 Theriogenology, 44, 751-760
- FOULKES, J.A. u. B.J. MAC DONALD (1979):
 The relationship between ATP content and motility of bovine spermatozoa.
 Theriogenology, 11, 313-321
- GARNER, D.L., L.A. JOHNSON u. M.M. PACE (1986):
 Dual DANN staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide.
 J. Androl. 15, 620-629
- GRAHAM, J.K. (1997):
 Response of sperm to freezing and analysis of sperm.
 Proc. Ann. Meet. Soc. Theriog. 1997, 170- 177
- GRAVANCE, C.G., D.L. GARNER, J. BAUMBER u. B.A. BALL (2000):
 Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1.
 Theriogenology, 53, 1691- 1703
- GUSMAO, A.L. (1988):
 Sexualhormonprofile und Hormonstimulation bei männlichen Pferden in unterschiedlichen Altersgruppen.
 Hannover, Tierärztl. Hochsch. Diss.

- HARRISON, R.A.P. u. S.E. VICKERS (1990):
Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa.
J. Reprod. Fertil. 88, 343-352
- HOFFMANN, B. u. A. LANDECK (1999):
Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion.
Anim. Reprod. Sci. 57, 89- 98
- HURTGEN, J.P. (2000):
Semen collection in stallions.
in: J.C. Samper (Hrsg.) Equine breeding management and artificial insemination
W.B. Saunders Company, Pennsylvania S.61-69
- INSTITUT DU CHEVAL (1996):
Insemination artificielle equine- Guide Pratique.
2nd ed. Paris, Institut du Cheval, 1996
- JASKO, D.J., D.H. LEIN u. R.H. FOOTE (1990):
Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility
in stallions.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 197, 389-394
- JASKO, D.J., T.V. LITTLE u. K. SMITH (1988):
Objective analysis of stallion sperm motility.
Theriogenology, 30, 1159-1167
- JASKO, D.J., T.V. LITTLE, D.H. LEIN u. R.H.FOOTE (1992):
Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallion.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 200, 979-985
- JEYENDRAN, R.S., H.H. VAN DER VEEN, M. PEREZ-PELAEZ, B.G. CRABO u.
L.J.D. ZANEFELD (1984):
Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane
and its relationship to other semen characteristics.
J. Reprod. Fertil. 70, 219-228.
- JOHNSON, L.V., M.L. WALSH u. L.B. CHEN (1980):
Localization of mitochondria in living cells with rhodamine.
123. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 990-996
- KARRAS, W. (1950):
Spermastudien. 1. Mitteilung: Eine Methode zur färberischen Darstellung der Kopfkappen
und des Kolloidüberzuges der Spermien.
Mhefte. Prakt. Tierhkd. 2, 162-167
- KENNEY, R.M., D.P. EVENSON u. M.C. GARCIA (1995):
Relationship between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated
sperm and seasonal pregnancy rate.
Biol. Reprod. Monogr. 1, 647

KLUG, E. (1982):

Untersuchung zur klinischen Andrologie des Pferdes.
Hannover, Tierärztl. Hochsch. Habil.-Schr.

KLUG, E. (1999):

Andrologischer Untersuchungsgang.
in: O. Dietz u. B. Huskamp (Hrsg.): Handbuch Pferdepraxis
2. Aufl. Verlag Enke, Stuttgart, S. 552-555

KLUG, E. u. H. SIEME (1999):

Tierärztliche Empfehlungen zum Umgang mit der Equinen Virusarteriitis (EVA) in der praktischen Zuchtbetreuung.
Tierärztl. Prax. 27, 61- 66

KLUG, E., H. SIEME u. E. PETERS (1998):

Hygienegrundlagen zum Einsatz von Hengsten in der instrumentellen Samentübertragung.
Tierärztl. Prax. 26, 218- 224

MAGISTRINI, M. (2000):

Semen evaluation.
in: J.C. Samper (Hrsg.) Equine breeding management and artificial insemination
W.B. Saunders Company, Pennsylvania, 91-108

MAGISTRINI, M., M. SATTLER, J.M. YVON u. M. VIDAMENT (1997):

Freezability of stallion spermatozoa evaluated by motility, membrane integrity and ATP content (Abstract).
34th Annual Meeting of the Society of Cryobiology, Barcelona, 35, 88

MAGISTRINI, M., M. VIDAMENT u. F. CLEMENT (1996):

Fertility prediction in stallion.
Anim. Reprod. Sci. 42, 181

MALMGREN, L. (1997):

Assessing the quality of raw semen: A review.
Theriogenology, 48, 523-530

MAYR, A. (1975):

Erfahrung mit der Schutzimpfung gegen Virusabort (Rhinopneumonitis) beim Vollblut.
Vollblut, Zucht und Rennen, 65, 424- 428

MC DONNELL, S.M. (1992):

Ejaculation: Physiology and dysfunction.
Vet Clin North Am Equine Pract 8, 57-70

MC DONNELL, S.M. (2000a):

Stallion sexual behaviour.
in: J.C. Samper (Hrsg.) Equine breeding management and artificial insemination
W.B. Saunders Company, Pennsylvania, S. 53-61

- MC DONNELL, S.M. (2000b):
Reproductive behaviour of stallions and mares: comparison of free running and domestic in hand breeding.
Anim. Reprod. Sci. 60- 61, 211- 219
- MC DONNELL, S.M. u. N.K. DIEHL (1994):
Modification of unruly breeding behaviour in stallions.
Compend Contin Educ 17 (3), 411
- MC DONNELL, S.M., M.C. GARCIA u. R.M. KENNEY (1987):
Imipramine induced erection, masturbation and ejaculation in male horses.
Pharmacol. Biochem. Behav. 27, 187
- MC DONNELL S.M. u. C.C. LOVE (1990):
Manual stimulation collection of semen from stallions: Training time, sexual behaviour and semen.
Theriogenology, 33, 1201-1210
- MC DONNELL, S.M. u. S.C. MURRAY (1995):
Bachelor and harem stallion behaviour and endocrinology.
Biol. Reprod. Monogr. 1, 577-590
- MERKT, H. u. E. KLUG (1989):
Gesundheitliche und geschlechtliche Mindestanforderungen an Zuchthengste.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 96, 433-472
- MEYERS, S., J.W. OVERSTREET u. I.K.M. LIU (1995):
Capacitation in-vitro of stallion spermatozoa comparison of progesterone induced acrosome reactions in fertile and subfertile males.
J. Androl. 16, 47-54
- OETTLE, E.E. (1986):
Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology.
Vet. Med. 3, 263-266.
- PALMER, E. u. A. FAUQUENOT (1984):
Mesure et predictione de la fertilité des étalons: étude methodologique.
in: R. Jarrige, W. Martin-Rosset (Hrsg.) *Le Cheval, Reproduction, Selection, Alimentation, Exploitation* INRA, Paris, S. 47-61
- PANTKE, P., J.H. HYLAND, D.B. GALLOWAY, D.Y. LIU u. H.W.G.BAKER (1994):
Development of a zona pellucida sperm binding assay for the assessment of stallion fertility.
Biol. Reprod. Mono. 1, 681-688
- PARLEVLIET, J.M. (1999):
Pre-seasonal breeding evaluation of the stallion.
Pferdeheilkd. 15, 523-528

- PETRUNKINA, A.M., R. PETZOLDT, K.F. WEITZE, D. WABERSKI u. E. TÖPFER- PETERSEN (2000):
Cell subpopulation- related volumetric parameters: a complementary tool of the modified hypo- osmotic swelling test on model of boar spermatozoa.
Reprod. Dom. Anim. 35, 201- 206
- PETZOLDT, R. u. S.ENGEL (1994):
The spermatozoal volume as indicative of the plasma membrane integrity (modification of the hypoosmotic swelling test). Diagnostic approach.
Andrologia 26, 79-89
- PETZOLDT, R., H. SIEME u. C. KOHNE (1996):
Relationship between stallion sperm swelling in hypoosmotic medium (host) and liquid and deep freeze preservation.
2nd International Symposium on Production, Evaluation and Preservation of stallion semen, Amersfort, NL
- PICKETT, B.W. (1993):
Factors affecting sperm production and output.
In: A.O. Mc Kinnon u. J.L. Voss (Hrsg.) Equine Reproduction
Lea & Febiger, Philadelphia, London, S. 689-704
- PICKETT, B.W., R.P. AMANN, A.O. MC KINNON, E.L. SQUIRES u. J.L. VOSS (1989):
Management of the stallion for maximum reproductive efficiency.
II. Colo. State U. Anim. Reprod. Lab. Bull. No. 05, Fort Collins
- PICKETT, B.W., L.C. FAULKNER u. T.M. SUTHERLAND (1970):
Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behaviour.
J. Anim. Sci. 31, 713-728
- PICKETT, B.W. u. J.L. VOSS (1999):
Physiology and philosophy of breeding horses.
Volume 19, 363-373
- PICKETT, B.W., J.L. VOSS, R.A. BOWEN, E.L. SQUIRES u. A.O. MC KINNON (1988):
Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions.
Proc. Am. Assoc. Equine Pract. 155-174
- REINEKE, A., O. HESS, A. SCHAMBONY, A.M. PETROUNKINA, H. BADER, H. SIEME u. E. TÖPFER-PETERSEN (1999):
Sperm-associated seminal plasma proteins: a novel approach for the evaluation of sperm fertilizing ability of stallions.
Pferdeheilkd. 15, 531-537

- REINERT, M., J.J. CALVETE, L. SANZ, K.-H. MANN u. E. TÖPFER- PETERSEN (1996):
Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona pellucida- binding protein of the spermadhesin family.
Eur. J. Biochem. 242, 639- 640
- REINERT, M., J.J. CALVETE, L. SANZ u. E. TÖPFER- PETERSEN (1997):
Immunohistochemical localization in the stallion genital tract, and topography on spermatozoa of seminal plasma protein SSP-7, a member of the spermadhesin family.
Andrologia 29, 179- 186
- ROGERS, B.J. u. R.A. PARKER (1991):
Relationship between the human sperm hypoosmotic swelling test and sperm penetration assay.
J. Androl. 12, 152- 158
- ROSER, J.F. u. J.P. HUGHES (1991):
Prolonged pulsatile administration of gonadotropin- releasing hormone (GnRH) to fertile stallions.
J. Reprod. Fertil. Suppl. 44, 155-168
- SAMPER, J.C., J.C.HELLANDER u. B.G. CRABO (1991):
Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality.
J. Reprod. Fertil. Suppl. 44, 107-114
- SCHAAF, v.d.A. (1952):
Vitalkleuring van stieren-sperma met een oplossing van anilineblau en eosine.
Tijdschr. Diergeneesk, 77, 815-819
- SCHROP, H. (1992):
Einfluß der Membranprotektiva Lecithin und Phenylmethansulfonylfluorid auf Motilität und Akrosomintegrität im aufgetauten Samen: Beurteilung mittels indirekter Immunfluoreszenz im Vergleich mit der Spermac- Färbung.
Hannover, Tierärztl. Hochsch. Diss.
- SIEME, H., E. KLUG, N. ARRAS u. S. WEINRICH (2000):
Advanced current topics in stallion veterinary practice.
Havemeyer foundation workshop, 17.-20. September 2000, Krakau, Polen Proc. S. 46- 47
- SIEME, H., E. KLUG u. H. MERKT (1999):
Organisation de l'insemination artificielle en Allemagne.
25.eme journée de la recherche equine, Edition Institut du Cheval, Paris, S. 129- 137
- SIEME, H., S. KNEISSL, I. ROEBBELEN, R. PETZOLDT, E. KLUG u. E. TÖPFER-PETERSEN (1996):
Cryopreservation of stallion semen- influence of collection method, packaging form and freezing rate.
Symposium on Stallion Semen, Amersfoort-The Netherlands, March 7-8 (personal communication)

SIEME, H., E. TÖPFER-PETERSEN, H. BADER, R. PETZOLDT u. H. MERKT (2001):
A.I.- sperm of the stallion: evaluation criteria and minimal standards.
Pferdeheilkd. 17, 145-154

TAKAHASHI, K., A. UCHIDA u. M. KITAO (1990):
Hypoosmotic swelling test of sperm.
Arch. Andrology 25, 225-242

TESARIK, J. (1989):
Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon.
Hum. Reprod. 4, 957-961

TÖPFER- PETERSEN, E., J. CALVETE, L. SANZ u. F. SINOWATZ (1995):
Carbohydrate- and heparin- binding- proteins in mammalian fertilization.
Andrologia 27, 303- 324

TÖPFER- PETERSEN, E., D. WABERSKI, O. HESS, S. BELLAIR, A. SCHAMBONY,
M. EKHLASI- HUNDRIESER, M. GENTZEL, A. REINEKE u. J. CALVETE (1998):
Bedeutung des Seminalplasmas für die Befruchtung- ein kurzer Rückblick.
Tierärztl. Umsch. 53, 1-6

TURNER, R.M.O., S.M. MC DONNELL u. J.F. HAWKINS (1995):
Use of pharmacologically induced ejaculation to obtain semen of a stallion with a fractured radius.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 206, 1906-1910

VARNER, D.D., T.L. BLANCHARD, S.P. BRINSKO, C.C. LOVE, T.S. TAYLOR u.
L. JOHNSON (2000):
Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions.
Anim. Reprod. Sci. 60-61, 493-509

VARNER, D.D., J.A. BOWEN u. L. JOHNSON (1993):
Effect of heparin on capacitation and acrosome reaction of equine sperm.
Arch. Andr. 31, 199- 207

VIDAMENT, M., E. COGNARD, J.M. YVON, M. SATTLER, E. PALMER u.
M. MAGISTRINI (1998):
Evaluation of stallion semen before and after freezing.
Reprod. Dom. Anim. 33, 269-277.

VIDAMENT, M., M. MAGISTRINI, E. PALMER u. F. CLEMENT (1999):
Equine Artificial Insemination in French National Studs.
Reprod. Dom Anim. Suppl. 6, 61-70

VOSS, J.L., PICKETT, B.W. u. SQUIRES, E.L. (1981):
Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility.
JAVMA, 178, 287-289

WILLIAMS, W.W. (1920):

Technique of collecting semen for laboratory examination with review of several diseased bulls.

Cornell Vet. 10, 87-94

WOODS, P., J.A.FOULKES u. R.C. SHAW (1986):

Semen assessment, fertility and the selection of Hereford bulls for use in AI.

J. Reprod. Fertil. 76, 783-787

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. E. Klug für die Überlassung des Themas sowie für die Förderung und Unterstützung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Harald Sieme, der mir stets ein hilfsbereiter und fachkompetenter Ansprechpartner war und mit seiner unendlichen Geduld wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat. Auch für die fröhliche Zusammenarbeit auf der Besamungsstation Celle möchte ich mich recht herzlich bedanken.

Herrn Landstallmeister Dr. B. Bade danke ich für die freundliche Aufnahme am Landgestüt Celle und die großzügige Bereitstellung des Materials.

Müller I und II, meinen Kollegen der Zentralen Besamungsstation Celle und der gesamten Gestütsmannschaft möchte ich für die fröhliche Zeit ebenfalls danken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Rohn und Frau Wand aus dem Institut für Biometrie und Epidemiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover für ihren Einsatz bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Für die moralische und praktische Unterstützung während der Anfertigung dieser Dissertation möchte ich der Häuschenbelegschaft, den Hannos, allen Freunden, Bekannten und Kollegen, vor allem aber Suse, Jochen, Janni, Cord, Guido und Wolfi herzlich danken, die immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatten.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern und dem Rest der Familie für ihr Verständnis und die stets aufmunternden Worte während dieser Zeit bedanken.