

Tierärztliche Hochschule Hannover

**Untersuchung des Einflusses von Bewegungs-
und Vibrationsemissionen auf die Qualität
von flüssigkonserviertem Hengstsperma**

INAUGURAL - DISSERTATION

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

vorgelegt von
Hannah Dierberger
Überlingen

Hannover 2024

Wissenschaftliche Betreuung:

Prof. Dr. Martin Schulze
Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere
Schönow e.V.

1. Gutachter:

Prof. Dr. Harald Sieme
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Reproduktionsmedizinische Einheit der Kliniken -
Klinik für Pferde

Prof. Dr. Martin Schulze
Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere
Schönow e.V.

2. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. Árpád Csaba Bajcsy
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Klinik für Rinder

Tag der mündlichen Prüfung:

14.05.2024

Für meine Familie

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgenden internationalen Fachzeitschriften mit Gutachtersystem veröffentlicht:

1. Hannah Dierberger, Laura Pieper, Markus Jung und Martin Schulze (2023):
Assessment of the stallion sperm acrosome in two different extenders: Spermac stain in comparison with PNA/PSA/PI triple-staining.
Reproduction in Domestic Animals 2023, 58(9):1330-33.
DOI: 10.1111/rda.14426
2. Hannah Dierberger, Laura Pieper, Markus Jung und Martin Schulze (2023):
Rotation of liquid-preserved artificial insemination doses on roller benches affects sperm quality during storage in stallions.
Reproduction in Domestic Animals 2023, 58(10):1413-19.
DOI: 10.1111/rda.14456
3. Hannah Dierberger, Laura Pieper, Markus Jung und Martin Schulze (2024):
Vibration emissions affect the quality of liquid-preserved AI doses in stallions. Theriogenology 2024, 218:1-7.
DOI: 10.1016/j.theriogenology.2024.01.018

Des Weiteren wurden Teilergebnisse im Rahmen folgender Konferenz vorgestellt:

1. Hannah Dierberger, Laura Pieper, Markus Jung und Martin Schulze (2024):
Influence of transport-related vibrations on the quality of liquid-preserved AI doses in stallions. 57th Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction (DVG), 28.02. - 01.03.2024, Berlin, Germany. Poster, Abstract.
DOI: 10.1111/rda.14531

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	II
1. Einleitung	1
1.1 Die Pferdezucht in Deutschland - Fokus Zuchthengst	1
1.2 Untersuchung von Hengstsperma - Erweiterung des Methodenspektrums	2
1.3 Lagerung von Hengstspermaportionen	4
1.4 Transport von Hengstspermaportionen	6
2. Publikation 1	9
3. Publikation 2	10
4. Publikation 3	11
5. Diskussion	12
5.1 Analyse in Publikation 1	12
5.1.1 Methodenvergleich zur Bestimmung nicht intakter Akrosomen.....	13
5.2 Analyse in Publikation 2	15
5.2.1 Einfluss der Rollbanklagerung auf die Spermaqualität.....	16
5.2.2 Einfluss des Verdünners während der Lagerung	19
5.3 Analyse in Publikation 3	21
5.3.1 Einfluss des Transportes auf die Spermaqualität	21
5.3.2 Kompensation der Transportauswirkungen durch den Verdünner	25
5.3.3 Hengstindividuelle spermatologische Toleranz von Transportstress.....	26
5.4 Fazit	27
6. Zusammenfassung	29
7. Summary	30
8. Literaturverzeichnis.....	31
9. Danksagung	39

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AI	Künstliche Besamung / <i>Artificial insemination</i>
ATP	Adenosintriphosphat
CASA	Computergestützte Spermienanalyse / <i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GLMM	Verallgemeinertes lineares gemischtes Modell / <i>Generalized Linear Mixed Model</i>
h	Stunde / <i>hour</i>
IKK	Intraklassenkorrelationskoeffizient
KKK	Konkordanzkorrelationskoeffizient
PI	Propidiumiodid
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> Agglutinin
PP	Prozentpunkte
PSA	<i>Pisum sativum</i> Agglutinin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies / <i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute / <i>Revolutions per minute</i>
TRT	Thermoresistenztest

1. Einleitung

1.1 Die Pferdezucht in Deutschland - Fokus Zuchthengst

Die Pferdezucht in Deutschland erfreute sich in den letzten Jahren ungebrochener Beliebtheit, sowohl bei großen, wirtschaftlich agierenden Pferdezuchtunternehmen als auch in der Hobbyzucht. Laut des Jahresberichtes Zucht der Deutschen Reiterlichen Vereinigung für 2022, verzeichnete die Zahl der eingetragenen Warmblutzuchtstuten und -hengste einen leichten Zuwachs um 735 Stuten beziehungsweise 192 Hengste gegenüber dem Vorjahr. Ein ähnlicher Positivtrend zeigte sich in der Zahl der Bedeckungen, wobei bei den Warmblütern in 92% der Fälle flüssigkonserviertes Hengstsperma zum Einsatz kam. Die Verwendung von Tiefgefriersperma machte mit 3,5% nur einen geringen Anteil der Bedeckungen aus ebenso wie der Natursprung mit 4,5%, wobei diese beiden Bedeckungsarten, verglichen mit 2021, rückläufig waren (Deutsche Reiterliche Vereinigung 2023).

Um der steigenden Nachfrage an Besamungsportionen von Zuchthengsten gerecht zu werden, ist ein angepasstes und optimiertes Management dieser Hengste unabdingbar. Die ohnehin schon hohen körperlichen Anforderungen werden durch die Doppelnutzung vieler Hengste in der Zucht und dem Turniersport noch verstärkt. Sportliche Erfolge steigern den Marktwert sowie die Bekanntheit der Hengste, was für Hengststationen zusätzlichen Profit verspricht. Diese doppelte Belastung bedeutet allerdings zusätzlichen Stress für die Hengste. So konnte eine Untersuchung höhere Kortisolkonzentrationen im Speichel der doppeltgenutzten Hengste gegenüber einer Gruppe, die ausschließlich zur Zucht und nicht im Sport eingesetzt wurde, zuverlässig nachweisen (Hensel et al. 2023). Ein negativer Einfluss auf die Spermaqualität wurde in dieser Studie nicht gezeigt (Hensel et al. 2023), dennoch ergab eine andere retrospektive Datenauswertung eine signifikant verringerte progressive Spermienmotilität sowie -konzentration bei Hengsten in Doppelnutzung, verglichen mit reinen Zuchthengsten (Wilson et al. 2019). Es ist zu betonen, dass die Stressantwort zwischen Individuen sehr unterschiedlich ausfallen kann und somit für die Eignung der Hengste, den Balanceakt zwischen Sport und Reproduktion zu meistern, berücksichtigt werden sollte (Hensel et al. 2023).

Große interindividuelle Unterschiede finden sich ebenfalls in weiten Bereichen der Hengstspermatologie. So ist beispielsweise die Toleranz der Spermien gegenüber Kryokonservierung, verschiedenen Lagerungstemperaturen sowie Verdünnermedien zwischen einzelnen Hengsten sehr unterschiedlich (Tischner 1979; Batellier et al. 2001). Dies ist unter anderem in einer variierenden Zusammensetzung der Plasmamembran und folglich unterschiedlicher Membranfluidität equiner Spermien begründet (Moore et al. 2005). Weshalb die zu beobachtende Hengstspezifität im Vergleich zu anderen Spezies stärker ausgeprägt ist, kann teilweise mit den Strukturen der Pferdezucht erklärt werden. Hengste werden häufig aufgrund ihrer sportlichen Leistung oder ihrer Abstammung für die Zucht ausgewählt, wobei der individuellen Fruchtbarkeit der Hengste eine geringere Bedeutung beigemessen wird (Gibb und Aitken 2016). Dieser eingeschränkte Selektionsdruck hinsichtlich ihrer Fruchtbarkeit führt dazu, dass Hengste vor allem im Vergleich zu anderen Nutztierarten eine geringere Fruchtbarkeit aufweisen (Varner et al. 2015) und größere interindividuelle Unterschiede beobachtet werden können.

1.2 Untersuchung von Hengstsperma - Erweiterung des Methodenspektrums

Eine detaillierte Untersuchung der Spermaqualität eines jeden Zuchthengstes ist essenziell, um eine Prognose für den späteren Befruchtungserfolg abgeben zu können. Zum Einsatz kommen hierbei Methoden der Standardspermatologie wie die Motilitätsanalyse mittels subjektiver mikroskopischer Schätzung oder objektiver computergestützter Spermienanalyse (CASA), die Beurteilung der Spermienmorphologie und die Bestimmung der Spermienkonzentration im Ejakulat. Darüber hinaus kann je nach Fragestellung ein erweitertes Methodenspektrum, beispielsweise bestehend aus der Untersuchung spermatologischer Eigenschaften mittels Durchflusszytometrie oder der Durchführung von Stresstests, allen voran der Thermo-resistenztest (TRT), angeschlossen werden. Die Durchflusszytometrie bietet den Vorteil nicht nur statische Zustände, sondern auch dynamische, physiologische Ereignisse von Zellen zu detektieren. Hier ist die Messung der Plasmamembranintegrität der Spermien mittels Propidiumiodid (PI) oder die Charakterisierung verschiedener Funktionszustände der Mitochondrien zu nennen (Graham 2001; Umair et al. 2023). Der TRT wiederum dient der Simulation von Bedingungen im weiblichen Genitaltrakt (Schulze et al. 2021), wobei die Spermien für eine verlängerte Zeitspanne von bis zu 120 Minuten bei 38 °C inkubiert werden und nachfolgend ihre Motilität

bestimmt wird. Dieser Stresstest ermöglicht es, geringe Fertilitätsunterschiede festzustellen, welche in der Standardspermatologie nicht erfasst werden können (Schulze et al. 2021).

Dem Akrosom, einem am apikalen Pol des Spermiums gelegen Organell, kommt bei der Befruchtung der Eizelle eine besondere Schlüsselrolle zu (Hernández-Avilés et al. 2023). Bleibt das Ausschleusen von akrosomalen Bestandteilen, genannt Exozytose, während der Akrosomenreaktion aus, ist die Penetration der *Zona pellucida* der Eizelle und folglich eine erfolgreiche Befruchtung nicht möglich (Varner et al. 2015). Aus diesem Grund ist die Beurteilung des Akrosoms ein fester Bestandteil der spermatologischen Untersuchung, wenngleich diese einige Schwierigkeiten mit sich bringt. Eine Besonderheit des Hengstakrosoms ist die im Vergleich zu anderen Spezies eher geringe Größe (Hernández-Avilés et al. 2023), weshalb eine adäquate morphologische Beurteilung des Akrosoms mittels Lichtmikroskop ohne zusätzliche Färbung nicht möglich ist (Juhász et al. 2000). Über die Jahre wurden deshalb zahlreiche Färbemethoden zur verbesserten Sichtbarkeit des Hengstakrosoms für Untersuchende entwickelt. Hierbei kommen sowohl einfachere Färbungen, wie die sogenannten Dip Quick und Spermac[®] Färbungen, als auch fluoreszenzgestützte Verfahren zum Einsatz (Pozor et al. 2012; Runcan et al. 2014).

Die Spermac[®] Färbung ermöglicht das verschiedenfarbige Anfärben der Spermienbestandteile und eine anschließende mikroskopische Beurteilung der Akrosomenmorphologie (Runcan et al. 2014). Bei der Durchführung subjektiver Untersuchungsmethoden wie der Mikroskopie sollte ergänzend berücksichtigt werden, dass mehrere untersuchende Personen möglicherweise verschiedene Ergebnisse erzielen, abhängig von ihrer jeweiligen Erfahrung und Routine (Brito et al. 2011). Fluoreszenzbasierte Verfahren gründen häufig auf der Bindung von Lektinen, insbesondere des Erbsenproteins *Pisum sativum* Agglutinin (PSA) oder des Erdnussproteins *Arachis hypogaea* Agglutinin (PNA), an die akrosomale Matrix beziehungsweise die äußere akrosomale Membran nicht intakter Akrosomen (Farlin et al. 1992; Flesch et al. 1998). Beide Proteine werden zur Visualisierung an Fluoreszenzmarker, beispielsweise Fluorescein isothiocyanate (FITC), gekoppelt und erlauben durch ein Fluoreszenzsignal nach erfolgter Bindung, die fluoreszenzmikroskopische oder durchflusszytometrische Detektion geschädigter Akrosomen.

In der ersten Studie der vorliegenden Arbeit wurde die konventionelle Spermac[®] Färbung mit einer fluoreszenzbasierten Dreifachfärbung im Hinblick auf deren Eignung zur Beurteilung des Hengstakrosoms verglichen. Die gewonnenen Erkenntnisse dienten der Erweiterung des Methodenspektrums für die beiden Studien 2 und 3, welche das Kernstück dieser Arbeit darstellen.

1.3 Lagerung von Hengstpermaportionen

Grundlegende Herstellungsvoraussetzungen für flüssigkonservierte Hengstpermaportionen von hoher Qualität sind eine optimale Verarbeitung des nativen Ejakulates und eine anschließende adäquate Lagerung der Besamungsportionen. Um Qualitätseinbußen zu verhindern, sollte die Verdünnung des nativen Ejakulates äußerst sorgfältig erfolgen, wobei besonders auf Hygiene und die Vermeidung von großen Temperaturunterschieden zu achten ist (Loomis 2006). Nach erfolgter Flüssigkonservierung werden die Besamungsportionen in den meisten Fällen schonend auf 5 °C herabgekühlt und anschließend ebenfalls bei 5 °C gelagert (Aurich 2008). Diese Niedrigtemperaturlagerung bewirkt eine Reduktion des Stoffwechsels der Spermien, was in der Wahrung von Energiereserven resultiert (Gibb und Aitken 2016). Darüber hinaus wird durch niedrige Lagerungstemperaturen das Bakterienwachstum in den Besamungsportionen gehemmt. Perspektivisch könnte sich hier ein Vorteil durch den Verzicht auf antimikrobielle Wirkstoffe ergeben, ohne jedoch Einbußen in der Spermaqualität zu verzeichnen (Price et al. 2008). Bei geringer Toleranz gegenüber Kühlprozessen ist die Lagerung bei 15 °C ebenfalls praktikabel (Batellier et al. 2001). Eine Studie bestätigte, dass Hengst sperma in einem angepassten Verdünner bei 17 °C bis zu einer Dauer von sieben Tagen gelagert werden konnte, wobei die Spermaqualität verglichen mit einer Kontrollgruppe, welche standardmäßig bei 4 °C gelagert wurde, sogar besser konserviert wurde (Gibb et al. 2018).

Als zusätzliches Lagerungsverfahren für flüssigkonservierte Besamungsportionen vom Hengst, wird die Lagerung auf einer sogenannten Rollbank empfohlen (Katila 1997; Parlevliet und Colenbrander 1999). Diese Methode soll durch eine Schwenk- und Rollbewegung die optimale Durchmischung der Besamungsportionen während der Lagerung garantieren und die Sedimentation der Spermien verhindern. Eine Rotationsgeschwindigkeit von 5 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute, rpm) wird hier angeraten (Heffe 1993). Hagedorn untersuchte 1992 in ihrer

Dissertation die Lagerung von Hengstspermaportionen, konserviert mittels Magermilchverdünner oder Eidotter-Glycin Verdünner, auf einer Rollbank gegenüber der Lagerung ohne Rotation bei 5 °C. Ein Vorversuch ergab statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich einer verbesserten progressiven Spermienmotilität der mit Eidotter-Glycin verdünnten Portionen nach Rollbanklagerung. Als Begründung für diesen positiven Effekt gab Hagedorn den optimalen Kontakt zwischen Verdünner und Spermien an und den damit einhergehenden ständigen Zugang zu im Verdünner bereitgestellten Nährstoffen. Daraus sollte eine verlängerte Lebensspanne der Spermien sowie ein besserer Erhalt der Spermienmotilität resultieren.

Bei einem Wechsel der Spezies finden sich ebenfalls Publikationen zur Rotation und Bewegung von flüssigkonservierten Eberspermaportionen während der Lagerung (Knox 2006; Balogun und Stewart 2021). Der Einsatz von Rotationsmaßnahmen ist hier in der Annahme begründet, dass die Sedimentation der Spermien mit folgender Akkumulation von Stoffwechselendprodukten, wie beispielsweise Laktat, am Boden der Portionen den pH-Wert verringert und die Spermien folglich schädigt (Rodríguez-Gil und Rigau 1995; Knox 2006). Während einige Arbeiten einen positiven Einfluss von mechanischer Bewegung auf die Lebensfähigkeit und Motilität postulierten (Rodríguez-Gil und Rigau 1995; Knox 2006), konnte in neueren Studien kein Einfluss (Balogun und Stewart 2021) beziehungsweise darüber hinaus sogar ein Abfall der Spermaqualität festgestellt werden (Schulze et al. 2015; Menegat et al. 2017).

Schulze et al. (2015) fanden heraus, dass sich eine manuelle, zweimal tägliche Rotation sowie eine automatische Rotation der Besamungsportion fünfmal pro Stunde negativ auf die Plasmamembranintegrität und die progressive Motilität von porcinen Spermien nach einem TRT auswirkten. In Folgeuntersuchungen einer brasilianischen Forschergruppe zeigte sich weiter, dass antioxidative Enzyme von Eberspermien in ihrer Aktivität nach manueller Homogenisierung der Spermaportionen vermindert waren (Menegat et al. 2017). Aus genannten Ergebnissen resultierte die Empfehlung auf eine Bewegung der Eberspermaportionen während der Lagerung zukünftig zu verzichten (Schulze et al. 2015). Eine Studie an humanen Spermien hat ergänzend gezeigt, dass Rotation bei 15 rpm unter aeroben Verhältnissen die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) steigerte (de Jager et al. 1996).

1.4 Transport von Hengstpermaportionen

In den vergangenen Jahrzehnten wurde der Einsatz von flüssig- und gefrierkonserviertem Hengstperma zur Künstlichen Besamung von Stuten von immer mehr Zuchtorganisationen zugelassen. Zusammen mit der zunehmenden weltweiten Vernetzung ist auch die Pferdezucht expandiert und besonders bedeutende Sportpferderassen aus Nordwesteuropa haben erfolgreich ausländische Märkte erschlossen (Aurich und Aurich 2006). Dies stellt Hengststationen vor die Herausforderung, Besamungsportionen trotz teilweise weiter Strecken zügig von einem Ort zum anderen zu transportieren. Dabei sollte die Spermaqualität nicht beeinträchtigt werden und die Befruchtungsfähigkeit des Spermias möglichst lange erhalten bleiben.

In Deutschland ist der Transport von flüssigkonservierten Besamungsportionen mittels spezialisierter Kurierdienste per Fahrzeug weit verbreitet. Die Spermagewinnung erfolgt entsprechend der Nachfrage für den jeweiligen Tag, woran sich eine spermatologische Untersuchung des Ejakulats anschließt. Es folgt die Flüssigkonservierung des gewonnenen Spermias und die Verpackung der Besamungsportionen für den Transport. In Abhängigkeit der zurückzulegenden Strecke zwischen Hengst und Stute erreichen die Besamungsportionen üblicherweise entweder am selben Tag abends oder am nächsten Morgen ihren Bestimmungsort. Eine Studie aus Österreich berichtete von einer durchschnittlichen Transportzeit der Besamungsportionen von $26,5 \pm 0,1$ h, wobei die Spannbreite von 9,5 h bis 32 h reichte (Heckenbichler et al. 2011). Diese Daten bezogen sich allerdings nicht auf die reine Transportzeit, sondern auf die Zeitspanne zwischen der Bestellung der Spermaportionen und deren Ankunft am Zielort. Weiter wurde in einer finnischen Studie eine durchschnittliche Transportzeit von 9,4 h bis 10,4 h für Besamungsportionen verschiedener Rassen angegeben, ohne den Messzeitraum näher zu definieren (Kareskoski et al. 2019). Für Deutschland sind nach aktuellem Stand keine Daten hinsichtlich der Transportzeiten von flüssigkonservierten Besamungsportionen vorhanden.

Um den Erhalt von Spermienmotilität, Plasmamembranintegrität und DNA-Integrität während des Transportes zu gewährleisten, beträgt die optimale Temperatur für den Versand flüssigkonservierter Spermaportionen 5 °C (Aurich 2008). Zahlreiche spezialisierte Kühlboxen sind auf dem Markt erhältlich, welche eine konstante Kühlung während des Transportes garantieren sollen (Brinsko et al. 2000). Allerdings stellt die

Versendung der Spermaportionen in einer technisch nicht modifizierten Styroporbox ebenfalls eine qualitätserhaltende sowie gleichzeitig deutlich kostengünstigere Alternative dar und wird deshalb in den meisten Fällen verwendet (Aurich 2008; Heckenbichler et al. 2011).

Neben Qualitätsverlusten aufgrund eines ungenügenden Temperaturmanagements während des Transportes ist wenig über die Auswirkungen des Transportes auf die Qualität von Besamungsportionen vom Hengst bekannt (Brinsko et al. 2000). Bei der Betrachtung weiterer Tierarten finden sich einige Veröffentlichungen, die den Einfluss von Erschütterungen während des Straßentransportes auf die Qualität von flüssig-konserviertem Ebersperma untersuchten (Schulze et al. 2018; Paschoal et al. 2021; Tamanini et al. 2022; Hafemeister et al. 2023). Hierbei wurden Transportbedingungen mittels spezieller Labormischgeräte simuliert, welche Vibrationen ähnlich derer beim Fahren auf Straßen erzeugen. Um den *in vitro* simulierten Transport weiter zu charakterisieren, wurde darüber hinaus in zwei Arbeiten die einwirkende Vibrationsintensität über den gesamten Zeitraum der Simulation durch ein speziell entwickeltes Sensorsystem detektiert (Schulze et al. 2018; Hafemeister et al. 2023). Nachfolgend konnte ein frequenz- und zeitabhängiger negativer Einfluss der Vibrationen auf die Spermienmotilität, Plasmamembranintegrität sowie die Thermoresistenz festgestellt werden (Schulze et al. 2018; Hafemeister et al. 2023). In zwei Studien zeigte sich weiter eine Veränderung des pH-Wertes in der Besamungsportion nach simuliertem Transport (Schulze et al. 2018; Tamanini et al. 2022). Auch die Verdünnung des Eberspermas in einem Langzeit- gegenüber einem Kurzzeitverdünner resultierte nicht in einer besseren Kompensation von spermatologisch sichtbaren Qualitätsverlusten während des Transportes (Paschoal et al. 2021; Tamanini et al. 2022).

Die durch das Fahren auf Straßen entstehenden Vibrationen (Hafemeister et al. 2022) werden bei konstanten Temperaturbedingungen als maßgebliche Ursache für den gezeigten Abfall der Spermaqualität gesehen (Hafemeister et al. 2023). Vibrationen sind mechanische Schwingungswellen, die von einem Körper erzeugt werden und auf einen anderen Körper übertragen werden können (LärmVibrationsArbSchV 2007). Neben den genannten negativen Einflüssen auf das Sperma, beeinträchtigen Vibrationen ebenfalls Organsimen wie den menschlichen Körper sowie die Haltbarkeit und Qualität verschiedenster Lebensmittel, insbesondere von Früchten und Milch (Warmińska et al. 2006; Ayari et al. 2009; Xu et al. 2021).

In der ersten Studie der nun folgenden drei Veröffentlichungen wird die Eignung zweier Färbemethoden zur Beurteilung des Hengstakrosoms untersucht, um das spermatologische Methodenspektrums der beiden Folgestudien zu erweitern. Anschließend werden die Auswirkungen von Rotation (Studie 2) während der Spermalagerung sowie Vibration während des Spermatransportes (Studie 3) auf die Qualität flüssigkonservierter Besamungsportionen vom Hengst detailliert analysiert sowie diskutiert. Die generierten Ergebnisse und daraus folgende Erkenntnisse tragen dazu bei, neue und angepasste Empfehlungen für die Lagerung und den Transport von Besamungsportionen vom Hengst zu geben.

2. Publikation 1

**“Assessment of the stallion sperm acrosome in two different extenders:
Spermac stain in comparison with PNA/PSA/PI triple-staining”**

Publiziert in *Reproduction in Domestic Animals* (2023) 58(9):1330-33.

DOI: 10.1111/rda.14426

Hannah Dierberger, Laura Pieper, Markus Jung, Martin Schulze¹

*Institute for Reproduction of Farm Animals Schönow, Bernauer Allee 10, D-16321
Bernau, Germany*

¹Corresponding author. E-mail address: m.schulze@ifn-schoenow.de (M. Schulze).

3. Publikation 2

“Rotation of liquid-preserved artificial insemination doses on roller benches affects sperm quality during storage in stallions”

Publiziert in *Reproduction in Domestic Animals* (2023), 58(10):1413-19.

DOI: 10.1111/rda.14456

Hannah Dierberger, Laura Pieper, Markus Jung, Martin Schulze¹

Institute for Reproduction of Farm Animals Schönnow, Bernauer Allee 10, D-16321 Bernau, Germany

¹Corresponding author. E-mail address: m.schulze@ifn-schoenow.de (M. Schulze)

4. Publikation 3

“Vibration emissions affect the quality of liquid-preserved AI doses in stallions”

Publiziert in *Theriogenology* (2024), 218:1-7.

DOI: 10.1016/j.theriogenology.2024.01.018

Hannah Dierberger, Laura Pieper, Markus Jung, Martin Schulze¹

Institute for Reproduction of Farm Animals Schönnow, Bernauer Allee 10, D-16321 Bernau, Germany

¹Corresponding author. E-mail address: m.schulze@ifn-schoenow.de (M. Schulze)

5. Diskussion

Zuchthengste sind der zentrale Dreh- und Angelpunkt eines jeden Pferdezuchtprogrammes. Während beispielsweise in Programmen der Englischen Vollblutzucht der Einsatz der Hengste strengen Regularien unterliegt und nur der Natursprung als Bedeckungsart zugelassen ist, gründen die Zuchtprogramme vieler anderer Rassen fast ausschließlich auf dem Einsatz der Künstlichen Besamung (de Oliveira und Aurich 2021). Dies bietet den Vorteil, dass Hengste für eine große Anzahl an Stuten pro Jahr eingesetzt werden können, ohne dabei einer zu großen körperlichen Anstrengung ausgesetzt zu sein (de Oliveira und Aurich 2021). Eine fachgerechte Gewinnung der Ejakulate sowie eine ovulationsnahe Künstliche Besamung der Stute sind Grundvoraussetzungen für die Befruchtung der Eizelle. Auf dem Weg zum Trächtigkeitserfolg sind jedoch nicht alle Faktoren beeinflussbar, wozu unter anderem die individuelle Fertilität von Hengst und Stute zählen (Katila et al. 2010). Allerdings lassen sich durch optimale Spermagewinnung, -verarbeitung, -lagerung und einen nachfolgenden schonenden Transport der Besamungsportionen viele Defizite zumindest teilweise kompensieren. Zusätzlich sollte die Wichtigkeit einer sorgfältigen Spermaanlyse nicht außer Acht gelassen werden (Love 2011), da diese im Falle von Mängeln in der Spermaqualität Ansatzpunkte zur Optimierung liefert und damit maßgeblich zur Maximierung des Besamungserfolges beiträgt.

5.1 Analyse in Publikation 1

Zur Erweiterung des spermatologischen Methodenspektrums wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Eignung zweier Färbemethoden zur Visualisierung und Beurteilung des Akrosoms des Hengstes anhand von 126 Spermaproben untersucht. Zum einen wurde die Spermac[®] Färbung verwendet, welche auf drei Farbstoffen basierte (A: Rose Bengal, Neutral Rot; B: Pyronin Y, Orange G, Phosphormolybdän-säure; C: Janusgrün, Echtgrün FCF) und zum anderen eine fluoreszenzbasierte Dreifachfärbung bestehend aus PI, FITC-PNA und FITC-PSA. Während die Auswertung der gefärbten Proben der Spermac[®] Färbung lichtmikroskopisch durch eine geschulte Fachkraft erfolgte, wurden die fluoreszenzbasiert gefärbten Spermaproben durchflusszytometrisch analysiert. Beide Methoden wurden anschließend hinsichtlich ihrer Übereinstimmung in der erfassten Anzahl nicht intakter

Akrosomen untereinander verglichen und darüber hinaus in ihrer Anwendbarkeit für zwei verschiedene Hengstpermaverdünner evaluiert. Der erste Verdünner basierte auf der standardisierten Zusammensetzung von aufgereinigten Milchbestandteilen wie Caseinaten und verschiedenen Zuckern (EquiPlus, Minitüb GmbH, Deutschland). Der zweite Verdünner beinhaltete die biologischen Produkte Eigelb sowie Milch und war folglich in seiner Komposition nicht standardisiert (Gent, Minitüb GmbH, Deutschland). Beide Verdünner enthielten den antimikrobiellen Wirkstoff Gentamicin und waren für die Lagerung von flüssigkonservierten Besamungsportionen für drei Tage bei 5 °C ausgelegt.

5.1.1 Methodenvergleich zur Bestimmung nicht intakter Akrosomen

Die dem Methodenvergleich zugrundeliegenden Daten basieren auf der Analyse von 126 Spermaproben aus 18 Ejakulaten von drei verschiedenen Hengsten. Um eine quantitativ umfangreiche Spannbreite akrosomenreagerter Spermien abzubilden, wurden die flüssigkonservierten Besamungsportionen für 4 h bis 240 h, mit einem Durchschnitt von $63,8 \pm 48,9$ h, bei 5 °C gelagert. Dies führte dazu, dass die Übereinstimmung beider Färbemethoden sowohl für sehr geringe als auch für hohe Zahlen reagierter Akrosomen überprüft werden konnte. Daraus resultierte eine verminderte Verzerrung der Methodenübereinstimmung durch möglicherweise divergierende Ergebnisse, je nach Anteil defekter Akrosomen in der Spermaprobe. Obwohl die Kapazitation und Akrosomenreaktion in flüssigkonservierten Spermaportionen ohne zusätzliche Stimulation auftreten können (Pommer et al. 2002), lässt sich die Akrosomenreaktion *in vitro* zusätzlich mit verschiedensten Stoffen und geeigneten Medien auslösen. An dieser Stelle sind Calciumionophor und Progesteron als solche zu nennen (McPartlin et al. 2008). Auf eine zusätzliche Stimulation von Kapazitation oder Akrosomenreaktion wurde in der hier vorliegenden Arbeit allerdings verzichtet.

Für den durchgeführten Methodenvergleich wurden statistische Verfahren gewählt, welche speziell für diesen Zweck entwickelt wurden: der Konkordanzkorrelationskoeffizient (KKK) (Lin 1989) und der Intraklassenkorrelationskoeffizient (IKK) (Perinetti 2018). Zusätzlich wurde die Datenübereinstimmung graphisch mit einem Bland-Altman-Plot beurteilt (Bland und Altman 1986). Nach eingehender Analyse konnte

anhand der Einteilung von Koch und Spörl (2007) für den KKK eine starke Korrelation zwischen den Färbemethoden für EquiPlus festgestellt werden, allerdings zeigte sich die Übereinstimmung als eher schwach für den Verdünner Gent. Ein ähnliches Resultat ließ sich mittels IKK erzielen, wobei nach Cicchetti und Sparrow (1981) die Übereinstimmung für EquiPlus exzellent und lediglich mittelmäßig für Gent war. Diese geringere Übereinstimmung der Messmethoden für Gent lässt sich teilweise in der erschwerten Interpretierbarkeit der Proben, durch im Verdünner enthaltene Eigelbbestandteile, erklären. Die Spermac[®]-gefärbten Ausstriche zeigten für mit Gent verdünnte Spermaproben eine deutlich höhere Schlierenbildung im Gegensatz zu Ausstrichen von EquiPlus. Diese Schlieren waren durch Bestandteile der Färbung überwiegend deutlich dunkelgrün gefärbt, was in Überlagerungsartefakten mit Spermien resultierte und die Beurteilung des einzelnen Akrosoms deutlich erschwerte. Obwohl nur Spermien in die Bewertung mit einbezogen wurden, die im Ganzen zu beurteilen waren und deren Akrosom überlagerungsfrei sichtbar war, ist es denkbar, dass die generell schlechtere Qualität der Gent Ausstriche zu einer geringeren Übereinstimmung der beiden Färbemethoden geführt haben könnte.

Interessanterweise konnte in Spermaproben, welche mit Gent flüssigkonserviert wurden, eine signifikant höhere Anzahl nicht intakter Akrosomen mittels Spermac[®] Färbung detektiert werden als mit der fluoreszenzbasierten Dreifachfärbung, wohingegen in mit EquiPlus verdünntem Sperma mehr defekte Akrosomen mittels Durchflusszytometrie als mit der Spermac[®] Färbung messbar waren. Für diese Differenz kann mit großer Wahrscheinlichkeit wiederholt die Qualität der Ausstriche, welche für die Spermac[®] Färbung angefertigt wurden, verantwortlich gemacht werden. Das in Gent enthaltene Eigelb verfälschte möglicherweise die Auszählung, wohingegen die als blass einzustufenden Ausstriche von EquiPlus ebenfalls zu einer falschen Beurteilung nicht intakter Akrosomen geführt haben könnten.

Auch in anderen Studien wurde berichtet, dass die Genauigkeit von konventionellen Färbemethoden, wie unter anderem der Spermac[®] Färbung, gering war und folglich zu hoher Variabilität in den Ergebnissen führte (Brito et al. 2011; Runcan et al. 2014). Des Weiteren dürfen eigelbbasierte Artefakte in der Durchflusszytometrie als zugrundeliegende Ursache für die gezeigten Differenzen nicht außer Acht gelassen werden. Die Autofluoreszenz der Eigelbbestandteile kann zu vermehrt positiven

Signalen führen (Martínez-Pastor et al. 2010), welche mit denen akrosomenreagierter Spermien gleichzusetzen sind. Da in dieser Studie dagegen weniger reagierte Akrosomen mittels Durchflusszytometrie für Gent detektiert wurden, ist diese Ursache als eher unwahrscheinlich zu betrachten.

Ein Nachteil von subjektiven Untersuchungsmethoden, wie der Mikroskopie, gegenüber objektiven Methoden, wie der Durchflusszytometrie, ist die hohe Einflussnahme der untersuchenden Person auf die Ergebnisse (Brito et al. 2011). Darüber hinaus ist die Übereinstimmung der erzielten Ergebnisse zwischen verschiedenen Personen sehr inkonstant (Brito et al. 2011), allerdings wurde dieser potenziell verzerrende Faktor in der vorliegenden Studie durch die Beurteilung aller Proben von derselben geschulten Person ausgeschlossen.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Spermac[®]-gefärbten Ausstriche stark in ihrer Qualität variierten und deshalb nur schwer zu beurteilen waren. Aus diesem Grund ist die durchflusszytometrische Analyse PI/PNA/PSA gefärbter Spermien der Verwendung konventioneller Färbemethoden mit anschließender mikroskopischer Beurteilung für die Untersuchung des akrosomalen Status von Hengstspermien vorzuziehen und wurde deshalb in den Folgestudien verwendet. Darüber hinaus wird anhand dieser Studie der hohe Einfluss des Spermaverdünners auf das Messergebnis verdeutlicht. Dies sollte bei der Durchführung spermatologischer Laboranalysen berücksichtigt werden und erfordert möglicherweise ein angepasstes Untersuchungsprotokoll für einzelne Verdüner.

5.2 Analyse in Publikation 2

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Lagerung flüssigkonservierter Besamungsportionen bei 5 °C auf einer Rollbank hinsichtlich der Eignung der Rollbank und ihres Effektes auf die Spermaqualität untersucht. Dafür wurden 15 Ejakulate von drei verschiedenen Hengsten in einem *Split-sample* Verfahren jeweils mit den beiden Verdünnern EquiPlus sowie Gent verdünnt und anschließend auf drei Gruppen pro Ejakulat und Verdünner aufgeteilt. Gruppe A diente als Kontrollgruppe und wurde ohne Rotation für insgesamt vier Tage bei 5 °C gelagert, während Gruppe B und Gruppe C bei 5 rpm beziehungsweise 36 rpm auf einer Rollbank, ebenfalls bei 5 °C, gelagert wurden. Über die gesamte Lagerungszeit erfolgte eine Kontrolle der Spermaqualität

mittels erweitertem Methodenspektrum, bestehend aus Motilitätsanalysen, einem TRT, der morphologischen Spermienbeurteilung, der durchflusszytometrischen Analysen von Membran-, Akrosomenintegrität und mitochondrialer Aktivität der Spermien sowie pH-Messungen. Den spermatologischen Untersuchungen schloss sich die Datenauswertung über ein verallgemeinertes lineares gemischtes Modell (Generalized linear mixed model, GLMM) an.

5.2.1 Einfluss der Rollbanklagerung auf die Spermaqualität

Bei der Lagerung von Hengstsperma sollte das Hauptaugenmerk auf einem möglichst schonenden Umgang mit den Spermaportionen liegen, wobei schädigende Umwelteinflüsse auf ein Minimum zu reduzieren sind. Bereits bei der Verarbeitung des Ejakulates sind alle Gegenstände, mit denen die Spermien in Kontakt kommen, zu erwärmen und sauber sowie frei von toxischen Bestandteilen zu halten (Katila 1997). Zur optimalen Lagerung von flüssigkonservierten Spermaportionen sollte ebenfalls die in dieser Studie untersuchte Rollbanklagerung beitragen. Daten über die Hintergründe einer Rollbanknutzung sind jedoch rar und es mangelt an neueren Studien, welche den postulierten positiven Effekt der Rollbank auf die Spermaqualität bestätigen. Es finden sich einige internationale Publikationen, die eine Empfehlung zur Rollbanklagerung aussprechen, allerdings ohne diese hinreichend zu begründen (Malmgren et al. 1994; Katila 1997; Parlevliet und Colenbrander 1999).

In einer älteren Dissertation aus dem Jahre 1992 wurde unter anderem die Rollbanklagerung und deren potenzielle Auswirkung auf die Spermienmotilität untersucht (Hagedorn 1992). Hagedorn verglich Spermaportionen, verdünnt mit einem Magermilchverdünner beziehungsweise einem Eidotter-Glycin Verdünner, hinsichtlich ihrer geschätzten progressiven Motilität und konnte in einem Vorversuch einen verminderten Abfall der Spermienmotilität bei Proben des Eidotter-Glycin Verdünners gelagert bei 50 rpm im Vergleich zu einer ruhenden Kontrollgruppe zeigen. Diese Ergebnisse ließen sich im Hauptversuch jedoch nicht bestätigen und auch ein positiver Effekt auf in Magermilchverdünner gelagertes Sperma konnte zu keinem Zeitpunkt der Studie gezeigt werden (Hagedorn 1992). Hagedorn sah den, durch das Rollen ständig sichergestellten, optimalen Kontakt zwischen Spermium und Verdünnerbestandteilen als eine Ursache für die verbesserte Spermienmotilität und sprach ergänzend von

einer verminderten Spermienagglutination in Portionen, die auf der Rollbank gelagert wurden.

Wie sich nach insgesamt fünf Versuchswochen in der Studie dieser Arbeit herausstellte, wirkte sich die Rollbank nicht positiv auf den Erhalt der Spermaqualität während der Lagerung aus, sondern führte zu einem signifikanten Abfall der Gesamtspermienmotilität von gerollten Spermaportionen verglichen mit der Kontrollgruppe. Signifikante Unterschiede konnten nach drei und vier Tagen Lagerungszeit zwischen ruhenden Portionen und Portionen, die bei 5 rpm oder 36 rpm gelagert wurden, gezeigt werden. Paarweise Vergleiche ergaben einen Motilitätsunterschied von $6,1 \pm 2,3$ Prozentpunkten (PP) für 5 rpm beziehungsweise $5,8 \pm 2,3$ PP für 36 rpm gegenüber der Kontrollgruppe an Tag drei der Lagerung. Der Motilitätsunterschied wurde an Tag vier noch deutlicher mit einem Unterschied von $9,3 \pm 2,3$ PP beziehungsweise $10,2 \pm 2,3$ PP von Portionen, die bei 5 rpm oder 36 rpm gelagert wurden. Zusätzlich zeigten rotierte Besamungsportionen eine verminderte Thermoresistenz, was sich ebenfalls in verringerter Motilität nach verlängerter Inkubation der Spermien bei $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ gegenüber ruhenden Besamungsportionen, zeigte.

Ursächlich für diesen Abfall der Spermaqualität *in vitro* könnte möglicherweise das Phänomen der Rheotaxis sein. Die Rheotaxis ist ein Mechanismus, welcher den Spermien im weiblichen Genitaltrakt den Weg in Richtung Eileiter weist und auf der Ausrichtung der Spermien sowie der Bewegung entgegen eines Flüssigkeitsstroms basiert (Miki und Clapham 2013). *In vivo* wird dieses Verhalten durch einen Koitus-induzierten Flüssigkeitsstrom ausgehend vom Eileiter in den Uterus, mit nachfolgendem Calciumeinstrom durch spezielle Calciumkanälen in das Spermium, ausgelöst (Miki und Clapham 2013). Da die Spermienmotilität neben Calcium auch von Adenosintriphosphat (ATP) abhängt (Meyers et al. 2019), ist die Rheotaxis ein aktiver Mechanismus, welcher Energie benötigt und verbraucht. Bei der Rotation von flüssigkeitsgefüllten Objekten entsteht ein Flüssigkeitsstrom (Childs 2010), weshalb es denkbar ist, dass Spermien durch Rotation auf einer Rollbank einem ständigen Flüssigkeitsstrom ausgesetzt sind und folglich Rheotaxis zeigen. Dies wiederum könnte zu einem schnelleren Verbrauch von Energiereserven und dem, in dieser Studie gezeigten, Motilitätsabfall in rotierten Proben führen.

Scherkräfte, welche während der Bewegung der Besamungsportionen auf die Spermien einwirken, sollten ebenfalls berücksichtigt werden. Forschungsarbeiten zeigten, dass Scherkräfte, ausgelöst durch Zentrifugation, einen Anstieg an ROS in Humanspermien verursachten (Aitken und Clarkson 1988; Taherian et al. 2019). Die Scherwirkung einer Rollbank ist sicherlich nicht mit der einer Zentrifuge zu vergleichen, dennoch sollte dieser Aspekt aufgrund der deutlich längeren Anwendungszeit der Rollbank im Vergleich zur Zentrifugation nicht außer Acht gelassen werden. Die statistische Auswertung ergab darüber hinaus einen signifikanten Effekt des Interaktionsterms zwischen Rotationsgeschwindigkeit und Rotationszeit, was den zusätzlich zeitabhängigen, schädigenden Einfluss auf die Spermienmotilität bestätigte.

Die Energieproduktion von equinen Spermien basiert auf der Glykolyse sowie der oxidativen Phosphorylierung (Gibb und Aitken 2016), wobei neben dem Energieträger ATP, zusätzlich eine nicht zu vernachlässigende Menge an potenziell schädigenden Stoffwechselendprodukten wie Laktat und Sauerstoffradikale entstehen (Cuervo-Arango et al. 2015). Obwohl der Stoffwechsel der Spermien während der Niedrigtemperaturlagerung heruntergefahren wird, kommt er nicht gänzlich zum Erliegen. Eine Verringerung des pH-Wertes in flüssigkonservierten Besamungsportionen kann die Funktion zahlreicher Proteine beeinträchtigen, was im Falle von Enzymen der ATP-Produktion zu einer verminderten Energiebereitstellung führen kann (Cuervo-Arango et al. 2015). Da ATP ein essenzielles Substrat für das Flagellum der Spermien ist, resultiert eine verminderte ATP-Bildung in einem Motilitätsabfall (Meyers et al. 2019). In dieser Studie konnte ein signifikanter Abfall des pH-Wertes in Besamungsportionen, die auf der Rollbank gelagert wurden, sowohl für den Verdünner EquiPlus als auch Gent gezeigt werden. Diese pH-Wertänderung kommt aus den genannten Gründen als Ursache für die Verringerung der Spermienmotilität sowie Thermoresistenz von gerollten Portionen in Frage. Interessanterweise konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Rotationsgeschwindigkeiten von 5 rpm und 36 rpm für einen der untersuchten Spermaqualitätsparameter aufgezeigt werden. Dies spricht für einen geschwindigkeitsunabhängigen negativen Einfluss von Rotation, wobei schon geringe Drehzahlen ausreichen, um einen Abfall der Hengstspermaqualität *in vitro* auszulösen.

Da die Plasmamembran von Hengstspermien einen hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren aufweist, wobei im Speziellen Cholesterol zu nennen ist (Aurich 2005), sind

equine Spermien besonders anfällig für oxidative Schäden. Schon geringe Mengen an ROS können die Plasmamembran destabilisieren und kapazitationsähnliche Prozesse auslösen (Aitken und Baker 2004), welche wiederum mit der in dieser Studie angewendeten fluoreszenzbasierten Färbung durchflusszytometrisch detektiert werden konnten. Überraschenderweise wurde jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen gerollten und nicht gerollten Besamungsportionen hinsichtlich ihrer Plasmamembranintegrität, Intaktheit des Akrosoms und der mitochondrialen Aktivität aufgezeigt, obwohl für alle drei genannten Parameter numerische Differenzen zu erkennen waren.

Kritisches Hinterfragen von über Jahre etablierten Verfahren ist von zentraler Wichtigkeit, um dem ständigen Streben nach verbesserter Spermaqualität gerecht zu werden und eine möglichst hohe Auslastung der Ejakulate zu erreichen. Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle festhalten, dass die Lagerung flüssigkonservierter Besamungsportionen vom Hengst mit Hilfe einer Rollbank einen negativen Einfluss auf die Spermaqualität *in vitro* hatte, was sich in verringerter Spermienmotilität, verminderter Thermoresistenz und einem pH-Wertabfall widerspiegelte. Um zu evaluieren, ob der gezeigte Spermaqualitätsabfall auch mit verminderten Trächtigkeitsraten *in vivo* einhergeht, sind weitere Feldversuche nötig. Auf Grundlage der hier beschriebenen Studienergebnisse sollte die Verwendung einer Rollbank während der Lagerung von Hengstsperma nicht mehr als vorteilhaft betrachtet werden und kann folglich auch nicht weiter als Maßnahme zur Spermaqualitätserhaltung während der Lagerung empfohlen werden.

5.2.2 Einfluss des Verdünners während der Lagerung

In der vorgestellten Studie zur Rollbanklagerung von Hengstsperma erreichten beide Hengstspermaverdünner EquiPlus und Gent eine zufriedenstellende Konservierung der Spermaqualität für drei Tage. Die statistische Auswertung mittels GLMM ergab keine signifikanten Unterschiede in der Spermienmotilität sowie Thermoresistenz zwischen den Verdünnern, woraus abgeleitet werden kann, dass beide Verdüner für den Erhalt der Spermienmotilität gleichermaßen geeignet waren. Für die durchflusszytometrisch erhobenen Qualitätsindikatoren Plasmamembranintegrität, Intaktheit der Akrosomen und mitochondriale Aktivität erzielte Gent durchweg

signifikant bessere Werte als EquiPlus. Mit Blick auf die Zusammensetzung der beiden Verdünner könnten einerseits die exzellenten membranprotektiven Eigenschaften des in Gent enthaltenen Eigelbs als Erklärung dienen (Bustani und Baiee 2021). Andererseits stellte sich Gent nur in der Durchflusszytometrie als überlegen dar, weshalb auch die Möglichkeit eines eigelbbasierten Artefaktes in Betracht gezogen werden sollte. Eigelbbestandteile sind in durchflusszytometrischen Analysen als problematisch einzustufen, da sie eine eigene Autofluoreszenz besitzen, welche sich mit den Signalen der Spermien überlagern kann (Martínez-Pastor et al. 2010). Dieses Artefakt kann auch durch sehr akkurates Selektieren der Spermisignale nicht gänzlich ausgeschlossen werden (Martínez-Pastor et al. 2010). Zusätzlich kann Eigelb mit Fluoreszenzfarbstoffen interferieren, was möglicherweise ebenfalls zu inkorrekt er Signal detektion führt (Hossain et al. 2011). Aus den genannten Gründen sollten Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Spermauntersuchung immer hinsichtlich ihrer Plausibilität hinterfragt werden, sobald Eigelbbestandteile Teil der zu untersuchenden Probe sind.

Die Verdünnerentwicklung hat sich in den letzten Jahren immer weiter in die Richtung von Verdünnern mit standardisierter Zusammensetzung ausgerichtet und von biologischen Bestandteilen wie Magermilch oder Eigelb weitestgehend entfernt. Vorteilhaft hierbei ist die Vermeidung erheblicher Unterschiede zwischen einzelnen Verdünnerchargen (Pagl et al. 2006), was zu einer stabileren Konservierung der Spermaqualität beiträgt. Des Weiteren bergen biologische Bestandteile das Risiko einer Kontamination der Verdünner (De Ruigh et al. 2006), woraus eine potenzielle Gefahr für die Gesundheit von Mensch und Tier sowie die Spermaqualität resultiert. Nach Angaben des Herstellers beinhaltet Gent sowohl Eigelb als auch Milch und ist daher von den aufgeführten Einflussfaktoren der variierenden Zusammensetzung und Biosicherheit betroffen, wohingegen EquiPlus standardisiert zusammengesetzt ist.

Unter Berücksichtigung aller Argumente lässt sich zusammenfassen, dass beide Hengstspermaverdünner gleichermaßen für die Aufrechterhaltung der Spermienmotilität geeignet waren. Obwohl in Gent verdünntes Sperma eine höhere Plasmamembran- und Akrosomenintegrität sowie mitochondriale Aktivität aufwies, sollte dies kritisch interpretiert werden. Mit Blick auf die Inhaltsstoffe der beiden

Hengstpermaverdünner ist EquiPlus gegenüber Gent zu präferieren, da dieser eine standardisierte, biologisch sichere Zusammensetzung aufweist.

5.3 Analyse in Publikation 3

Im dritten Teil dieser Arbeit erfolgte anhand von 30 Ejakulaten 17 verschiedener Zuchthengste eine Charakterisierung der Auswirkungen eines simulierten Straßentransportes auf die Qualität flüssigkonservierter Besamungsportionen. In sechs aufeinanderfolgenden Versuchswochen wurde Hengstperma nach erfolgter Flüssigkonservierung mit den Hengstpermaverdünnern EquiPlus oder Gent für 3 h, 6 h oder 9 h bei 5 °C Vibrationen ausgesetzt, welche Erschütterungen während des Transport mittels Kurierdienst auf einer Straße mit unebenem Asphalt simulierten. In denen auf die Transportsimulation folgenden vier Tagen erfolgte eine spermatologische Beurteilung aller Besamungsportionen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die ohne Vibration bei 5 °C gelagert wurde. Teil des spermatologischen Methodenspektrums waren die Motilitätsanalyse mittels CASA, der TRT, die Beurteilung des Membran-, Akrosomen- und Mitochondrienstatus der Spermien mittels Durchflusszytometrie sowie die pH-Wertmessung. Der Fokus der nachfolgenden statistischen Auswertung mit Hilfe eines GLMMs lag auf dem Einfluss der Transportdauer auf die Qualität der Besamungsportionen, der Kapazität der beiden Hengstpermaverdünner etwaige Qualitätsverluste zu kompensieren und auf der individuellen Resistenz des Spermas eines jeden Hengstes gegenüber den simulierten Transporteinflüssen.

5.3.1 Einfluss des Transportes auf die Spermaqualität

Der Transport von Besamungsportionen ist in der heutigen Zeit unabdingbar und eine jede Hengststation wird mit den Herausforderungen eines optimalen und qualitätsschonenden Spermatransportes konfrontiert. Es gilt nicht nur auf witterungsbedingte Umwelteinflüsse zu achten (Brinsko et al. 2000), sondern auch geographische Gegebenheiten zu berücksichtigen. Während Hengstperma in Ländern mit besonders großer Fläche über den Luftweg versendet wird (Newcombe und Cuervo-Arango 2011), dominiert in Deutschland der Transport über das ausgedehnte Straßennetz. Einige Kurierdienste haben sich auf den Straßentransport

von Besamungsportionen spezialisiert (Katila 1997) und ermöglichen Transporte über teils weite Strecken. Daraus resultieren unterschiedliche Transportzeiten, weshalb in dieser Arbeit die Auswirkung von Transporten mit einer Dauer von 3 h, 6 h und 9 h untersucht wurde. Deutschland verfügt in weiten Teilen des Landes über ein exzellent ausgebautes Autobahnnetz mit guter Straßenqualität. Einige Hengststationen und besonders Stutenhaltungen liegen jedoch oftmals nicht in direkter Nähe zu Autobahnen oder Schnellstraßen und sind deshalb nur über ländliche Straßen mit teilweise schlechter Fahrbahnqualität zu erreichen. Gepaart mit der Tatsache, dass mehrere Hengststationen beziehungsweise Stutenhaltungen nacheinander angefahren werden, resultiert dies in einer längeren Transportdauer der Besamungsportionen über tendenziell schlechtere Fahrbahnen, trotz des generell hohen Qualitätsstandards deutscher Straßen.

Die statistische Auswertung der Studie zum Transport von Besamungsportionen ergab eine signifikant verringerte Gesamtmotilität der Hengstpermien, welche für 6 h und 9 h der Transportsimulation unterzogen wurden, gegenüber der nicht transportierten Kontrollgruppe. Ähnliche Ergebnisse waren nach dem TRT zu erkennen, wobei ebenfalls Hengstpermaportionen nach 6 h und 9 h Transport eine geringere Motilität im Vergleich zu 0 h Transport aufwiesen. Eine Transportzeit von 3 h beeinflusste weder die Spermienmotilität noch die Thermoresistenz.

In den letzten Jahren erfolgte intensive Forschung zu den Einflüssen von Transport auf flüssigkonservierte Eberspermaportionen, wobei baugleiche beziehungsweise vergleichbare Labormischgeräte zur Transportsimulation wie in dieser Studie genutzt wurden und ähnliche Ergebnisse aufgezeigt werden konnten. Aus vorangegangenen Studien mit Ebersperma resultierte, dass die Spermienmotilität durch transportbedingte Vibrationen beeinträchtigt wurde und dies schon bei Vibrationsintensitäten, vergleichbar mit denen die beim Fahren auf Straßen mit sehr guter Asphaltqualität entstehen, nachweisbar war (Schulze et al. 2018; Paschoal et al. 2021; Tamanini et al. 2022; Hafemeister et al. 2023). Neben steigender Vibrationsintensität beeinträchtigte eine zunehmende Transportdauer ebenfalls die Spermienmotilität (Hafemeister et al. 2023). Auch nach Simulation der Temperaturverhältnisse im weiblichen Genitaltrakt mittels TRT zeigte sich eine verminderte Qualität transportierter Portionen verglichen mit ruhenden (Schulze et al. 2018; Hafemeister et al. 2023).

Ursächlich für diesen Motilitätsabfall könnte, wie bereits bei der Rollbanklagerung von Hengstsperma erwähnt, das Phänomen der Rheotaxis sein. Hafemeister et al. (2023) vermuteten eine transportbedingte Flüssigkeitsbewegung in den Besamungsportionen, welche durch die ständig einwirkenden Vibrationen entsteht, als auslösenden Stimulus für die Rheotaxis der Spermien. Dies würde wiederum zu einem verfrühten Verbrauch von Energiereserven führen und einen Motilitätsabfall nach sich ziehen, der über den während der Lagerung ohnehin auftretenden Qualitätsverlust hinausgeht (Hafemeister et al. 2023).

Weiter werden oxidative Schäden als zugrundeliegender Mechanismus in Betracht gezogen. Spermien sind bestrebt die Balance zwischen unvermeidbarer Produktion von ROS und gleichzeitiger antioxidativer Abwehr aufrecht zu erhalten (Baumber et al. 2000). Gerät dieses System aus dem Gleichgewicht, ist die Funktionalität und Lebensfähigkeit der Spermien beeinträchtigt (Baumber et al. 2000). Studien mit Humansperma zeigten, dass Schritte der Spermaverarbeitung wie beispielsweise die mechanische Durchmischung von Proben einen Anstieg von ROS bedingten (Vessey et al. 2014), weshalb die Annahme naheliegt, vibrationsbedingte Bewegung der Besamungsportionen könnte einen ähnlichen Effekt haben. Agarwal et al. (1994) fanden ergänzend heraus, dass mehrmaliges Waschen, bestehend aus Zentrifugation und Resuspension von humanen Spermien, zu vermehrter ROS Produktion und gleichzeitig verminderter Motilität führte, welche wiederum in der Verarmung von interzellulärem ATP begründet war (De Lamirande und Gagnon 1992). Interessanterweise konnte diese Beobachtung nur bei guter, nicht jedoch bei schlechter Spermaqualität gemacht werden, was darauf schließen lässt, dass besonders hochmotile humane Spermien durch die Spermaverarbeitung beeinträchtigt wurden (Agarwal et al. 1994). Oxidativer Stress bedingte ebenfalls einen Motilitätsverlust von Hengstspermien (Baumber et al. 2000; Martin Muñoz et al. 2015), weshalb dies als zugrundeliegender Mechanismus für die verminderte Motilität in Besamungsportionen nach erfolgter Transportsimulation denkbar ist.

Überraschenderweise zeigte sich in dieser Studie weder in der Intaktheit der Plasmamembran beziehungsweise des Akrosoms noch in der mitochondrialen Aktivität der Spermien ein Unterschied zwischen transportierten und nicht transportierten Besamungsportionen. Dem gegenüber stehen zwei Forschungsarbeiten aus der

Eberspermatologie, welche vermehrt Plasmamembran- und Akrosomenschäden nach simuliertem Transport von Spermaportionen feststellten (Schulze et al. 2018; Hafemeister et al. 2023). Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch könnten die genutzten Spermaverdünner darstellen. In beiden Arbeiten zu Ebersperma wurde ein einfacher Kurzzeitverdünner verwendet, wohingegen beide Hengstspermaverdünner dieser Studie zusätzliche membranprotektive Bestandteile, insbesondere Eigelb und Casein, aufwiesen. Ein robusterer Verdünner trägt so möglicherweise dazu bei, den negativen Einfluss von Erschütterungen auf die Spermienmembran zu mildern. Baumber et al. (2000) beschrieben in einer Studie weiter, dass die Spermienmotilität von Hengsten ein sensitiverer Indikator für oxidativen Stress war, als durch Lipidperoxidation entstehende Membranschäden. Dies könnte folglich den fehlenden Unterschied in der Intaktheit der Plasma- und Akrosomenmembran zwischen den Hengstbesamungsportionen der Kontrollgruppe und den Gruppen nach Transportsimulation erklären, obwohl signifikante Unterschiede in der Spermienmotilität bestanden.

Die pH-Wertmessungen ergaben einen signifikanten Abfall des pH-Wertes in den Besamungsportionen nach 6 h und 9 h Transport. Eine Transportdauer von 3 h nahm keinen Einfluss auf den pH-Wert, was bereits im Rahmen der Motilitätsanalysen gezeigt werden konnte. Eine vibrationsbedingte pH-Wertverschiebung wurde ebenfalls nach Transportsimulation von Eberspermaportionen sichtbar, allerdings war hier eine Erhöhung des pH-Wertes festzustellen (Schulze et al. 2018). Dieser Unterschied lässt sich durch die verschiedenen Puffersysteme der jeweiligen Spermaverdünner erklären. Während der verwendete Eberspermaverdünner auf einem Bicarbonatpuffer basierte und der Übergang von Kohlenstoffdioxid in die, in den Portionen enthaltene, Luft somit zu einer Alkalisierung in der Spermaportion führte, beinhaltete EquiPlus einen Aminosäurenpuffer. Das genaue Puffersystem von Gent war nicht bekannt. Ein verminderter pH-Wert in Besamungsportionen kann durch die Beeinträchtigung enzymatischer Systeme zu einem Motilitätsabfall der Spermien beitragen (Cuervo-Arango et al. 2015; Meyers et al. 2019). Der in dieser Studie gemessene pH-Unterschied war zwar signifikant, allerdings sehr gering, weshalb diese Ursache möglicherweise eine eher untergeordnete Rolle hinsichtlich des beobachteten Motilitätsverlust nach 6 h und 9 h Transport spielte.

Eine dagegen durchaus plausiblere Erklärung für den beobachteten Spermaqualitätsverlust nach der Transportsimulation in Studie 3, liefert eine vibrationsbedingte Veränderung der Verdünnerstruktur. Die Lebensmittelindustrie beschäftigt sich seit Jahren mit den Auswirkungen von transportbedingten Vibrationen auf die Lebensmittelqualität und eine Forschungsarbeit fand heraus, dass sich die Proteine von Rohmilch proportional mit ansteigender Vibrationsintensität zersetzen (Czerniewicz et al. 2006). Insbesondere die Struktur von Mizellen wurde durch Vibration aufgebrochen und deren Größe verändert (Czerniewicz et al. 2006; Warمیńska et al. 2006). Da sich Caseinmizellen positiv auf die Qualität von Hengstsperma während der Lagerung bei 4 °C auswirken (Batellier et al. 1997), könnte eine Veränderung der in EquiPlus enthaltenen Caseinmizellen zum Verlust einiger protektiver Eigenschaften des Verdünners geführt haben und den beobachteten vibrationsbedingten Abfall der Hengstspermaqualität in dieser Studie erklären. Die Proteinbestandteile von Gent könnten ebenfalls von einer transportbedingten Degradation betroffen gewesen sein.

Abschließend lässt sich feststellen, dass der Transport von Besamungsportionen vom Hengst eine kritische Phase für den Erhalt der Spermaqualität darstellt. Kurze Transportzeiten und vibrationsarme Transportwege sind von größter Wichtigkeit um möglichst ressourcen- sowie qualitätsschonend zu agieren und tragen dazu bei, ein hochqualitatives Endprodukt für die Pferdezucht zu garantieren.

5.3.2 Kompensation der Transportauswirkungen durch den Verdünner

Der Hengstspermaverdünner EquiPlus zeigte sich in allen untersuchten Spermaparametern der Studie zu vibrationsassoziierten Transportauswirkungen auf die Qualität von Besamungsportionen signifikant überlegen im Vergleich zu Gent. Wird jedoch für jeden Hengst einzeln exemplarisch die absolute Differenz der Spermienmotilität nach Inkubation für 120 Minuten im TRT zwischen der Gruppe die 0 h und der Gruppe die 9 h transportiert wurde betrachtet, so lässt sich graphisch ein geringerer Abfall der Spermienmotilität für Gent erkennen. Da die gemessenen Motilitätswerte für Gent bereits ohne Transportsimulation unter denen für EquiPlus lagen, ist diese Beobachtung allerdings von untergeordneter Relevanz.

Weiter hatte der Verdünnertyp zwar einen signifikanten Einfluss auf die einzelnen Spermaqualitätsparameter, der Interaktionsterm zwischen Transportdauer und Verdünner war im dazugehörigen GLMM hingegen nicht signifikant. Folglich ist keiner der beiden Verdünner in der Lage, den vibrationsbedingten Spermaqualitätsabfall besser zu kompensieren als der andere. Unterstützt wird diese Beobachtung durch eine Studie von Tamanini et al. (2022), in der ein Langzeitverdünner verglichen mit einem Kurzzeitverdünner für Ebersperma den Effekt einer langen Transportzeit auf die Spermaqualität ebenfalls nicht mindern konnte.

Der Verdünnervergleich hat zusammenfassend ergeben, dass sich EquiPlus und Gent in ihrer Eigenschaft, den Abfall der Hengstspermaqualität während des Transportes zu minimieren, nicht unterscheiden, wohingegen in EquiPlus verdünntes Sperma durchweg bessere Ergebnisse in den spermatologischen Analysen erzielte. Wie schon in Abschnitt 5.2.2 diskutiert, ist EquiPlus darüber hinaus aufgrund seiner standardisierten Zusammensetzung und höheren biologischen Sicherheit gegenüber Gent zu präferieren.

5.3.3 Hengstindividuelle spermatologische Toleranz von Transportstress

Der individuelle Einfluss eines jeden Hengstes auf die Spermaqualität wurde in dieser Studie sehr deutlich. So war der Hengsteffekt für sämtliche der untersuchten Spermaparameter signifikant und es konnten große interindividuelle Unterschiede festgestellt werden. Seit vielen Jahren ist die hohe Hengstspezifität hinsichtlich der Toleranz von spermatologischen Verfahren, insbesondere der Kryokonservierung (Tischner 1979), bekannt. Dies ließ sich in der vorgestellten Studie ebenfalls für die individuelle Toleranz von vibrationsbedingtem Transportstress aufzeigen. Während die Besamungsportionen einiger Hengste auch nach 9 h Transport in ihrer Qualität nahezu unverändert waren, fiel die Spermienmotilität anderer Hengste nach 9 h Transport um bis zu 15,9 PP gegenüber den nicht transportierten Portionen ab. Mittelt man den Motilitätsabfall über alle 17 Hengstejakulate, die für die Studie herangezogen wurden, so sind die Qualitätseinbußen zwar signifikant, scheinen in ihrer Höhe allerdings eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Angesichts der Tatsache, dass meist nur ein einzelner Hengst für die Bedeckung der Stute während einer Zuchtsaison ausgewählt wird, ist die individuelle Toleranz der Spermien gegenüber dem Transport

hingegen von hoher Relevanz, da die Spermienmotilität der Hengste direkt mit dem späteren Trächtigkeitserfolg korreliert (Love 2011).

Eine zugrundeliegende Erklärung für die variierende interindividuelle Toleranz von Stressoren könnte eine unterschiedliche Membranzusammensetzung der Hengst-spermien sein. Der Cholesterolanteil der Hengst-spermienmembran wirkte sich unter anderem auf die Eignung des Spermas zur Gefrierkonservierung aus und bestimmte die osmotische Toleranz der Spermien (Moore et al. 2005; Oldenhof et al. 2015). Weiter konnten Macías García et al. (2011) zeigen, dass Spermien verschiedener Hengste ein unterschiedliches Fettsäuremuster aufwiesen, was sich direkt auf die Anfälligkeit der Spermien für oxidative Schäden auswirkte. Schulze et al. (2018) vermuteten eine variierende Plasmamembranfluidität, welche unmittelbar von der Lipidzusammensetzung der Membran abhängt, als Ursache für interindividuelle Unterschiede in der Resistenz gegenüber vibrationsbedingten Spermaqualitätsverlusten beim Eber. Die genannten Begründungen sind ebenfalls als zugrundeliegende Erklärung für den variierenden Qualitätsabfall nach der Transportsimulation zwischen einzelnen Hengsten denkbar.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die hengstindividuelle spermatologische Toleranz von transportassoziierten Erschütterungen stark variierte und dies, im Falle von großen Entfernungen zwischen Hengststation und Stute, möglicherweise bei der Auswahl eines bestimmten Hengstes berücksichtigt werden sollte.

5.4 Fazit

Ein reibungsloser Ablauf, beginnend bei der Gewinnung von Hengstejakulaten über die spermatologische Analyse sowie Lagerung und Transport von Besamungsportionen bis hin zur Künstlichen Besamung, trägt zusammen mit der individuellen Fruchtbarkeit von Hengst und Stute maßgeblich zum Trächtigkeitserfolg bei. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen betonen insbesondere die Wichtigkeit von adäquater Lagerung und schonendem Transport der Besamungsportionen. So zeigte sich, dass mechanische Bewegung während der Spermalagerung einen negativen Einfluss auf diverse Spermaqualitätsparameter hatte. Weiter beeinträchtigten Vibrationen, die durch Erschütterungen beim Straßentransport der Spermaportionen mittels Kurierdienst entstehen, die

Spermienmotilität, wobei hier der Fokus auf der individuellen Resistenz der Spermien eines jeden Hengstes gegenüber transportbedingten Qualitätsverlusten lag. Sowohl in der spermatologischen Untersuchung des Akrosoms als auch in der durchgeführten Arbeit zu Transportauswirkungen auf die Spermaqualität von Besamungsportionen zeigte sich der Hengstpermaverdünner EquiPlus im Vergleich zu dem Verdünner Gent überlegen. Da alle im Rahmen dieser Arbeit generierten Ergebnissen auf *in vitro* Untersuchungen basierten, ist noch zu klären, ob die aufgezeigten Differenzen hinsichtlich der Spermaqualität auch in unterschiedlichen Trächtigkeitsraten *in vivo* resultieren. Um dies abschließend herauszufinden, sind zukünftige Feldversuche mit ausreichend großer Stichprobengröße notwendig. Die hier durchgeführten Forschungsarbeiten liefern jedoch bereits wichtige Erkenntnisse zu optimierter Lagerung sowie adäquatem Transport von Hengstbesamungsportionen und tragen dazu bei, die Ejakulateffizienz sowie Spermaqualität in Zukunft zu verbessern. Dies ist nicht nur für Hengststationen von wirtschaftlichem Interesse, sondern trägt auch maßgeblich zum Zuchterfolg bei.

6. Zusammenfassung

Hannah Dierberger (2024):

Untersuchung des Einflusses von Bewegungs- und Vibrationsemissionen auf die Qualität von flüssigkonserviertem Hengstsperma

Die sorgfältige spermatologische Untersuchung, eine qualitätserhaltende Lagerung und ein adäquater Transport flüssigkonservierter Besamungsportionen vom Hengst sind von zentraler Bedeutung für den Trächtigkeitserfolg sowie die Wirtschaftlichkeit der Hengststation. Diese Arbeit beschäftigte sich deshalb im ersten Teil mit der Eignung zweier Färbemethoden zur Darstellung des Hengstakrosoms. Es wurde gezeigt, dass die durchflusszytometrische Bestimmung nicht intakter Akrosomen in der Spermaportion mittels einer fluoreszenzbasierten Dreifachfärbung bestehend aus PI/PNA/PSA, im Vergleich zur mikroskopischen Beurteilung mit der konventionellen Spermac[®] Färbung, besser geeignet war. Weiter wurden die Auswirkungen der Rollbanklagerung und des Transportes von Besamungsportionen auf die Spermaqualität untersucht. Da unter kontinuierlicher Rotation gelagerte Besamungsportionen einen Motilitätsabfall sowie eine verminderte Thermoresistenz gegenüber ruhenden Portionen aufwiesen, sollte auf die Verwendung einer Rollbank während der Spermalagerung in Zukunft verzichtet werden. Auch *in vitro* simulierte transportassoziierte Vibrationen resultierten in verminderter Spermienmotilität und beeinträchtigter Thermoresistenz. Hierbei ist eine divergierende individuelle Resistenz der Spermien verschiedener Hengste gegenüber transportbedingten Schäden zu unterstreichen. Ein schnellerer Verbrauch von Energiereserven durch Rheotaxis sowie eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in gerollten und transportierten Proben liefern einen möglichen Erklärungsansatz für die detektierten Spermaqualitätsverluste. In allen drei Studien wurden die Hengstspermaverdünner EquiPlus und Gent verwendet. Das Fehlen von Eigelbbestandteilen in EquiPlus verglichen mit Gent führte einerseits zu weniger Artefakten in der Akrosomenbeurteilung und garantierte andererseits eine standardisierte, biologisch sicherere Zusammensetzung, weshalb EquiPlus vorzuziehen ist. Abschließend lässt sich betonen, dass diese Arbeit neue und wertvolle Erkenntnisse hinsichtlich der Untersuchung, der Lagerung und des Transportes von Hengstspermaportionen liefert und folglich in der Zukunft zu einer verbesserten Qualität von Besamungsportionen beiträgt.

7. Summary

Hannah Dierberger (2024):

Investigation of the influence of motion and vibration emissions on the quality of liquid-preserved stallion semen

Accurately performed spermatological examinations, a quality-preserving sperm storage and adequate transport of liquid-preserved artificial insemination (AI) doses from stallions are of great importance for satisfying pregnancy rates and the profitability of the stallion AI center. This study, therefore, focused firstly on the suitability of two staining methods for visualizing the stallion's acrosome. It was shown that the flow cytometric determination of non-intact acrosomes in the semen doses with a fluorescence-based triple-staining consisting of PI/PNA/PSA was superior to the microscopic assessment using the conventional Spermac[®] stain. Furthermore, the effects of sperm storage on roller benches and of the transport of AI doses on semen quality were investigated. As sperm doses stored under continuous rotation showed a drop in motility and reduced thermo-resistance compared to non-rotated doses, the use of roller benches during semen storage should be avoided in the future. *In vitro* simulation of transport-associated vibrations also resulted in reduced sperm motility parameters and impaired thermo-resistance. The divergent individual resistance of the sperm cells of different stallions towards transport-related quality losses should be emphasized. Faster consumption of energy resources due to rheotactical behavior as well as increased production of reactive oxygen species in rotated and transported semen samples serve as a probable explanation for the loss shown in semen quality. All three studies utilized the stallion semen extenders EquiPlus and Gent. The absence of egg yolk components in EquiPlus compared to Gent led to fewer artefacts in the assessment of sperm acrosomes on the one hand and guaranteed a standardized and biologically safer composition on the other, which is why EquiPlus should be preferred. It is concluded, that this work provides new insights into the examination, storage and transport of stallion semen doses and thus contributes to improving the quality of liquid-preserved stallion AI doses in the future.

8. Literaturverzeichnis

Verordnung zum Schutz der Beschäftigten vor Gefährdungen durch Lärm und Vibrationen (Lärm- und Vibrations-Arbeitsschutzverordnung - LärmVibrationsArbSchV). (2007). Bundesgesetzblatt I, 261; zuletzt geändert durch Artiekl 3 der Verordnung vom 21.07.2021. Bundesgesetzblatt I, 3115

AGARWAL, A., IKEMOTO, I. u. LOUGHLIN, K. R. (1994): **Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen.** Archives of Andrology 33, 157-162

AITKEN, R. J. u. BAKER, M. A. (2004): **Oxidative stress and male reproductive biology.** Reproduction, Fertility and Development 16, 581-588

AITKEN, R. J. u. CLARKSON, J. S. (1988): **Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques.** Journal of Andrology 9, 367-376

AURICH, C. (2005): **Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa.** Animal Reproduction Science 89, 65-75

AURICH, C. (2008): **Recent advances in cooled-semen technology.** Animal Reproduction Science 107, 268-275

AURICH, J. u. AURICH, C. (2006): **Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction.** Reproduction in Domestic Animals 41, 275-279

AYARI, H., THOMAS, M., DORÉ, S. u. SERRUS, O. (2009): **Evaluation of lumbar vertebra injury risk to the seated human body when exposed to vertical vibration.** Journal of Sound and Vibration 321, 454-470

BALOGUN, K. B. u. STEWART, K. R. (2021): **Effects of air exposure and agitation on quality of stored boar semen samples.** Reproduction in Domestic Animals 56, 1200-1208

BATELLIER, F., MAGISTRINI, M., FAUQUANT, J. u. PALMER, E. (1997): **Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa.** Theriogenology 48, 391-410

BATELLIER, F., VIDAMENT, M., FAUQUANT, J., DUCHAMP, G., ARNAUD, G., YVON, J. M. u. MAGISTRINI, M. (2001): **Advances in cooled semen technology.** Animal Reproduction Science 68, 181-190

BAUMBER, J., BALL, B. A., GRAVANCE, C. G., MEDINA, V. u. DAVIES-MOREL, M. C. (2000): **The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation.** Journal of Andrology 21, 895-902

BLAND, J. M. u. ALTMAN, D. (1986): **Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.** The Lancet 327, 307-310

BRINSKO, S., ROWAN, K., VARNER, D. u. BLANCHARD, T. (2000): **Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa.** Theriogenology 53, 1641-1655

BRITO, L. F., GREENE, L. M., KELLEMAN, A., KNOBBE, M. u. TURNER, R. (2011): **Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation.** Theriogenology 76, 745-750

BUSTANI, G. S. u. BAIEE, F. H. (2021): **Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders.** Veterinary World 14, 1220-1233

CHILDS, P. R. (2010): **Rotating flow.** 1. Ausgabe, 177-247. Elsevier, Amsterdam

CICCHETTI, D. V. u. SPARROW, S. A. (1981): **Developing criteria for establishing interrater reliability of specific items: Applications to assessment of adaptive behavior.** American Journal of Mental Deficiency 86, 127-137

CUERVO-ARANGO, J., NIVOLA, K., VÄIHKÖNEN, L. u. KATILA, T. (2015): **The effect of storage temperature of stallion semen on pregnancy rates.** Journal of Equine Veterinary Science 35, 611-616

CZERNIEWICZ, M., KRUK, A. u. KIELCZEWSKA, K. (2006): **Storage stability of raw milk subjected to vibration.** Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 15, 65-70

DE JAGER, C., BORNMAN, M. S., ANECK-HAHN, N. H., DU TOIT, D. u. VILJOEN, E. (1996): **Effect of rotation on the generation of reactive oxygen species in human semen.** Andrologia 28, 291-293

DE LAMIRANDE, E. u. GAGNON, C. (1992): **Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility.** Journal of Andrology 13, 379-386

DE OLIVEIRA, R. A. u. AURICH, C. (2021): **Aspects of breeding stallion management with specific focus on animal welfare.** Journal of Equine Veterinary Science 107, 103773

DE RUIGH, L., BOSCH, J., BRUS, M., LANDMAN, B. u. MERTON, J. (2006): **Ways to improve the biosecurity of bovine semen**. *Reproduction in Domestic Animals* 41, 268-274

DEUTSCHE REITERLICHE VEREINIGUNG (2023): **Jahresbericht 2022 Anlage: Zuchtstatistiken**.

FARLIN, M., JASKO, D., GRAHAM, J. u. SQUIRES, E. (1992): **Assessment of pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa**. *Molecular Reproduction and Development* 32, 23-27

FLESCHE, F. M., VOORHOUT, W. F., COLENBRANDER, B., VAN GOLDE, L. M. u. GADELLA, B. M. (1998): **Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: A novel technique for monitoring membrane purity and quantity**. *Biology of Reproduction* 59, 1530-1539

GIBB, Z. u. AITKEN, R. J. (2016): **The impact of sperm metabolism during in vitro storage: The stallion as a model**. *BioMed Research International* 2016, 9380609

GIBB, Z., CLULOW, J., AITKEN, R. u. SWEGEN, A. (2018): **First publication to describe a protocol for the liquid storage of stallion spermatozoa for 7 days**. *Journal of Equine Veterinary Science* 66, 37-40

GRAHAM, J. K. (2001): **Assessment of sperm quality: A flow cytometric approach**. *Animal Reproduction Science* 68, 239-247

HAFEMEISTER, T., SCHULZE, P., BORTFELDT, R., SIMMET, C., JUNG, M., FUCHS-KITTOWSKI, F. u. SCHULZE, M. (2022): **Boar semen shipping for artificial insemination: Current status and analysis of transport conditions with a major focus on vibration emissions**. *Animals* 12, 1331

HAFEMEISTER, T., SCHULZE, P., SIMMET, C., JUNG, M., FUCHS-KITTOWSKI, F. u. SCHULZE, M. (2023): **Intensity and duration of vibration emissions during shipping as interacting factors on the quality of boar semen extended in beltville thawing solution**. *Animals* 13, 952

HAGEDORN, C. (1992): **Beeinflussung der Motilität und Morphologie von frischverdünntem Hengstsperma bei Zusatz von bovinem Serumalbumin unter Berücksichtigung zweier Lagerungsformen**. Inaugurale Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover

HECKENBICHLER, S., DEICHSEL, K., PETERS, P. u. AURICH, C. (2011): **Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination**. *Theriogenology* 75, 849-856

HEFFE, G. (1993): **Untersuchungen zur Frischspermakonservierung von Hengstsamen: Überprüfung des Einflusses verschiedener Zentrifugationsverdünner auf die Haltbarkeit von Frischsamen.** Inaugurale Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover

HENSEL, B., JAKOP, U., SCHMICKE, M., SCHRÖTER, F., JUNG, M. u. SCHULZE, M. (2023): **Dual use of breeding stallions is possible without affecting the sperm quality.** *Reproduction in Domestic Animals* 58, 691-698

HERNÁNDEZ-AVILÉS, C., RAMÍREZ-AGÁMEZ, L., VARNER, D. D. u. LOVE, C. C. (2023): **The stallion sperm acrosome: Considerations from a research and clinical perspective.** *Theriogenology* 196, 121-149

HOSSAIN, M. S., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., NAGY, S., SIQUEIRA, A. P. u. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2011): **Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: State of the art.** *Asian Journal of Andrology* 13, 406-419

JUHÁSZ, J., NAGY, P., KULCSAR, M. u. HUSZENICZA, G. (2000): **Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: A review.** *Acta Veterinaria Brno* 69, 247-259

KARESKOSKI, M., VENHORANTA, H., VIRTALA, A. M. u. KATILA, T. (2019): **Analysis of factors affecting the pregnancy rate of mares after inseminations with cooled transported stallion semen.** *Theriogenology* 127, 7-14

KATILA, T. (1997): **Procedures for handling fresh stallion semen.** *Theriogenology* 48, 1217-1227

KATILA, T., NIVOLA, K., REILAS, T., SAIRANEN, J., PELTONEN, T. u. VIRTALA, A.-M. (2010): **Factors affecting reproductive performance of horses.** *Pferdeheilkunde* 26, 6-9

KNOX, R. V. (2006): **Semen processing, extending & storage for artificial insemination in swine.** Department of Animal Science University of Illinois

KOCH, R. u. SPÖRL, E. (2007): **Statistische Verfahren zum Vergleich zweier Messmethoden und zur Kalibrierung: Konkordanz-, Korrelations- und Regressionsanalyse am Beispiel der Augeninnendruckmessung.** *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 224, 52-57

LIN, L. I.-K. (1989): **A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility.** *Biometrics* 45, 255-268

LOOMIS, P. R. (2006): **Advanced methods for handling and preparation of stallion semen.** Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 22, 663-676

LOVE, C. C. (2011): **Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions.** Theriogenology 76, 547-557

MACÍAS GARCÍA, B., GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L., ORTEGA FERRUSOLA, C., SALAZAR-SANDOVAL, C., MORILLO RODRÍGUEZ, A., RODRÍGUEZ MARTINEZ, H., TAPIA, J., MORCUENDE, D. u. PENA, F. (2011): **Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation.** Reproduction in Domestic Animals 46, 141-148

MALMGREN, L., DEN KAMP, B. O., WÖCKENER, A., BOYLE, M. u. COLENBRANDER, B. (1994): **Motility, velocity, and acrosome integrity of equine spermatozoa stored under different conditions.** Reproduction in Domestic Animals 29, 469-476

MARTÍNEZ-PASTOR, F., MATA-CAMPUZANO, M., ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M., ÁLVAREZ, M., ANEL, L. u. DE PAZ, P. (2010): **Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry.** Reproduction in Domestic Animals 45, 67-78

MARTIN MUÑOZ, P., FERRUSOLA, C. O., VIZUETE, G., DÁVILA, M. P., MARTINEZ, H. R. u. PEÑA, F. J. (2015): **Depletion of intracellular thiols and increased production of 4-hydroxynonenal that occur during cryopreservation of stallion spermatozoa lead to caspase activation, loss of motility, and cell death.** Biology of Reproduction 93, 1-11

MCPARTLIN, L., LITTELL, J., MARK, E., NELSON, J., TRAVIS, A. u. BEDFORD-GUAUS, S. (2008): **A defined medium supports changes consistent with capacitation in stallion sperm, as evidenced by increases in protein tyrosine phosphorylation and high rates of acrosomal exocytosis.** Theriogenology 69, 639-650

MENEGAT, M. B., MELLAGI, A. P. G., BORTOLIN, R. C., MENEZES, T. A., VARGAS, A. R., BERNARDI, M. L., WENTZ, I., GELAIN, D. P., MOREIRA, J. C. F. u. BORTOLOZZO, F. P. (2017): **Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short-and long-term extenders.** Animal Reproduction Science 179, 67-79

MEYERS, S., BULKELEY, E. u. FOUTOUHI, A. (2019): **Sperm mitochondrial regulation in motility and fertility in horses.** Reproduction in Domestic Animals 54, 22-28

MIKI, K. u. CLAPHAM, D. E. (2013): **Rheotaxis guides mammalian sperm.** Current Biology 23, 443-452

MOORE, A. I., SQUIRES, E. L. u. GRAHAM, J. K. (2005): **Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival.** *Cryobiology* 51, 241-249

NEWCOMBE, J. u. CUERVO-ARANGO, J. (2011): **The effect of time of insemination with fresh cooled transported semen and natural mating relative to ovulation on pregnancy and embryo loss rates in the mare.** *Reproduction in Domestic Animals* 46, 678-681

OLDENHOF, H., HEUTELBECK, A., BLÄSSE, A.-K., BOLLWEIN, H., MARTINSSON, G., WOLKERS, W. F. u. SIEME, H. (2015): **Tolerance of spermatozoa to hypotonic stress: Role of membrane fluidity and correlation with cryosurvival.** *Reproduction, Fertility and Development* 27, 285-293

PAGL, R., AURICH, J. E., MÜLLER-SCHLÖSSER, F., KANKOFER, M. u. AURICH, C. (2006): **Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C.** *Theriogenology* 66, 1115-1122

PARLEVLIT, J. M. u. COLENBRANDER, B. (1999): **Prediction of first season stallion fertility of 3-year-old dutch warmbloods with prebreeding assessment of percentage of morphologically normal live sperm.** *Equine Veterinary Journal* 31, 248-251

PASCHOAL, A. F., LUTHER, A. M., JAKOP, U., SCHULZE, M., BORTOLOZZO, F. P. u. WABERSKI, D. (2021): **Factors influencing the response of spermatozoa to agitation stress: Implications for transport of extended boar semen.** *Theriogenology* 175, 54-60

PERINETTI, G. (2018): **Statips part IV: Selection, interpretation and reporting of the intraclass correlation coefficient.** *South European Journal of Orthodontics and Dentofacial Research* 5, 3-5

POMMER, A. C., LINFOR, J. J. u. MEYERS, S. A. (2002): **Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender.** *Theriogenology* 57, 1493-1501

POZOR, M. A., ZAMBRANO, G. L., RUNCAN, E. u. MACPHERSON, M. (2012): **Usefulness of dip quick stain in evaluating sperm morphology in stallions.** In *Proceedings of the American Association of Equine Practicioners, Lexington, USA*, 506-510

PRICE, S., AURICH, J., DAVIES-MOREL, M. u. AURICH, C. (2008): **Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15 °C.** *Reproduction in Domestic Animals* 43, 261-266

RODRÍGUEZ-GIL, J. u. RIGAU, T. (1995): **Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm.** *Animal Reproduction Science* 39, 141-146

RUNCAN, E. E., POZOR, M. A., ZAMBRANO, G. L., BENSON, S. u. MACPHERSON, M. L. (2014): **Use of two conventional staining methods to assess the acrosomal status of stallion spermatozoa.** *Equine Veterinary Journal* 46, 503-506

SCHULZE, M., BORTFELDT, R., SCHÄFER, J., JUNG, M. u. FUCHS-KITTOWSKI, F. (2018): **Effect of vibration emissions during shipping of artificial insemination doses on boar semen quality.** *Animal Reproduction Science* 192, 328-334

SCHULZE, M., MOHAMMADPOUR, F., SCHRÖTER, F., JAKOP, U., HÖNICKE, H., HASENFUSS, T., HENNE, H., SCHÖN, J. u. MÜLLER, K. (2021): **Suitability of semen stress tests for predicting fertilizing capacity of boar ejaculates.** *Theriogenology* 176, 73-81

SCHULZE, M., RÜDIGER, K. u. WABERSKI, D. (2015): **Rotation of boar semen doses during storage affects sperm quality.** *Reproduction in Domestic Animals* 50, 684-687

TAHERIAN, S. S., KHAYAMABED, R., TAVALAEI, M. u. NASR-ESFAHANI, M. H. (2019): **Alpha-lipoic acid minimises reactive oxygen species-induced damages during sperm processing.** *Andrologia* 51, e13314

TAMANINI, M. S., DOS SANTOS, G., LEAL, L. A., WOLF, L. M., SCHULZE, M., CHRIST, T. S., BORTOLOZZO, F. P., ULGUIM, R. R., WENTZ, I. u. MELLAGI, A. P. G. (2022): **Impact of agitation time of boar semen doses on sperm traits in short- and long-term extenders.** *Animal Reproduction Science* 247, 107159

TISCHNER, M. (1979): **Evaluation of deep-frozen semen in stallions.** *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 53-59

UMAIR, M., CLAES, A., BUIJTENDORP, M., CUERVO-ARANGO, J., STOUT, T. A. u. HENNING, H. (2023): **In vitro aging of stallion spermatozoa during prolonged storage at 5 °C.** *Cytometry Part A* 103, 479-491

VARNER, D. D., GIBB, Z. u. AITKEN, R. J. (2015): **Stallion fertility: A focus on the spermatozoon.** *Equine Veterinary Journal* 47, 16-24

VESSEY, W., PEREZ-MIRANDA, A., MACFARQUHAR, R., AGARWAL, A. u. HOMA, S. (2014): **Reactive oxygen species in human semen: Validation and qualification of a chemiluminescence assay.** *Fertility and Sterility* 102, 1576-1583

WARMIŃSKA, M., KRUK, A. u. BRANDT, W. (2006): **Effect of vibration frequency and exposure time on the technological usability of fresh milk.** Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 15, 247-251

WILSON, M., WILLIAMS, J., MONTROSE, V. T. u. WILLIAMS, J. (2019): **Variance in stallion semen quality among equestrian sporting disciplines and competition levels.** Animals 9, 485

XU, F., LIU, S., LIU, Y. u. WANG, S. (2021): **Effect of mechanical vibration on postharvest quality and volatile compounds of blueberry fruit.** Food Chemistry 349, 129216

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Schulze bedanken, der mich in den letzten zwei Jahren auf meiner Reise durch das spannende Forschungsfeld der Hengstspermatologie angeleitet und tatkräftig unterstützt hat. Er hat sich stets für mich eingesetzt und dabei keine Mühen gescheut, dafür gilt mein besonderer Dank!

Prof. Dr. Harald Sieme, ohne den meine Promotion an der Tierärztlichen Hochschule Hannover gar nicht erst möglich gewesen wäre, danke ich ebenfalls herzlich für seine Mühen!

Bei Dr. Markus Jung und dem gesamten Team der Spermatologie des IFN Schönow e.V. bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und für den fachlichen Beistand, der an so manchem Versuchstag meine letzte Rettung war. Weiter danke ich Frau Dr. Laura Pieper, die mich sicher durch den teils undurchsichtigen Dschungel der Statistik geführt hat und jede noch so kleine Frage mit großer Geduld beantwortet hat. Besonders hervorheben möchte ich außerdem meine lieben Bürokolleginnen Anine und Sophie aus Raum 123, ohne deren unerschütterliche Unterstützung und Zuspruch meine Promotion wohl keinen erfolgreichen Abschluss gefunden hätte. Ihr standet bei den kleinen und großen Herausforderungen der letzten zwei Jahre immer an meiner Seite und habt damit so manche Krise verhindert!

Bei Herrn Udo Verworner und Herrn Gerd Sosath möchte ich mich herzlich für die freundliche Bereitstellung von Hengstejakulaten zur Durchführung meiner Studien bedanken.

Zuletzt gilt ein großer Dank meinen Eltern und meiner gesamten Familie, die nicht nur in den letzten zwei Jahren immer für mich da waren, sondern bei allen Herausforderungen eine große Unterstützung sind. Insbesondere dir Immo, möchte ich für deine Ermutigungen danken! Du hast dir oft noch spät abends geduldig meine Bedenken angehört und es trotzdem geschafft, aufmunternde Worte zu finden und Zweifel aus dem Weg zu räumen. Bei Leonie und Luiza bedanke ich mich für die unerschütterliche Unterstützung seit vielen, vielen Jahren. Ich bin dankbar dafür, euch alle an meiner Seite zu wissen!