

Tube-Pellets als Alternative zur konventionellen Kryokonservierung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Agrarwissenschaften
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Raphael Oliver Schütt

geboren in Neustadt am Rübenberge

Göttingen, Februar 2018

D 7

1. Referent: Prof. Dr. Christoph Knorr
2. Korreferent: Prof. Dr. Detlef Rath

Tag der Mündlichen Prüfung: 13. Februar 2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abbildungsverzeichnis.....	XII
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	2
2.1 Besamungseinsatz von Jungbullen und daraus resultierende Herausforderungen.....	2
2.1.1 Entwicklung und Einsatz der genomischen Selektion	3
2.1.2 Einsatz von genomisch selektierten Jungbullen	5
2.1.3 Einfluss des Bullenalters auf die Ejakulatparameter	6
2.2 Geschlechtsspezifische Spermisortierung mittels Durchflusszytometrie.....	9
2.3 Bestandteile und Funktion des bovinen Seminalplasmas	11
2.3.1 Auswirkung der Verdünnung auf den Anteil wirksamer Seminalplasmakomponenten	13
2.3.2 Schädigende Einflüsse auf die Spermien durch die Ejakulatbehandlung und dessen Folgen auf die Trächtigkeitsraten.....	14
2.4 Kryokonservierung von Bullenspermien	17
2.4.1 Grundlagen der Kryokonservierung	18
2.4.2 Effekte des Einfrier- und Auftauprozesses auf die Spermienintegrität	20
2.4.3 Entwicklung von Tiefgefriermedien für Bullenspermien und deren spezifische Inhaltsstoffe.....	22
2.4.4 Einsatz verschiedener Verdünnungsverfahren.....	25
2.4.5 Möglichkeiten der Konfektionierung von Besamungsportionen.....	27
2.5 Kryokonservierung in geringen Konzentrationen	31
2.5.1 Einflussfaktoren Spermienanzahl und Volumen	32
2.5.2 Belastung der Spermien bei der Besamung	37

2.6	Gesetzliche Grundlagen für das Konfektionieren von Besamungsportionen ..	38
3	Material und Methoden.....	40
3.1.	Versuchstiere und Samengewinnung	40
3.2.	Materialien für die Laboruntersuchungen	42
3.2.1	Chemikalien, Fluoreszenzfarbstoffe und Verbrauchsmaterialien.....	42
3.2.2	Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen, Verdünnermedien und Puffer	43
3.2.3	Geräte für die angewendeten Messverfahren.....	44
3.2.4	Zubehör	45
3.3.	Aufbau der Versuchsteile I und II.....	46
3.4.	Wiederkehrende Arbeitsschritte.....	51
3.4.1	Eingangsuntersuchung	51
3.4.2	Weitergehende Spermauntersuchung	52
3.4.2.1	Motilität.....	52
3.4.2.2	Membranintegrität.....	52
3.4.2.3	Morphologie.....	53
3.4.3	Geschlechtsspezifische Spermisortierung.....	53
3.5	Kryokonservierung der Versuchsabschnitte I und II	54
3.5.1	Kryokonservierung in 250 µl Kontrollstraws: Verfahren, Konfektionierung und Kryokonservierung.....	55
3.5.2	Kryokonservierung von unsortierten Spermien in 20 µl Nanostraws: Verfahren, Konfektionierung und Kryokonservierung.....	56
3.5.3	Kryokonservierung von unsortierten Spermien in 30 µl und 50 µl Tube-Pellets: Verfahren, Konfektionierung und Kryokonservierung	58
3.5.4	Kryokonservierung von sortierten Spermien in 250 µl Kontrollstraws: Verfahren, Konfektionierung und Kryokonservierung.....	61
3.5.5	Kryokonservierung von sortierten Spermien in 30 µl und 60µl Tube-Pellet: Verfahren, Konfektionierung und Kryokonservierung	62

3.6	Auftauverfahren der Behandlungsgruppen	63
3.6.1	Auftauverfahren der unsortierten und sortierten 250 µl Kontrollstraws...	63
3.6.2	Auftauverfahren der Nanostraws	63
3.6.3	Auftauverfahren der unsortierten und sortierten Tube-Pellets	63
3.7	Thermoresistenztest nach dem Auftauen	64
3.7.1	Motilität	64
3.7.2	Membranintegrität	65
3.7.3	Morphologie.....	65
3.8	Statistische Auswertung	67
4	Ergebnisse	68
4.1	Versuchsteil I: Verifizierung der Kryokonservierbarkeit von unsortierten Spermien in Minimalvolumina	68
4.1.1	Motilität Bulle A	68
4.1.2	Motilität Bulle B	69
4.1.3	Membranintegrität Bulle A	70
4.1.4	Membranintegrität Bulle B	71
4.1.5	Morphologie Bulle A	71
4.1.6	Morphologie Bulle B	72
4.2	Versuchsteil II: Verifizierung der Kryokonservierbarkeit von sortierten Spermien in Minimalvolumina	73
4.2.1	Motilität Bulle A	73
4.2.2	Motilität Bulle C	74
4.2.3	Motilität Bulle D	74
4.2.4	Membranintegrität Bulle A	75
4.2.5	Membranintegrität Bulle C	76
4.2.6	Membranintegrität Bulle D	77
4.2.7	Morphologie Bulle A	78
4.2.8	Morphologie Bulle C	79

4.2.9	Morphologie Bulle D	80
5	Diskussion.....	82
5.1	Fragestellung und Versuchshypothese	82
5.2	Laboruntersuchungen	83
5.2.1	Versuchsteil I	83
5.2.1.1	Einfluss des eingesetzten Verdünnerverfahrens.....	85
5.2.1.2	Vergleich der unsortierten Minimalvolumina.....	87
5.2.1.3	Identifizierung und Kennzeichnung der Tube-Pellet-Varianten	89
5.2.2	Versuchsteil II.....	90
5.2.2.1	Vergleich der sortierten Minimalvolumina.....	93
5.3	Mögliche Einsatzgebiete der niedrigdosierten Besamungsportionen	94
6	Zusammenfassung	96
7	Summary.....	99
8	Literaturverzeichnis	101
9	Anhang.....	120
9.1	Materialien	120
9.2	Parametereinstellung Gallios 10/3 TM Durchflusszytometer (Beckmann Coulter Inc., Brea, USA)	120
9.3	Parametereinstellungen CASA IVOS I, Spermaanalysecomputer (Version 12.0 IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, USA) für Messungen ohne bzw. mit Fluoreszenzfärbung.....	121
9.4	Wertungsprotokoll der morphologischen Veränderungen der Spermien.....	122
10	Eidesstattliche Erklärung	123

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse
AO	Antioxidantien
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FSH	Follicle-Stimulating Hormone
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone
hCG	human Chorionic Gonadotropin
HF	Holstein-Friesian
IE	Internationale Einheit
IVF	In vitro-Fertilisation
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	luteinisierendes Hormon
LN ₂	Flüssiger Stickstoff
NRR	Non-Return-Rate (engl.)
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat gepufferte Salze
pH	potentia Hydrogenii (lat.)
PI	Propidiumiodid
QR	Quick Response
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SIFT [®]	Sperm-intra-fallopian-transfer
SNP	Single-Nucleotid-Polymorphism
STD	Standardabweichung
TG	Tiefgefrierung
TRIS	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan

VSL	Velocity straight line
VT	Versuchsteil

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mindestanforderungen an Bullenejakulate mit einem Alter unter zwei und über zwei Jahren (ADR, 2006a)	6
Tabelle 2: Vergleich der spermatologischen Werte von Jung- und Altbulle nach LICHTNER (2010).....	7
Tabelle 3: Zusammensetzung des Seminalplasmas beim Bullen, Auszug aus MANN und LUTWAK-MANN (1981).....	12
Tabelle 4: Mindestanforderungen an sortierte Spermien (RATH et al., 2009) aus STROTHMEYER (2013).....	16
Tabelle 5: Spermienreduzierung von geschlechtsspezifisch differenzierten oder unsortiert konservierten 250 µl Besamungsportionen beim Bullen	35
Tabelle 6: Bullendaten Versuchsteil (VT) I und II.....	41
Tabelle 7: Angewandte Messverfahren und die dazugehörigen Geräte	44
Tabelle 8: Verwendetes Zubehör mit Angabe der jeweiligen Hersteller.....	45
Tabelle 9: Behandlungsgruppen Versuchsteil I.....	46
Tabelle 10: Behandlungsgruppen Versuchsteil II.....	47
Tabelle 11: Einschätzung der Massenbewegung nach WEITZE (2001)	51
Tabelle 12: Darstellung der morphologischen Abweichungen von Spermien	66
Tabelle 13: Prozentualer Anteil motiler Spermien im Thermoresistenztest.....	69
Tabelle 14: Prozentualer Anteil motiler Spermien im Thermoresistenztest.....	70
Tabelle 15: Prozentualer Anteil membranintakter Spermien im Thermoresistenztest ...	70
Tabelle 16: Prozentualer Anteil membranintakter Spermien im Thermoresistenztest ...	71
Tabelle 17: Prozentualer Anteil morphologisch intakter Spermien im Thermoresistenztest	72
Tabelle 18: Prozentualer Anteil morphologisch intakter Spermien im Thermoresistenztest	72
Tabelle 19: Prozentualer Anteil motiler Spermien im Thermoresistenztest.....	73
Tabelle 20: Prozentualer Anteil motiler Spermien im Thermoresistenztest.....	74
Tabelle 21: Prozentualer Anteil motiler Spermien im Thermoresistenztest.....	75
Tabelle 22: Prozentualer Anteil membranintakter Spermien im Thermoresistenztest ...	76
Tabelle 23: Prozentualer Anteil membranintakter Spermien im Thermoresistenztest ...	77
Tabelle 24: Prozentualer Anteil membranintakter Spermien im Thermoresistenztest ...	78

Tabelle 25: Prozentualer Anteil morphologisch intakter Spermien im Thermoresistenztest	79
Tabelle 26: Prozentualer Anteil morphologisch intakter Spermien im Thermoresistenztest	80
Tabelle 27: Prozentualer Anteil morphologisch intakter Spermien im Thermoresistenztest	81
Tabelle 28: CASA Messparameter für Spermien ohne Fluoreszenzfärbung und mit Fluoreszenzfärbung.....	121
Tabelle 29: Messparameter Gallios 10/3TM Durchflusszytometer zur Detektion der Färbung mit SYBR14®/PI (FS=forward scatter, SS=side scatter, FL=fluoreszenz channel, BP=band pass, PI=Propidium Iodid).....	120
Tabelle 30: Untersuchungsprotokoll der morphologischen Veränderungen boviner Spermien nach (KRAUSE, 1966).....	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau Versuchsteil I.....	48
Abbildung 2: Schematischer Aufbau Versuchsteil II.	50
Abbildung 3: Volumenvergleich des Nano- und Kontrollstraws (SCHÜTT, 2013).	56
Abbildung 4: Aufbau des Tubes (Matrix 2D Barcoded Screw Top Tubes, 200 µl, steril, Thermo Scientific, NY, USA) mit einem QR TM -Code.	58
Abbildung 5: Lagerung der Tube-Pellets auf einem Rack mit entwickelter Verschlusshilfe.....	60
Abbildung 6: Die unterschiedlichen Volumina (60, 50, 30 µl) der Tube-Pellets der Versuchsteile I und II.....	61

1 Einleitung

Die Bewertung des genomischen Zuchtwertes ist heute bereits am Embryo oder kurz nach der Geburt, in den ersten Lebenswochen, möglich (LUND et al., 2010). Der daraus resultierenden Beschleunigung des Zuchtfortschritts steht allerdings die physiologische Reproduktionsleistung eines Jungbullens entgegen – das Ejakulatvolumen und die Spermien Gesamtzahl pro Ejakulat liegen deutlich unter den Werten eines Altbullen.

Die geschlechtsspezifische Differenzierung boviner Spermien und der Verkauf sortierter Besamungsportionen ist ein in der Praxis etabliertes Verfahren. Nachteilig wirkt sich die Sortiergeschwindigkeit auf die Befriedigung der Nachfrage aus. Trotz technischer Innovationen ist der Sortierprozess weiterhin zeitintensiv und kostspielig (SEIDEL, 2007). Die konventionelle Kryokonservierung im 250 µl Straw enthält 15 - 20x10⁶ Spermien (CRAMER et al., 2009). Bei dem Einsatz genomisch geprüfter Jungbullenspermien gibt es jedoch zu Beginn der Spermaproduktion oft ein Ungleichgewicht zwischen der Nachfrage nach Besamungsportionen und dem physiologischen Produktionspotential des Tieres (OSMERS und HERMANN, 2017), so dass für den Besamungseinsatz von Jungbullenspermien über eine Änderung der Konfektionierung, der Spermienanzahl und des Volumens einer Besamungsportion nachgedacht werden muss.

Studien am Institut für Nutztiergenetik des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) in Mariensee ergaben, dass es möglich ist, Ejakulate von Alt- und Jungbullenspermien in reduziertem Volumen und reduzierter Spermienanzahl unter Beibehaltung der Mindestanforderungen für gefrorenes Sperma einzufrieren (SCHÜTT, 2013; STROTHMEYER, 2013). Eine neue Besamungstechnik namens SIFT[®], welche die Besamungsportion mit einem Volumen von ca. 50 µl tief intrauterin in den Eileiter platziert, wurde dazu parallel entwickelt (GROßFELD et al., 2011b). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine praktikable Konfektionierung gleichermaßen für tiefgefrorene unsortierte als auch geschlechtsspezifisch differenzierte Besamungsportionen in kleinen Volumina und mit reduzierter Spermienzahl zu entwickeln. Dabei sollte die Auftauqualität mit der einer kommerziellen Besamungsportion vergleichbar sein.

2 Literaturübersicht

2.1 Besamungseinsatz von Jungbullen und daraus resultierende Herausforderungen

Aktuell durchläuft die Rinderzucht große Veränderungen. Durch den breiten Einsatz der genomischen Selektion kommt es weltweit zu Umstrukturierungen in den Zuchtprogrammen. Die kosten- und zeitintensive Test- und Wartebullenhaltung wurde stark reduziert. Die Nutzung der genomischen Selektion führt, ähnlich wie es die künstliche Besamung Mitte des letzten Jahrhunderts tat, zu gravierenden Veränderungen innerhalb der gesamten Tierzucht (KLEMM et al., 2010). Die genomische Selektion ist eine Kombination von den Ergebnissen der konventionellen Zuchtwertschätz-Verfahren mit den Informationen, welche man direkt aus der DNA-Sequenz ableitet. Bei zielgerichteter Berücksichtigung führen diese zusätzlichen Informationen in den Zuchtprogrammen zu einer Erhöhung des Zuchtfortschritts (DE ROOS et al., 2011). Eine Steigerung des Zuchtfortschritts um bis zu 100% wird erwartet. Dies kann zu einem Überdenken der Zuchtziele und -programme und einer abgeänderten Leistungsprüfung führen (SCHAEFFER, 2006; PRYCE und DAETWYLER, 2012; SCHEFERS und WEIGEL, 2012). Vor allem züchterische Leistungsmerkmale mit einer geringen Heritabilität, wie die Tiergesundheit oder die Fruchtbarkeit, können durch den Einsatz der genomischen Selektion verbessert werden (HAYES et al., 2013).

Ziel der traditionellen töchtergeprüften Zuchtwertschätzung ist es, durch gezielte Verpaarung von Elterntieren die Leistung der Nachkommen positiv zu beeinflussen (SWALVE, 2002). Ein möglichst hoher Zuchtfortschritt pro Zeiteinheit kann durch das Nutzen dreier Steuerungselemente erreicht werden: der **Selektionsgenauigkeit**, dem **Generationsintervall** und der **Selektionsintensität** (SEEFRIED et al., 2010). Durch die Nachkommenprüfung im Rahmen der künstlichen Besamung ist die Selektionsgenauigkeit der traditionellen Zuchtwertschätzung sehr hoch und liefert sichere Zuchtwerte. Nachteil dieser Methode ist der Zeitfaktor. Durch die Nachkommenprüfung sind genaue Zuchtwerte für den eingesetzten Bullen erst nach fünf bis sieben Jahren möglich (KLEMM et al., 2010). Auf Grund des langsamen Wachstums und der niedrigen Reproduktionsrate ist das Generationsintervall, definiert als Zeitraum zwischen der Geburt eines Tieres und der Geburt seiner Nachkommen, verhältnismäßig lang.

Eine Verkürzung des Generationsintervalls ist durch den kurzen, aber massiven Einsatz guter Zuchttiere über die künstliche Besamung oder aber durch eine möglichst frühe Selektion anhand von Hilfsmerkmalen möglich (KÖNIG und SIMIANER, 2008). Die Selektionsintensität gibt den Teil der Tiere an, der für eine Weiterzucht vorgesehen ist, da sie Eigenschaften aufweisen, die eine Mindestabweichung vom Mittel der Population darstellen. Diese Mindestabweichungen liegen innerhalb biologischer Limitierungen und unterliegen der Entscheidung der jeweiligen Züchter (HABIER et al., 2007; SEEFRIED et al., 2010).

2.1.1 Entwicklung und Einsatz der genomischen Selektion

Die genomische Selektion stellt die Möglichkeit dar, durch die Sequenzierung des Genoms schon an der Blastozyste oder am neugeborenen Kalb, bei möglichst gleicher Selektionsgenauigkeit, das Generationsintervall mit Hilfe neuer und früher verfügbarer genetischer Information zu verkürzen. So wird der Zuchtfortschritt pro Zeiteinheit vergrößert. Um die genetischen Informationen zu erhalten, wird aus einer Blut- oder Gewebeprobe die DNA isoliert und auf einen Chip aufgetragen. Die daraus ermittelten SNP-Muster kann man nun mit der Lernstichprobe abgleichen und den genomischen Zuchtwert errechnen (HUMBLOT et al., 2010; MA et al., 2013).

Das Grundprinzip der genomischen Selektion wurde im Jahre 2001 erstmals skizziert (MEUWISSEN et al., 2001). Zu Beginn wurden die Effekte der 50.000 **Single-Nucleotide-Polymorphism Marker** (SNP-Marker) auf Merkmale des Genoms geschätzt. Die mit der Einführung 2010 genutzte **Referenzlernstichprobe** der deutschen Holsteinzucht umfasste 16.000 Bullen, über die bereits sichere Phänotypinformationen vorlagen. Diese große Referenzlernstichprobe wurde durch einen Zusammenschluss verschiedener europäischer Länder ermöglicht. Es beteiligten sich neben Deutschland noch Zuchtverbände aus Frankreich, Skandinavien und den Niederlanden. Die Bullen waren töchtergeprüft, typisiert und deren Pedigrees bekannt. Bis heute konnte die Lernstichprobe der typisierten und töchtergeprüften Bullen auf über 32.000 Bullen ausgedehnt werden (Stand April 2016). So konnte die Sicherheit im genomischen Gesamtzuchtwert auf 64% erhöht werden. Die Genauigkeit eines töchtergeprüften Altbullen liegt bei ca. 90% im Vergleich zum Jungbullen mit 64% (VIT, 2016). Ein gekonntes Management beim Einsatz genomisch geprüfter Jungbullen reduziert das Risiko einer

Überschätzung des Zuchtwertes auf 0,5% (FÜRST et al., 2017). Durch die SNP konnten die Phänotypen durch die Effektableitung mit den Genotypen abgeglichen werden. Entscheidend für die Genauigkeit des genomischen Zuchtwertes, gerade von funktionellen Merkmalen wie der Fruchtbarkeit, der Eutergesundheit oder der Zellzahl, ist die Größe der Lernstichprobe und die Sicherheit der Zuchtwerte der Bullen. Es bleibt deshalb unumgänglich auch weiterhin eine exakte Leistungserfassung der Nachkommen durchzuführen.

Die Funktionsweise der genomischen Selektion basiert darauf das gesamte Genom als Informationsquelle zu nutzen. Die genaue Abfolge der Bausteine des Erbmaterials ist durch die Sequenzierung des bovinen Genoms ermittelt worden. Jedes Rind hat geringgradige Abweichungen in der Abfolge, was die genomische Selektion ermöglicht. Die Abweichungen werden als Polymorphismen bezeichnet und betreffen immer nur einen Baustein (Nukleotid) im Genom. Hunderttausende dieser SNP sind bereits beim Rind bekannt. Mit Hilfe eines Chips, zu Beginn war es der 54K-Chip (Illumina Bovine SNP 50k Beadchip), können 54.001 SNP, welche gleichmäßig auf den Chromosomen verteilt sind, in einem relativ kostengünstigen Laborverfahren ausgelesen werden. Aktuell arbeiten viele deutsche Zuchtunternehmen mit dem EURO G 10 K LD-Chip. Dieser „Low Density“-Chip ermöglicht es den Landwirten eine Vielzahl von potentiellen Zuchttieren kostengünstig auf ihren genomischen Zuchtwert untersuchen zu lassen. Durch die Weiterentwicklung der verwendeten Chips hin zu Low Density „genomic chips“, die nur noch zwischen drei- und zwanzigtausend SNP untersuchen, konnten die Preise für die DNA-Untersuchung kontinuierlich bei gleichbleibend hoher Genauigkeit gesenkt werden (GARCIA et al., 2013). Man geht davon aus, dass in der Nähe jedes Gens, welches die Leistung eines züchterischen Merkmals beeinflusst, mindestens eine SNP liegt (MEUWISSEN et al., 2001).

Allerdings kann man nicht davon ausgehen, dass hinter den SNP der eingesetzten Chips auch die kausalen Genompositionen liegen, die die tatsächliche genetische Variation in den Merkmalsausprägungen der Tiere darstellt. Verschiedene Analysen beim Rind konnten über mehrere Megabasen hinweg ein extremes Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium) nachweisen (FARNIR et al., 2000; DE ROOS et al., 2008; KHATKAR et al., 2008). Man spricht von einem Kopplungsungleichgewicht, wenn zwei oder mehr Genloci mit spezifischen Sequenzvarianten in Individuen einer Population häufiger zusammen auftreten als man dies durch Zufall erwartet hätte. Der im Kopp-

lungsunleichgewicht befindliche Genombereich lässt sich durch Kartierungsstudien herausfinden (FREUDENBERG et al., 2002). Die Ursache eines Kopplungsungleichgewichts liegt meist in einer vergangenen Mutation (ABECASIS et al., 2005). Nach über sieben Jahren der genomischen Selektion auf Bullenbasis wird nun für alle Merkmale ebenfalls die Kuhbasis mit einbezogen. Die ersten genomischen Bullenjahrgänge haben nun Töchterzuchtwerte bekommen, was die Genauigkeit weiter erhöhen wird (VIT, 2017).

2.1.2 Einsatz von genomisch selektierten Jungbulln

Durch die genomische Selektion gibt es eine frühe Verfügbarkeit von Zuchtwerten, die eine ausreichende Sicherheit liefert. Das erlaubt den Einsatz von Jungbulln als Besamungsbulln mit Erreichen der Geschlechtsreife. Die Pubertät als Stufe einer tierartdif-ferenten Entwicklung ist die Phase, bei der das Tier seine Geschlechtsreife erlangt. Beim Bulln tritt diese durchschnittlich nach elf Monaten ein, wobei eine natürliche Varianz von neun bis 24 Monaten auftreten kann (ENGELHARDT VON et al., 2005). Die Zuchttauglichkeit wird einem geschlechtsreifen Tier allerdings erst anerkannt, wenn eine definitive Aussage über dessen Befruchtungsfähigkeit getroffen werden kann. Das Befruchtungsvermögen ist nicht durch ein Merkmal definiert. Um jedoch eine bindende Aussage treffen zu können, werden die spermatologischen Parameter Motilität, Ejakulatkonzentration und Morphologie herangezogen (ADR, 2006a). Die Funktion der Keimdrüsen ist abhängig von der Fähigkeit des Hypothalamus das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) zu sezernieren. GnRH reguliert und stimuliert die Gametogenese. Die Fortpflanzungsfähigkeit eines Jungbulln ist an den Hoden als primäres Geschlechtsorgan gebunden. Die Hoden produzieren das männliche Geschlechtshormon Testosteron genauso wie die Spermien, die männlichen Keimzellen (LYHS, 1982). Die Nutzung von ca. zwölf Monate alten Jungbulln reduziert das Generationsintervall drastisch und stellt damit einen wesentlichen Faktor für die prognostizierte Steigerung des Zuchtfortschritts dar (SCHAEFFER, 2006). Der Einsatz von Besamungsportionen von Jungbulln steigt seit Einführung der genomischen Selektion kontinuierlich an. Im Jahr 2016 lag der Anteil an Erstbesamungen an den gesamten Erstbesamungen durch Bulln mit rein genomisch basiertem Zuchtwert bei rund 70% (GOCKEL, 2017), und das, obwohl sich bislang nur wenige Studien mit einem Vergleich der Ejakulatqualitätsparameter zwischen Jung- und Altbulln auseinandergesetzt haben.

2.1.3 Einfluss des Bullenalters auf die Ejakulatparameter

Besamungsstationen arbeiten mit genomisch wertvollen und potentiell erfolgreichen Jungbullen ab einem Alter von 10 Monaten im regelmäßigen Sprungeinsatz (MELBAUM et al., 2016). Ein Jungbulle hat im Vergleich zu einem Altbullen ein geringeres Ejakulatvolumen und eine geringere Spermiedichte (WEITZE, 2001). Die Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter (ADR) stellt entsprechende Mindestanforderungen, die in Tabelle 1 angegeben werden.

Tabelle 1: Mindestanforderungen an Bullenejakulate mit einem Alter unter zwei und über zwei Jahren (ADR, 2006a)

Parameter	≤ 2 Jahre	≥ 2 Jahre
Libido	Reaktionszeit bis zum ersten Aufsprung von unter zehn Minuten	
Farbe	elfenbeinfarben, weiß/gelblich bis weiß	
Konsistenz	rahmig bis milchig	
Massenbewegung	Ausgeprägte Massenbewegung, lebhafte Schwarm- und Wellenbewegung mit dunklen Verdichtungen	
Vorwärtsmotilität	≥ 70 %	
Spermienmorphologie	≤ 20 % gesamt verändert, ≤ 5 % Kopf- und ≤ 10 % Akrosomveränderungen	
Spermienkonzentration	0,6x10 ⁶ /ml	
Volumen/Ejakulat	2 ml	4 ml
Motilität nach dem Auftauen	2/3 der Ejakulate mit einer Vorwärtsbeweglichkeit von ≥50 %	

Jungbullen erreichen ein Ejakulatvolumen von 2 bis 4 ml mit einer Spermienanzahl von 2,5 bis 5 Milliarden (ROSENBERGER et al., 1977), was sich auch in den Mindestanforderungen der ADR widerspiegelt.

Eine Studie befasste sich mit einer objektiven Beurteilung der Einsatzfähigkeit von Besamungsbullen für die künstliche Besamung und differenzierte zwischen Jung- und Altbullen. Die Jungbullen waren dabei zwischen 12 und 15 Monate, die Altbullen älter als fünf Jahre. Es wurden keine Unterschiede in der Gesamtmotilität der Ejakulate festgestellt. Altbullen erreichten ein durchschnittliches Ejakulatvolumen von 6,4 ml im Vergleich zu 4,1 ml beim Jungbullen. Die Ejakulatdichte lag bei 1,4x10⁹ Spermien/ml im

Vergleich zu $1,2 \times 10^9$ Spermien/ml beim Jungbullen. Altbullen haben demnach eine um 87 % erhöhte Spermiedichte und ein um 56 % erhöhtes Ejakulatvolumen (LIGNER, 2009). Vergleichbare Ergebnisse wurden 2010 veröffentlicht. Es wurden die Ejakulatparameter von Jung- und Altbullen ermittelt (LICHTNER, 2010). Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Spermiesamtzahl und das Ejakulatvolumen sind bei Altbullen (n=4) höher als bei Jungbullen (n=9).

Tabelle 2: Vergleich der spermatologischen Werte von Jung- und Altbulle nach LICHTNER (2010)

Parameter	Jungbulle	Altbulle
Alter (a)	≤ 2	≥ 4
Ejakulatvolumen (ml)	$2,5 \pm 1,0$	$6,7 \pm 3,5$
Spermiedichte pro ml	$1,0 \pm 0,4 \times 10^9$	$1,1 \pm 0,4 \times 10^9$
Gesamtmotilität (nativ) (%)	$77,6 \pm 3,8$	$78,9 \pm 2,4$
Spermiesamtzahl	$2,5 \pm 1,6 \times 10^9$	$7,3 \pm 4,5 \times 10^9$
Motilität nach dem Auftauen (%)	$56,6 \pm 3,9$	$55,4 \pm 4,3$

Neben einem reduzierten Volumen und einer reduzierten Dichte wurden in einer weiteren Studie bei einem direkten Vergleich von 14 Monate alten Jungbullen mit Tieren von über vier Jahren ein wesentlich höherer Anteil membranintakter Spermien bei den Altbullen festgestellt. Bullen älter als vier Jahre zeigten auch eine wesentlich stabilere Chromatinstruktur, welche sich ab dem vierzehnten Lebensmonat bis zu einem Alter von vier Jahren entwickelte. Auch der Anteil an intakten Akrosomen war beim Altbullen höher. Der Autor schränkt jedoch ein, dass der verwendete Gefrierverdünner einen Einfluss auf die Chromatinstruktur der Spermien-DNA nach dem Auftauen haben kann (KARABINUS et al., 1990).

In einer weiteren Studie wurden 29 Jungbullen vom Zeitpunkt des Einkaufs an durch eine Besamungsstation bis zum Abschluss der Gewinnung von zehn verwertbaren Ejakulaten untersucht. Dabei wurden interne Qualitätsmindestanforderungen gestellt. Diese waren: Volumen: ≥ 1 ml; Spermienkonzentration $\geq 0,5 \times 10^9$ Spermien/ml; visuelle Motilität ≥ 60 % und morphologische Veränderungen ≤ 20 %. Das erste taugliche Ejakulat konnte im Schnitt mit 11,6 Monaten gewonnen werden. Über die Versuchsdauer gab es bei den untersuchten Tieren starke Schwankungen in der Ejakulatqualität. Eine gleichbleibende Ejakulatqualität bei Jungbullen ist bullenindividuell enorm unterschiedlich.

Die Jungbullen hatten mit zehn Monaten ein durchschnittliches Ejakulatvolumen von 2,2 ml mit $0,666 \times 10^9$ Spermien/ml. Mit 16 Monaten lag es bei 3,8 ml mit $1,484 \times 10^9$ Spermien/ml. Beim ersten Ejakulat waren 72,7 % und beim zehnten Ejakulat 80,9 % der Spermien morphologisch normal geformt. Die durch ein Computer Assisted Sperm Analyzer-System (CASA-System) ermittelte objektive Motilität der nativen Ejakulate liegt im Schnitt bei 80,52 % und subjektiv geschätzt bei 65,83 %. Interessant ist der ermittelte Motilitätswert nach dem Auftauen im Thermoresistenztest. Dieser liegt vier Stunden nach dem Auftauen objektiv bei 44,1 % (OSMERS und HERMANN, 2017). Als Konsequenz der schlechteren Einfrierbarkeit von Jungbullensamen versuchen Besamungsstationen vermehrt Frischsamen zu vermarkten. Die Rinder-Allianz GmbH beispielsweise investierte Mitte 2015 in die logistische Ausdehnung der Frischsamenversorgung. Die Verkaufszahlen eines exemplarisch genannten genomisch geprüften Jungbullens verdeutlichen dies. Insgesamt wurden von diesem Tier 79.802 Besamungsportionen abgesetzt. Davon wurden 44.278 Portionen als Frischsamen vermarktet. Das entspricht einem Frischsamenanteil von 55,5 % (STEUP, 2015). Für Jungbullenspermien ergeben sich hier zwei Vorteile. Die sensiblen Jungbullenspermien müssen nicht den strapaziösen und verlustreichen Kryokonservierungsprozess durchlaufen. Zudem können Frischsamenportionen mit $2,5$ bis 5×10^6 Spermien pro Portion sehr niedrig dosiert werden (LEIDING, 2007). So können aus kleinen Ejakulaten mehr Portionen produziert werden.

Dahingegen gibt es vereinzelte Untersuchungen die besagen, dass bestimmte Ejakulatparameter - wie beispielsweise die Motilität - bei Jungbullen wesentlich schlechter sind als bei älteren Tieren. So befasste sich eine Untersuchung mit dem Einfluss der Saisonalität und des Bullenalters auf die Motilität nach dem Auftauen. Es wurde ein negativer signifikanter ($P \leq 0,05$) Einfluss bei Bullen mit einem Alter zwischen ein und zwei Jahren im Vergleich zu Bullen mit einem Alter zwischen drei und vier Jahren bei der Spermienmotilität und den kinetischen Eigenschaften festgestellt. Der Anteil progressiv motiler Spermien ist in den Monaten von Dezember bis Februar am höchsten ($P \leq 0,05$). Dabei stellt der hypo-osmotische Schwelltest eine Möglichkeit dar an nativen Spermien die optimale Spermiengesamtzahl pro Besamungsportion bullenindividuell ermitteln zu können. Die Ergebnisse des nativen hypo-osmotischen Schwelltests und die gemessenen Motilitätswerten nach dem Auftauen korrelieren ($P \leq 0,001$) stark miteinander. Die untersuchten Ejakulatparameter Gesamtmotilität und progressive Vorwärtsbeweglich-

keit waren bei Bullen mit einem Alter zwischen drei und vier Jahren am höchsten (PADRIK und JAAKMA, 2004). Eine weitere Studie befasste sich mit der alterungsbedingten Veränderung der Ejakulatparameter und untersuchte dabei unterschiedliche Bullen jeweils mit einem Alter von 12 Monaten sowie ein weiteres Mal mit einem Alter von vier Jahren. Dafür wurden die Ejakulate konventionell kryokonserviert und nach dem Auftauen untersucht. Es wurde festgestellt, dass die Spermiengesamtmotilität (CASA) und die Membranintegrität (Sybr14/PI) bei den Bullen mit einem Alter von vier Jahren signifikant höher waren, als bei denselben Tieren mit einem Alter von einem Jahr (HALLAP et al., 2004).

Inwiefern proximale Plasmatröpfchen am Spermien Schwanz einen negativen Einfluss auf das Befruchtungspotential bei der In vitro-Fertilisation (IVF) haben, wurde in einer Studie von AMANN et al. (2000) untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Spermien von zwölf Monate alten Bullen mit einer hohen Inzidenz von proximalen Plasmatröpfchen einen stark negativen Einfluss auf den Erfolg der IVF haben. Mit fortschreitendem Alter derselben Bullen nahm die Inzidenz der Plasmatröpfchen ab und das Befruchtungspotential entwickelte sich positiv. Junge Bullen mit zwölf Monaten, bei denen mehr als 30 % der Spermien Plasmatröpfchen besitzen, haben ein wesentlich schlechteres Befruchtungspotential (AMANN et al., 2000).

Der Einfluss des Bullenalters und der Genetik auf die körperlichen Merkmale des Skrotums und der Spermienproduktion und -qualität wurde u.a. in einer Untersuchung in Brasilien eruiert. Dabei differenzierte man zwischen den Rassen *Bos taurus* und *Bos taurus indicus*. Bei beiden Rassen nahmen das Ejakulatvolumen, die Spermiengesamtzahl und die Anzahl lebensfähiger Spermien mit steigendem Alter signifikant ($P \leq 0,05$) zu. Es gab allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Spermienkonzentration, die Motilität und die morphologischen Veränderungen. Bei beiden Rassen korreliert ($P \leq 0,05$) die Hodengröße positiv mit der Spermienproduktion und Qualität (BRITO et al., 2002).

2.2 Geschlechtsspezifische Spermien sortierung mittels Durchflusszytometrie

Das grundlegende Prinzip der Spermien sortierung ist als quantitative Durchflusszytometrie zu verstehen. Dabei beruht die Systematik der Trennung auf dem unterschiedlichen DNA-Gehalt von Y- und X-Chromosomen tragenden Spermien (JOHNSON et al.,

1987; JOHNSON und WELCH, 1999). Die im Kopf eines jeden Spermiums befindliche DNA wird vor dem Prozess durch Koinkubation mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33342) angefärbt. Der DNA-Gehalt unterscheidet sich tierartspezifisch - teilweise auch rassespezifisch - und liegt bei den heimischen Nutztieren zwischen 3,0 % und 4,5 % (GARNER et al., 1983; GARNER, 2006). Um diese Differenzen messen und die Spermien in Y- und X- Chromosomen tragende Populationen trennen zu können, muss jedes Spermium einen hochtechnisierten Prozess durchlaufen, bei dem es verschiedenen Einflüssen ausgesetzt wird, die eine Belastung für das Spermium bedeuten (JOHNSON und WELCH, 1999; MAXWELL et al., 2004; RATH und JOHNSON, 2008).

Der gesamte Differenzierungsprozess ist dabei in verschiedene Stufen unterteilt. Zunächst werden die zu sortierenden Spermien mit Hoechst 33342 für eine Stunde bei 38 °C inkubiert (KLINC und RATH, 2005). Der Farbstoff durchdringt die Membran des Spermienkopfes und verbindet sich mit der DNA. Dabei hängt die gebundene Menge des Farbstoffs von der im Kopf enthaltenen Menge an DNA ab. Die fluoreszierend gefärbten Spermien werden mittels UV-Laser angeregt und emittieren mit einer verschiedenen hohen Intensität. Hierzu werden die Spermien vor einem UV-Laserstrahl hydrodynamisch ausgerichtet und dann in einem je nach DNA-Gehalt elektrisch geladenen, freien Tröpfchenstrahl in einem elektrostatischen Feld abgelenkt, in Auffangröhrchen gesammelt und anschließend gewaschen. Das Spermienpellet wird mit einem Kühlverdünner resuspendiert und nach Anpassung auf 4 °C und Endverdünnung in einem glyzerinhaltigen Tiefgefrierverdünner programmiert eingefroren (SEIDEL et al., 1996; JOHNSON und WELCH, 1999; RATH et al., 2003).

In jedem Bullenejakulat ist physiologisch bedingt ein Anteil an membrangeschädigten Spermien enthalten. Um diese aussortieren zu können, wird neben der Anfärbung mit Hoechst 33342 zusätzlich der Lebensmittelfarbstoff FD&C Rot Nr. 40 hinzugegeben. Dieser Farbstoff diffundiert in membrangeschädigte Spermienköpfe und überlagert die Emission des Fluoreszenzfarbstoffs, welcher die Zuweisung einer elektrischen Ladung auslösen würde. So ist es möglich, membranveränderte Spermien aus einem Ejakulat zu selektieren (SEIDEL und GARNER, 2002; MICHL, 2014).

2.3 Bestandteile und Funktion des bovinen Seminalplasmas

Der Bulle besitzt vier akzessorische Geschlechtsdrüsen (glandulae genitalis accessoriae), welche das Seminalplasma produzieren. Es sind die Vorsteherdrüse (Prostata), die beiden Samenleiterampullen (Ampulla ductus deferentis), die paarige Samenblasendrüse (Glandula vesicularis) und die paarige Harnröhrenzwiebeldrüse (Glandula bulbourethralis) (WIESNER, 2000). Das Seminalplasma als Sekret ist definiert als **Schutz-, Transport- und Nährmedium** für die Spermien und macht ca. 90 % des Ejakulats aus (SCHWERHOFF, 2012). Es bestimmt das Volumen des Ejakulats und liefert für die Spermien ein optimales metabolisches Niveau (GASSE et al., 1999). Die Volumenanteile der jeweiligen Geschlechtsdrüsen wechseln innerhalb der Ejakulatfraktionen, da die Sekretabgabe der Drüsen nicht simultan verläuft (GASSE et al., 1999). Das Seminalplasma besteht sowohl aus organischen, als auch anorganischen Bestandteilen, wobei vor allem die Bestandteile mit einer höheren molekularen Masse, die Proteine, zu nennen sind (TEDESCHI et al., 2000). Die **Seminalplasmaproteine** spielen eine elementare Rolle bei der Kapazitation, der Akrosomreaktion, der Motilität und der Spermium-Oozyten-Fusion (GWATHMEY et al., 2003; SUAREZ, 2006). Ist der Anteil der Seminalplasmaproteine 26 kDa (pl 6,2) sowie 55 kDa (pl 4,5) im Ejakulat hoch, führt dies zu einer besseren Fruchtbarkeit des Bullen in vivo, wohingegen ein hoher Anteil des Proteins 16 kDa (pl 6,7) auf eine niedrige Fertilität des Bullen schließen lässt (KILLIAN et al., 1993). Das Protein PDC-109 löst die Kapazitation der Spermien aus (DESNOYERS und MANJUNATH, 1992). Die genauen Abläufe der Kapazitation sind noch nicht abschließend geklärt. Der erste Schritt ist die Entfernung der Dekapazitationsfaktoren, was zu einer höheren Permeabilität der Spermienmembran für lipidbindende Proteine des Eileiters führt. Dadurch wird ein Cholesterinefflux aus der Plasmamembran ausgelöst (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001). Der gesamte Prozess führt zu einer Destabilisierung der Spermienmembran und zu einer Erschöpfung des Metabolismus. Nicht-kapazitierte Spermien werden durch den Eileiter selektiert (TÖPFER-PETERSEN, 2007). Bestimmte Proteine des Seminalplasmas sollen eine Aussage über die Geschlechtsreife und das Fertilitätspotentials eines Jungbullen erlauben. Dabei haben Jungbullen mit einer hohen Futtereffizienz einen hohen Anteil des Proteins „*epididymal sperm-binding protein-1*“ und einen niedrigen Anteil des „*protein-C inhibitor*“ (MONTANHOLI et al., 2016). Durch einen frühen Beginn einer effizienten Fütterung unter gleichbleibenden Konditionen ist

so die Nutzung wertvoller genomischer Jungbullen früher zu erzielen (OSMERS und HERMANN, 2017).

Die elementaren Bestandteile des bovinen Seminalplasmas werden in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Seminalplasmas beim Bullen, Auszug aus MANN und LUTWAK-MANN (1981)

Inhaltsstoff	mg/100 ml
Stickstoff	440 – 1170
Natrium	150 – 370
Kalium	50 – 380
Kalzium	24 – 60
Magnesium	8
Zitronensäure	350 – 1000
Milchsäure	20 – 50
Ascorbinsäure	6
Kreatin	12
Bicarbonat	16
Chlorid	150 – 390
Fruktose	300 – 1000
Sorbitol	10 – 136
Inositol	24 – 46
Ergothionein	Spuren
Glycerylphosphorylcholin	110 – 500

Weitere Bestandteile sind Androgene, Östrogene, hCG, LH, FSH, Prolaktin und unterschiedliche Prostaglandine (VENTURA und FREUND, 1973; NEY, 1986; WABERSKI und PETRUNKINA, 2007). Die genannten Bestandteile halten den Metabolismus der Spermien aufrecht. Dazu fördert bzw. hemmt das Seminalplasma bestimmte Prozesse. Zu nennen sind dabei die Dekapazitationsfaktoren (AUSTIN, 1952). Der Zustand der Dekapazitation ist reversibel. Gibt man zu bereits kapazitierten Spermien Seminalplasma, wird deren Befruchtungsfähigkeit gehemmt. Es kann zu einer Rekapazitation im weiblichen Genitaltrakt kommen (CHANG, 1957).

2.3.1 Auswirkung der Verdünnung auf den Anteil wirksamer Seminalplasmakomponenten

Die Verdünnung des Nativejakulats ist von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Fertilität der Spermien. Ohne Verdünnung sind Spermien *in vivo* nur wenige Stunden lang befruchtungsfähig. In Kombination mit einer Reduktion der Umgebungstemperatur, welche den Metabolismus der Spermien senkt, wird die Befruchtungsfähigkeit verlängert (WEITZE, 2001).

Durch die Verdünnung der Ejakulate für die konventionelle Kryokonservierung, aber auch während des Prozesses der geschlechtsspezifischen Differenzierung, kommt es zu Verdünnungseffekten (MAXWELL und JOHNSON, 1999). Unter dem **Verdünnungseffekt** versteht man eine relative Verminderung des Seminalplasmaanteils und von essentiellen intrazellulären Bestandteilen durch die Zugabe des Gefrierverdünners. Diese führt zu einem Verlust der Motilität, des Spermienmetabolismus und der Befruchtungsfähigkeit (MANN, 1964). Der positive Einfluss des Seminalplasmas auf die Spermien setzt der Verdünnung natürliche Grenzen. Das eingesetzte Verdünnermedium führt zu einer Reduktion der an den Spermien angelagerten Proteine und einer Ausverdünnung der essentiellen Seminalplasmabestandteile, wie Antioxidantien, welche von Bedeutung für die Membranintegrität sind (MAXWELL und JOHNSON, 1999; MÖNCH-TEGEDER, 2012). Um diesen Verlust auszugleichen, kann man sich die protektive Wirkung des Seminalplasmas zu Nutze machen und es als prozentualen Bestandteil dem Verdünnungsmedium hinzugeben. Vor allem bei nicht sortierten und sortierten, aber auch bei normal konzentrierten und hoch verdünnten Besamungsportionen, führte die Supplementierung von Seminalplasma zu einer verbesserten Spermienqualität (GARNER et al., 2001; HERNANDEZ et al., 2007). Zu beachten ist, dass es einen bullenindividuellen Verdünnungsgrad gibt, bei dem das Fertilitätspotential optimal ist (HAUGAN et al., 2007). Dabei soll einer der negativ beeinflussenden Effekte auf die Lebensfähigkeit der Spermien durch die Verdünnung, das Verhältnis zwischen dem Gesamtvolumen und der Spermiengesamtzahl im Nativejakulat und der Seminalplasmakonzentration in der Endverdünnung sein. Die Arbeitsgruppe untersuchte den Verdünnungseffekt verschiedener Abstufungen (2, 10, 20, 40 und 60×10^6 Spermien/ml) auf die Plasmamembranintegrität von Bullenspermien (GARNER et al., 1997).

Nach grundlegenden Weiterentwicklungen und Modifikationen der Verdünnermedien und –verfahren und des Besamungsregimes sind diese Aussagen heutzutage nicht mehr aktuell. Es wurde festgestellt, dass ein hoher Verdünnungsgrad nicht grundsätzlich einen negativen Effekt auf die Spermiovitalität hat (CHRISTENSEN et al., 2011).

2.3.2 Schädigende Einflüsse auf die Spermien durch die Ejakulatbehandlung und dessen Folgen auf die Trächtigkeitsraten

Schädigungen an Spermien sind in primäre, sekundäre und tertiäre Mängel klassifiziert. **Primäre Spermienmängel** entstehen während der Spermatogenese im Hoden des Vartieres und gelten als schwerwiegend. Das Tier wird von der Zucht ausgeschlossen. Zu ihnen zählen Kopf-, Mittel- und Schwanzmissbildungen (WABERSKI und PETRUNKINA, 2007). **Sekundäre Missbildungen** ergeben sich während der Nebenhodenpassage und stellen sich als Akrosomablösungen, Halsbrüche oder Plasmotropfen dar. **Die tertiären Veränderungen** werden durch äußere Einflüsse nach der Samementnahme und Untersuchung provoziert und stellen sich beispielsweise als Schwanzschleifen oder Halsbrüche dar (WEITZE, 2001). Um tertiäre Schäden der Spermien durch die Kryokonservierung ausgleichen zu können, wird die Spermienanzahl in der Besamungsportion entsprechend hoch angesetzt. Das erklärt die höher dosierte Spermienanzahl gegenüber der Besamung mit Frischsamen (JOHNSON, 1985). In einem persönlichen Gespräch im Jahre 2015 mit Stephane Alkabes wurde berichtet, dass die Spermien von Jungbullen wesentlich empfindlicher gegenüber dem Verdünnungseffekt bei der Kryokonservierung und dem strapaziösen Sortierprozess sind. Laut Alkabes lassen sich Jungbullen wesentlich schlechter sortieren, was darauf zurückzuführen ist, dass die Spermienmembran offensichtlich weniger widerstandsfähig ist. Anfärbeversuche mit dem Lebensmittelfarbstoff Allurarot AC, E 129 (FD40) haben gezeigt, dass die Plasmamembran der Spermien beim Jungbullen im Vergleich zum Altbullen durchlässiger ist. Ab einem Alter von ≥ 2 Jahren steigen die Sortierfähigkeit und dadurch die Widerstandsfähigkeit der Spermien an (ALKABES, 2015). Detlef Rath berichtete im Jahr 2016 in einem persönlichen Gespräch, dass die Besamungsstationen zurzeit sortierte Besamungsportionen von Jungbullen mit $2,5 \times 10^6$ Spermien verkaufen (RATH, 2016). Aus ökonomischer Sicht ist dieses Verfahren nachvollziehbar und bei der Nutzung von Altbullenejakulaten auch wissenschaftlich erwiesen und durchführbar. DEN DAAS et al. (1998) berichten, dass 95 % der maximalen Trächtigkeitsraten bereits mit Spermienzahlen in der Besa-

mungsportion von 1 bis 11×10^6 erreicht werden (DEJARNETTE et al., 2008). Überprüft werden muss jedoch, ob die Spermien von Jungbullen diese hohe Verdünnung tolerieren.

Um die schädigenden Einflüsse der Kryokonservierung auf Bullenspermien zu minimieren, erhebt die Empfehlung 8.3 der ADR (2006b) **Richtwerte** für die **Qualität von Bullensperma** im Handel und bezieht sich dabei auf die **EU-Richtlinie 88/407/EWG**, welche tierseuchenrechtliche Anforderungen an den Handelsverkehr mit gefrorenem Samen von Rindern in der EU und an dessen Einfuhr definiert. Laut ADR muss Tiefgefriersamen in einem handelsüblichen Verdünner, der den Anforderungen der EU-Richtlinie 88/407/EWG entspricht, kryokonserviert werden und unter definierten Auftaubedingungen (10 sek in einem 38 °C Wasserbad) eine Vorwärtsbeweglichkeit von 50 % nach dem Auftauen erreichen (ADR, 2006b). Nicht näher definiert ist, wie sich der Wert über die Dauer eines Thermoresistenztests verhalten soll. Es werden keine Angaben zum Membranpotential oder den morphologischen Abweichungen gemacht.

Spermien besitzen bekannte und unbekanntere Faktoren, die die Befruchtung beeinflussen (DEN DAAS et al., 1998). Die spermatologische Untersuchung der Ejakulate von Jung- und Altbullen gehört auf einer Besamungsstation zur täglichen Routine. So werden Ejakulate mit einer verminderten Qualität vor der Kryokonservierung ausselektiert. Die Anforderungen für unsortierte Spermien liegen meist bei einer Gesamtmotilität im Nativejakulat von ≥ 70 %. Für **sortierte Spermien** wurde eine **Liste mit Mindestanforderungen** veröffentlicht, die Richtwerte für die Praxis geben soll. Diese werden in der Tabelle 4 dargestellt. Die angegebenen Werte beziehen sich auf aufgetaute und sortierte Spermien.

Tabelle 4: Mindestanforderungen an sortierte Spermien (RATH et al., 2009) aus STROTHMEYER (2013)

Mikroskopische Beurteilung	Minimalanforderung
Einzelpermienbeweglichkeit (in %)	≥ 50
Motilität im Thermo-Toleranz-Test nach 6 Stunden (in %)	≥ 30
Anzahl lebender Spermien (Mio./Straw)	≥ 2
Fluoreszenz-Analyse	
Syto17/ FITC-PNA intakt (in %)	≥ 70
Sortierreinheit (in %)	≥ 90
Defragmentationsindex	≤ 5
Morphologische Beurteilung	
Spermienkopfveränderungen (in %)	≤ 5
Kopfkappenveränderungen (in %)	≤ 10
Gesamtmorphologische Veränderungen (in %)	≤ 20

Für die Bestimmung der Spermienqualität nach dem Auftauen wird der **Thermoresistenztest** genutzt. Dieser untersucht zu unterschiedlichen Messzeitpunkten die Motilität, die Membranintegrität und die morphologischen Abweichungen. Die zu untersuchenden Proben werden dafür auf einen Wärmeblock bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und komplett abgedunkelt gelagert. Die sechsstündige Dauer des Thermoresistenztests wird damit begründet, dass eine Temperatur von 37 °C und Dunkelheit dem Milieu innerhalb des bovinen Genitaltrakts nahe kommt und dadurch die Reaktion der Spermien auf diese Umweltbedingungen nachbildet. So sollen Rückschlüsse auf die Spermienqualität nach dem Auftauen erzielt werden können (MULLER, 2000). Die artifiziell geschaffenen Umgebungsbedingungen des weiblichen Genitaltrakts führen zu einem Energieverlust der Spermien. Die morphologische Integrität ist entscheidend dafür, ob die Spermien über eine ausreichende Stabilität verfügen, um die Bewegung durch den Genitaltrakt zu bewältigen. In der Literatur wird darüber diskutiert, welcher der untersuchten spermatologischen Parameter Motilität (FARRELL et al., 1998; JANUSKAUSKAS et al., 2001), Membranintegrität (CHRISTENSEN et al., 2005) oder Morphologie (PHILLIPS et al., 2004) den größten Aussagewert über das Fertilitätspotential besitzt.

Neuere Studien belegen, dass bei sortierten Spermien die Gesamtmotilität einen signifikanten Einfluss auf die Trächtigkeitsrate hat. Dabei wurden die Trächtigkeitsraten nach

dem Einsatz von gesorteten und „ungesorteten“ Spermien mit den Ergebnissen der In-vitro-Untersuchung der Spermienfunktionalität verglichen. Die Besamungsportionen wurden je nach Verfahren mit den bekannten Kennzahlen kryokonserviert und eingesetzt. Interessant sind hier folgende Ergebnisse: die Motilität der unsortierten Besamungsportionen nach dem Auftauen betrug im Mittel 58,9 % (niedrigster Wert: 54,0 %, höchster Wert: 62,7 %), die der sortierten Besamungsportionen lag bei 55,3 % (38,8 %, 60,5 %). Die „unsortierten“ Proben waren signifikant ($P \leq 0,04$) besser. Die Trächtigkeitsraten „unsortiert“ erreichten 54,2 % und die sortiert 47,8 %. Über das Alter der Tiere wurden keine Angaben gemacht (HOLDEN et al., 2017). Eine weitere Begründung für die sechsstündige Dauer des Thermoresistenztest ist, dass motile Spermien ca. sechs Stunden ab dem Zeitpunkt der postzervikalen Samenablage benötigen, um zum Ort der Befruchtung in den Eileiter zu gelangen. Somit wird eine aufgetaute Besamungsportion, die zum Messzeitpunkt 6 h nach dem Auftauen noch ≥ 30 % motile Spermien hat, als qualitativ gut eingeschätzt und als fertil bewertet. Für den erfolgreichen physiologischen Ablauf der Befruchtung sind sowohl motile als auch morphologisch intakte Spermien vonnöten (RATH et al., 2009).

2.4 Kryokonservierung von Bullenspermien

Die Entdeckung der kryoprotektiven Wirkung von Eigelb im Jahre 1939 war der Beginn und die Basis der Entwicklung der Ejakulatverdünnung und damit einhergehend mit der Kryokonservierung von Spermien verschiedenster Spezies (PHILLIPS, 1939). Die künstliche Besamung ist die älteste biotechnologisch assistierte Reproduktionstechnik. Der Einsatz von Glycerin als Kryoprotektivum ermöglichte es, Bullenspermien über einen längeren Zeitraum befruchtungsfähig und für die künstliche Besamung nutzbar zu machen (POLGE et al., 1949). Ein weiterer Schritt war die Entdeckung, dass thermodynamische Prozesse bei einer Temperatur von -196 °C temporär unterbrochen sind. Nachdem verschiedene Techniken für die Kryokonservierung boviner Spermien bei -196 °C entwickelt wurden, geht man bis heute davon aus, dass entsprechend konservierte und gelagerte Besamungsportionen ihr Fertilitätspotential über mehrere tausend Jahre aufrechterhalten können (MAZUR, 1980).

2.4.1 Grundlagen der Kryokonservierung

Die drei wesentlichen Schritte bei dem Einfrierprozess sind die Abkühlung, die Kryokonservierung und der Auftauprozess. Während dieser drei Schritte entstehen für die Spermien thermische, mechanische und chemische Stressoren, welche zu Schädigungen führen können. Mögliche Schädigungen sind: Eine verminderte Motilität, eine reduzierte Integrität der Akrosom- und Plasmamembran und Schädigungen der Spermien-DNA (MÖNCH-TEGEDER, 2012). Ursachen dafür sind Kälteschock und Eiskristallbildung während der Kryokonservierung, oxidativer Stress durch osmotische Veränderungen und eine Lipid-Protein-Reorganisation in der Zellmembran nach dem Auftauen (WATSON, 1995; BAILEY et al., 2000; BUCAK et al., 2010).

Nach der Verdünnung des Ejakulats werden die Spermien über ein mehrstufiges Verfahren auf 4 bis 5 °C herabgekühlt und bei dieser Temperatur für 2 bis 4 h äquilibriert (ENNEN et al., 1976; DHAMI und SAHNI, 1993). Bei der **Abkühlung** ist ab einer Temperatur von unter 5 °C der Metabolismus der Spermien reduziert. Die Temperatursenkung erfolgt mehrstündig und sensibel, da ein radikales Herabsenken zu Veränderungen der Plasmamembran und einer Erhöhung der Membranpermeabilität führt (ANDRABI, 2009). Weitere negative Effekte sind eine verminderte Motilität der Spermien durch Energieverluste, welche durch einen gehemmten Fruktose- und Sauerstoffabbau sowie durch eine verminderte ATP-Synthese induziert werden (VISHWANATH und SHANNON, 2000). Ebenso wird eine verfrühte Kapazitation durch einen Kalzium-Influx in die Spermien ausgelöst (WATSON, 2000). Die Abkühlgeschwindigkeit ist von Bedeutung, da sie einen Einfluss auf die Auftauqualität hat (MAZUR, 1980). Meist wird eine langsame Abkühlgeschwindigkeit empfohlen. Diese sollte bei 0,1 °C/min liegen. Ein Vergleich dreier Abkühlgeschwindigkeiten (0,2 °C/min; 0,75 °C/min und 3 °C/min) ergab die besten Auftausergebnisse bei einer Geschwindigkeit von 0,2 °C/min (CHAVEIRO et al., 2006). Eine weitere Untersuchung empfiehlt eine Abkühlgeschwindigkeit von 0,1 °C/min, verglichen mit einer schnellen Rate von 4,2 °C/min (JANUSKAUSKAS et al., 1999). Durch das Abkühlen kommt es zu einer Dehydration der Zellen. Das Ausmaß der Dehydration kann man durch eine angepasste Abkühlgeschwindigkeit regulieren. So ist es möglich durch eine langsame Abkühlungsrate eine langsame Dehydration der Zelle zu erreichen, wohingegen eine schnelle Rate bewirkt, dass das intraspermale Wasser nicht schnell genug diffundieren kann, und es somit zu intrazellulärer Eiskristallbildung kommt. Dies

führt zu Membrandefekten. Durch den Einsatz von Glycerin als Kryoprotektivum ist es gelungen, diese Membrandefekte zu reduzieren. Glycerin minimiert den ungefrorenen Wasseranteil innerhalb eines Mediums und schwächt dadurch die osmotische Dehydratation des Spermiums in der Folge der Abnahme der Elektrolytkonzentration während des Einfrierens ab (POLGE et al., 1949; BAILEY et al., 2000).

Nach dem Abkühlen und dem Ende der Äquilibration erfolgt die maschinelle Konfektionierung in 250 µl Straws. Daran angeschlossen findet die **Kryokonservierung** mittels flüssigen Stickstoffs (LN₂) in einem Einfrierautomat statt. Es gibt eine Vielzahl von Einfrierraten und -kurven. Durch moderne Einfrierautomaten hat man die Möglichkeit die Einfrierkurven abzuspeichern und so konstant zu reproduzieren (ALLEN und ALMQUIST, 1981). Auch bei der Kryokonservierung spricht man von einem schnellen oder langsamen Einfrierverfahren. Die Vitrifikation stellt dabei die schnellste Konservierungsform dar. Hier kommt es quasi zu einer unverzüglichen Überführung in LN₂, was zu einer glasartigen Verfestigung der Lösung bei zufälliger Anordnung der Moleküle führt (LIEBERMANN, 2003). Die Einfrierrate erreicht -15.000 bis -30.000 °C/min und mehr (ARAV und ZERON, 1997). Im Gegensatz zu Rindereizellen spielt dieses Verfahren in der Spermienkonservierung von Bullen bislang keine Rolle. Von einer **langsamen Einfrierkurve** spricht man bei einer Geschwindigkeit von 1 bis 2 °C/min zwischen +5 und -15 °C und 4 bis 5 °C/min zwischen -15 und -79 °C (POLGE, 1957). Eine **schnelle Einfrierkurve** arbeitet mit einer Geschwindigkeit von 15 °C/min zwischen +5 und -100 °C und anschließender Überführung in LN₂ (CHEN et al., 1993).

Die Kryokonservierung schädigt die Zellstruktur der Spermien. Das hat zur Folge, dass eine zunehmende Desintegrität der Akrosom- und Plasmamembran und reduzierte Motilitätswerte zu beobachten sind (WATSON, 1995). Der kritische Temperaturbereich liegt bei -5 bis -15 °C. Hier kommt es zum Gefrieren der extrazellulären Flüssigkeit. Die Spermienmembran geht währenddessen von einem fluiden in einen gelartigen Zustand über und verhindert dadurch das Eindringen von Eiskristallen in das Zellinnere (MAZUR, 1985). Dieser Prozess erhöht die extrazelluläre Elektrolytkonzentration und führt zu einer osmotischen Dehydratation der Spermien. Die Kristallisation des reinen Wassers und eine dadurch begründete Erhöhung der gelösten Stoffe im Restwasser sind dafür ursächlich. Dabei hängt die Dehydratation von der Einfriergeschwindigkeit und der Wasserpermeabilität der Plasmamembran ab. Weiterhin kommt es zu einer mechanischen Schädigung der Spermien, wenn diese in den eisfreien Zwischenräumen des sich

ausdehnenden Eises eingengt werden (COURTENS und PAQUIGNON, 1985). Eine langsame Geschwindigkeit fördert dabei einen ausgeglichenen Stoffaustausch zwischen Spermien und Umgebungsflüssigkeit wohingegen ein schnelles Einfrieren das Austreten der intrazellulären Flüssigkeit verhindert. Dies hat die Bildung von Eiskristallen innerhalb des Spermiums zur Folge (WABERSKI und PETRUNKINA, 2007).

Der **Auftauprozess** ist essenziell für das Aufrechterhalten der Befruchtungsfähigkeit der Spermien. Eine vergleichbare Abkühl- und Auftaukurve minimiert Auftauschäden der Spermien. Der kritische Temperaturbereich für konservierte Spermien während des Auftauens liegt zwischen -50 °C bis -5 °C . Die Spermien sind während des Auftauprozesses einem osmotischen Gradienten unterlegen, der durch eine Reduzierung der Salzkonzentration im umgebenen Medium hervorgerufen wird (MAZUR, 1984). Um eine Rekristallisation der Zelle von schnell eingefrorenen Spermien zu vermeiden, sollte ebenso schnell aufgetaut werden. So können Membranschäden vermieden werden, da das extra- und intrazelluläre Medium schneller wieder ins Gleichgewicht gelangt (ANDRABI, 2009). Aktuell wird in der Praxis dazu geraten, den $250\text{ }\mu\text{l}$ Straw für 20 sek in einem 38 °C warmen Wasserbad aufzutauen (KLINC, 2005). Andere Studien befassten sich mit unterschiedlichen Auftautemperaturen und Zeiten (5 sek bei 80 °C ; 15 sek bei 60 °C und 60 sek bei 40 °C). Ein schnelles Auftauen bei 80 °C führte zu einer Motilität von 38,15 %, ein mittleres Auftauen bei 60 °C zu 35,15 % und das langsame Auftauen bei 40 °C zu einer Motilität von 35,15 % (DHAMI und SAHNI, 1993). Das entsprechende Auftauverfahren hängt letztendlich von der Verpackungsart und dem Volumen ab (CHANDLER et al., 1984). Es bestehen unterschiedliche Oberflächen-Volumen-Verhältnisse, was unterschiedliche Temperaturgradienten innerhalb der Verpackung bedeuten und neben dem eingesetzten Verdüner, der Glyzerinkonzentration und der Abkühl- und Einfrierkurve einen Einfluss auf das verwendete Auftauverfahren hat (SENGER et al., 1983).

2.4.2 Effekte des Einfrier- und Auftauprozesses auf die Spermienintegrität

Der Einfrier- und Auftauprozess kann die Spermien reversibel bzw. irreversibel schädigen. Man spricht hier auch von **kompensierbaren** und **nicht kompensierbaren** Spermamängeln. Als kompensierbar bezeichnet man einen Mangel, der bei einzelnen Spermien auftritt, aber durch die anderen Spermien innerhalb der Besamungsportion annä-

hernd ausgeglichen werden kann, ohne dabei das Befruchtungspotential zu reduzieren (SAACKE et al., 2000). Ein Mangel, der die numerische und strukturelle DNA betrifft, wird als nicht kompensierbar bezeichnet. Die Spermien können morphologisch unauffällig und sogar befruchtungsfähig sein, führen aber zu einer schlechten Embryonalqualität und entsprechend zu Verlusten (WABERSKI et al., 1999).

Diese durch die Kryokonservierung erwarteten Mängel versucht man durch eine hochdosierte Besamungsdosis zu kompensieren. Die hohe Dosierung der Besamungsportion führt allerdings zu keiner Reduktion nicht kompensierbarer Spermenschäden und trägt somit auch nicht zur Aufrechterhaltung der Fruchtbarkeit einer Besamungsportion bei (SCHWARTZ et al., 1981). Die Barrieren des weiblichen Genitals - die Zervix und der Eileiter - dienen der Selektion solcher Spermienmängel. So sind nur motile Spermien in der Lage zum Ort der Befruchtung zu gelangen (BEBELING, 2001). Kommt es durch das Auftauen zu Membranschäden der Spermien, so ist der weibliche Genitaltrakt in der Lage durch Abwehrreaktionen der Epithel- und Immunzellen solche Spermien zu selektieren (ZERBE et al., 2003). Eine verkürzte Lebensdauer von Spermien im weiblichen Genitaltrakt spricht für durch die Kryokonservierung ausgelöste Schäden der Spermien. Spermien, die durch das Einfrieren kompensierbare Schäden erlitten haben, können ihr Befruchtungspotential zwar behalten haben, sind jedoch nicht mehr in der Lage, die Passage des Eileiters aus eigener Kraft zu vollziehen (Holt, 2000a).

Der Einfrier- und Auftauprozess führt zu der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (BILODEAU et al., 2000). **Reaktive Sauerstoffspezies** sind reaktionsfreudige und kurzlebige Moleküle, die mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen. Diese haben das Bestreben, eine chemisch stabilere Form einzugehen und binden daher an Lipide und Proteine der Spermienmembran (ALVAREZ et al., 1987; IWASAKI und GAGNON, 1992). Die Spermienmembran ist eine Lipiddoppelschicht - zusammengesetzt aus Phospholipiden und Cholesterin - welche mit integralen und peripheren Proteinen durchsetzt ist (DARIN-BENNETT und WHITE, 1977; NOLAN und HAMMERSTEDT, 1997). Spermien produzieren aktiv reaktive Sauerstoffspezies. Dies erhöht die Tyrosinphosphorylierung, was die Kapazitation positiv beeinflusst (DE LAMIRANDE und GAGNON, 1993). Unter normalen Bedingungen entstehen die reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien der Spermien im mitochondrialen Komplex 3 durch die Zellatmung und werden in die Umgebungsflüssigkeit abgegeben. Durch die Stresssituation der Kryokonservierung verlagert sich die Produktion in den Komplex 1 der Mitochondrien und die reaktiven Sauer-

stoffspezies verbleiben in den Mitochondrien. Dies führt zu einer Motilitätsreduktion, welche abhängig von der Produktionshöhe der reaktiven Sauerstoffspezies bis hin zum Zelltod führen kann (KOPPERS et al., 2008; AITKEN et al., 2012). Ein hoher Anteil reaktiver Sauerstoffspezies in der Samensuspension führt zu einer Lipidperoxidation und schädigt die Plasmamembran der Spermien. Enthält die Spermienmembran einen hohen Anteil von ungesättigten Fettsäuren, ist eine oxidative Schädigung durch freie Radikale sehr wahrscheinlich (PARKS und GRAHAM, 1992).

Eine Schädigung der Plasmamembran reduziert die Motilität und erhöht den Anteil morphologisch veränderter Spermien (SIKKA, 1996; BUCAK et al., 2010; BANSAL und BILASPURI, 2011). Der Einfrier- und Auftauprozess führt zu einer permanenten strukturellen Belastung der Spermienmembran. So wird der Zellinhalt während des Einfrierens herabgekühlt bleibt allerdings noch einige Grad unterhalb des Gefrierpunktes flüide. Dies bedeutet eine Wasserdehydration während des Einfrierens und einen Wassereinstrom während des Auftauens für die Spermienmembran (WATSON und PLUMMER, 1985). Die beschriebenen Effekte auf die Spermienintegrität können als direkte und indirekte Schäden bezeichnet werden. Dabei sind direkte Schäden solche, die durch die entstehenden Eiskristalle induziert worden sind. Indirekte Schäden entstehen durch die unterschiedlichen Stoffkonzentrationen während der Konservierung (GAO und CRITSER, 2000; WOLKERS et al., 2002). So ist beispielsweise der Kälteschock ein indirekter Schaden. Der Kälteschock tritt bei einer unphysiologischen Temperatur knapp oberhalb des Gefrierpunktes auf (GHETLER et al., 2005) und führt zu einer verminderten Motilität und einem verminderten Metabolismus sowie zu Plasmamembran- und Akrosomschäden (WHITE, 1993).

2.4.3 Entwicklung von Tiefgefriermedien für Bullenspermien und deren spezifische Inhaltsstoffe

Die Verdünnung boviner Ejakulate ist für die Spermienintegrität und –funktionalität nach dem Auftauen essentiell. Die verwendeten Tiefgefriermedien haben dabei qualitätsbeeinflussende Inhaltsstoffe. Dabei wird zwischen **unspezifischen** und **spezifischen Inhaltsstoffen** unterschieden. Unspezifische Inhaltsstoffe sind Eigelb, Serumalbumin oder Antioxidantien. Spezifische Inhaltsstoffe sind Kryoprotektiva wie Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO). Ein Großteil der aktuell eingesetzten, bovinen Konservie-

rungsmedien basiert auf einem Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)-Puffer. Das Medium beinhaltet Substanzen wie Glukose oder Fruktose als Energieträger, Glycerin und Eigelb als Kryoprotektivum, osmolaritätsstabilisierende Stoffe, welche die Viabilität der Spermien erhalten sollen oder Antibiotika, um das Keimwachstum zu minimieren (Holt, 2000b). Ein pH-Wert zwischen 6,0 und 7,0 ist ideal. Die im richtigen Verhältnis eingesetzten Medien bieten den Spermien einen guten Schutz vor dem Kälteschock, halten den osmotischen Druck im Bereich von 250-300 mOsm/l und versorgen sie zusätzlich mit Energie bei gleichzeitig relativ keimfreier Umgebung (HAHN et al., 1993). Weiterführend werden einige exemplarische Inhaltsstoffe näher beschrieben.

Eidotter stellt einen Hauptbestandteil der weltweit eingesetzten Verdünnermedien dar und ist ein nicht-penetrierendes Kryoprotektivum. Dies liegt an der unspezifischen Schutzfunktion (PHILLIPS und LARDY, 1940). Eigelb ist in der Lage, sowohl Kälteschock als auch Gefrierschäden effektiv zu minimieren. Die Schutzwirkung wird dabei auf die positive Eigenschaft der „Low Density Lipoprotein“ Fraktion (LDL) zurückgeführt (PACE und GRAHAM, 1974). Da es sich um ein tierisches Naturprodukt handelt, birgt der Nutzen ein Hygiene- und Kontaminationsrisiko (BOUSSEAU et al., 1998). Auch die kontinuierliche und gleichbleibende Standardisierung fällt schwer, was zum Teil auf negative biologisch aktive Bestandteile zurückzuführen ist (MOUSSA et al., 2002). Das im Eidotter enthaltene LDL besteht zu 83–89 % aus Lipiden (5 % Cholesterol, 26 % Phospholipide und 69 % Triglyceride) und zu 11–17 % aus Proteinen (MARTIN et al., 1964; ANTON et al., 2003). Bis heute ist der genaue Schutzmechanismus der LDL-Fraktion nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass sich die LDL-Fraktion an die Spermienmembran anlagert, und so ihre schützende Wirkung entfaltet (BERGERON et al., 2004). Weiterhin kommt es zu einer Interaktion zwischen LDL und spezifischen Proteinen des Seminalplasmas. Dabei entsteht äußerst schnell eine spezifische und stabile Bindung (MANJUNATH et al., 2002).

Neben Eidotter war die Entdeckung der kryoprotektiven Wirkung von **Glycerin** der Wegbereiter der Kryokonservierung boviner Spermien (POLGE und ROWSON, 1952). Glycerin ist ein dreiwertiger Alkohol, geruchslos und hat je nach Temperatur eine unterschiedliche Viskosität. Je niedriger die Temperatur, desto zähflüssiger ist Glycerin (BAUST, 1973). Es ist in der Lage, die Zellmembran der Spermien zu durchdringen und zählt damit zu den zellpenetrierenden Kryoprotektiva (HAMMERSTEDT et al., 1990). Macht Eidotter durchschnittlich einen Anteil von 20 % im Gefriermedium aus, so rei-

chen bei Glycerin 5–7 % (WEITZE und PETRUNKINA, 2007). Der vergleichsweise geringe Prozentsatz wird durch eine dosisabhängige Toxizität begründet, welcher sich negativ auf die Fruchtbarkeit der Spermien auswirkt (DE LEEUW et al., 1993). Dies betrifft vor allem die Motilität und Membranintegrität. Bereits POLGE et al. (1949) wiesen einen negativen Effekt einer hohen Glycerindosis nach und empfahlen nicht mehr als 5 % Glycerin in das Gefriermedium zu geben. Das Wirkprinzip von Glycerin beruht auf einer Erniedrigung des Gefrierpunktes durch eine Verschiebung der kolligativen Eigenschaften des Mediums (MAZUR, 1984). Durch die hohe Viskosität des Glycerins durchdringt dies langsamer die Spermienmembran als Wasser. Dadurch können osmotische Gefälle entstehen, die zu Zellschäden führen können. Der Einsatz von Glycerin birgt somit auch Risiken. Es überwiegen allerdings - bei richtiger Dosierung - die positiven und kryoprotektiven Eigenschaften (PEGG, 2002).

Eine Alternative zu Glycerin stellt **Dimethylsulfoxid** dar. Im Gegensatz zu Glycerin penetriert es durch das niedrigere molekulare Gewicht schneller durch die Spermienmembran. Dies führt zu einer schnelleren Dehydratation und vermindert die Eiskristallbildung (KUNDU et al., 2002). Dabei ist das Wirkprinzip mit denen anderer permeierender Kryoprotektiva vergleichbar (RASUL et al., 2007). Allerdings besitzt es eine höhere Zelltoxizität bei Temperaturen oberhalb von 4 °C im Gegensatz zu Glycerin (BERNEMANN et al., 2008).

Im Ejakulat von Bullen sind von Natur aus nur wenige **Antioxidantien** (AOs) enthalten, die die Spermien umgeben. Die Spermienmembran besitzt jedoch einen hohen Anteil von ungesättigten Fettsäuren, was sie anfällig für Lipidperoxidation durch reaktive Sauerstoffspezies macht. Um die negativen Effekte von reaktiven Sauerstoffspezies zu reduzieren, können dem eingesetzten Verdünnermedium Antioxidantien hinzugegeben werden. Eine Studie aus 2008 konnte den positiven Effekt der Antioxidantien in Verdünnungsmedien auf die qualitative Beschaffenheit kryokonservierter und aufgetauter Spermien verschiedener Tierarten bestätigen. Dabei wurde die Wirkung von **Katalase**, reduzierter **Gluthione**, **Vitamin E** und **Superoxid Dismutase** erforscht (GROßFELD et al., 2008). Eine weitere Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit den Antioxidantien **Inositol**, **Carnitin** und **Methionin**. Es wurde festgestellt, dass Antioxidantien die Motilität und Membranintegrität verbessern und gleichzeitig das Chromatin der Spermien-DNA vor Beeinträchtigungen schützen (BUCAK et al., 2010). Dieselben positiven Effekte konnten auch beim Wasserbüffel nach Zugabe von 100 µM/ml Zinksulfat zum Tiefge-

friermedium festgestellt werden (DOROSTKAR et al., 2014). Die positive Wirkung von Katalase im Verdünnermedium auf die Überlebensfähigkeit von Spermien ist seit langem bekannt (FOOTE und DUNN, 1962). Der heutige Einsatz von Antioxidantien in Verdünnermedien für geschlechtsspezifisch differenzierte Spermien wird durch die hohe und schädigende Radikalbildung während des Sortierprozesses boviner Spermien begründet (KLINC und RATH, 2007). Das **bovine Serumalbumin** wird ebenfalls zu den Antioxidantien gezählt. Es wurden aber auch unerwünschte Effekte, wie die Senkung des Cholesterolgehalts in der Plasmamembran von Spermien, beobachtet (WOLFE et al., 2001). Die positiven antioxidativen Effekte des bovinen Serumalbumins überwiegen jedoch. Durch eine homogenere Verteilung des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33342 bei Einsatz des bovinen Serumalbumins, konnte die Inkubationszeit von 1,5 h auf 1 h und die Inkubationstemperatur von 38 °C auf 34 °C reduziert werden (KLINC et al., 2007). Aber auch Eidotter besitzt zusätzlich eine antioxidative Wirkung auf die Spermien (LU und BAKER, 1986), weshalb dazu geraten wird, die Spermien im Sortierprozess unverzüglich nach der Sortierung in ein eidotterhaltiges Medium zu überführen (JOHNSON und CLARKE, 1988; KLINC, 2005). Weitere essentielle Verdünnerbestandteile sind verschiedene Ionen, mit denen die Osmolarität im Verdünnermedium eingestellt werden kann. So kann ein osmotisches Gleichgewicht zwischen Zellen und Medium erzielt werden. Zucker, wie beispielsweise Fruktose oder Glukose, besitzen ebenfalls kryoprotektive Eigenschaften und können zusätzlich als Energiequellen für die Spermien genutzt werden.

2.4.4 Einsatz verschiedener Verdünnungsverfahren

Weltweit gibt es bei der bovinen Ejakulatverdünnung zwei Verdünnungsverfahren. Das einphasige und das zweiphasige Verdünnungsverfahren. Bei der **einphasigen Verdünnung** wird dem Ejakulat bei Raumtemperatur ein Einheitsverdünner hinzugegeben. Das Glycerin ist hier bereits im Einheitsverdünner enthalten und durchläuft die mehrstündige Äquilibration auf 5 °C. Für die **zweiphasige Verdünnung** wird dem Ejakulat bei Raumtemperatur die erste Verdünnerphase ohne Glycerin hinzugegeben. Nach der Äquilibration auf 5 °C und direkt vor der Verpackung und der Kryokonservierung erfolgt die Zugabe der zweiten Verdünnerphase die das Glycerin enthält. Durch die direkte Verdünnung der Ejakulate wird die Bildung und Ansammlung von metabolischen Produkten vermieden (FOOTE, 1982). Die Erstverdünnung des Ejakulats sollte bei einer

Temperatur zwischen 30 und 37 °C erfolgen. Dabei sollte das eingesetzte Verdünnermedium dieselbe Temperatur wie das Ejakulat haben (VISHWANATH und SHANNON, 2000). Bereits eine zehnmünütige Aufbewahrung des Ejakulats bei 32 °C im unverdünnten Zustand führt zu Vitalitätsverlusten nach dem Auftauen (SEHNER, 2005).

Trotz intensiver Forschung auf Grund der aufgeführten Hygiene- und Standardisierungsmängel, sind **eidotterhaltige Verdünnermedien** noch immer der weltweite Standard in der bovinen Kryokonservierung. Dabei kann auf eine Vielzahl von Fertigverdünner zugegriffen werden. Beispielhaft zu nennen sind hier Trilutor[®] (BIOLAB, München, Deutschland), Laiciphos[®] (IMV, L'Aigle, Frankreich) oder Triladyl[®] (Minitube, Tiefenbach Deutschland). Für die Versuche dieser Arbeit wurde mit dem Verdünnerverfahren **Sexcess[®]** (Masterrind, Verden, Deutschland) gearbeitet. Dabei bezeichnet Sexcess[®] ein an die Sortierung und Tiefgefrierung von Spermien adaptiertes Verfahren. Es kombiniert die optimale Spermienverarbeitung und Verdünnergestaltung. Es wurden alle Prozessschritte über das Anfärben der Spermien, den Sortierprozess bis zu der Konservierung und Lagerung den Bedürfnissen sortierter Spermien angepasst (RATH et al., 2009). Der eigentliche Gefrierverdünner enthält zusätzlich verschiedene nicht näher definierte Antioxidantien, was zu signifikant ($P \leq 0,05$) besseren Auftauergebnissen geschlechtsspezifisch sortierten Spermien im Vergleich zu herkömmlichen Konservierungsmedien geführt hat (KLINC, 2005; MÖNCH-TEGEDER, 2012).

Alternative **eidotterfreie Konservierungsmedien** sind zum Beispiel Verdünner auf Soja-Lecithin-Basis. Auch hier gibt es bereits industrielle Fertigvarianten. Zu nennen wären Andromed[®] (Minitube, Tiefenbach, Deutschland), dessen Basis Phospholipide bilden oder optiXcell[®] (IMV, L'Aigle, Frankreich), ein Verdünner auf Liposom-Basis. Ältere Untersuchungen besagen, dass die eidotterhaltigen Verdünner signifikant bessere Werte in den untersuchten Parametern ermöglichen (THUN et al., 2002). Neuere Studien verglichen eidotterfreie mit eidotterhaltigen Verdünnern und kamen zu dem Schluss, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Vitalität und dem akrosomalen Status der Spermien gab (JIMENEZ et al., 2013). Es konnte sogar eine schnellere Motilität der in eidotterfreien Medien konservierten Spermien nach dem Auftauen beobachtet werden (AIRES et al., 2003).

2.4.5 Möglichkeiten der Konfektionierung von Besamungsportionen

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Möglichkeiten der Konfektionierung von Besamungsportionen boviner Spermien entwickelt. Das Ziel einer jeden Entwicklung von Verpackungssystemen ist es, die Viabilität der Spermien nach der Konservierung und dem Auftauen aufrecht zu erhalten und ein Keimwachstum zu unterbinden (VISHWANATH, 2003). Bis Anfang der 1980iger Jahre gab es mehrere angewandte Verfahren der Konfektionierung von Bullensamen. Diese waren die Konfektionierung in der Glasampulle, das Pellet oder in die Paillette (heute als Straw bezeichnet). Die Verpackungen besaßen unterschiedliche Volumen.

Die **Glasampulle** ist ein Gefäß, welches ursprünglich für die Aufbewahrung von Impfstoffen entwickelt wurde und noch heute dafür genutzt wird. Dabei war die Konservierung in der Ampulle das erste Verfahren, bei dem Samen in einem Gefäß konserviert wurde (SORENSEN, 1972). Die Glasampullen wurden entweder durch Feuer oder das Begasen mit N_2 sterilisiert. Das Ejakulat wurde direkt nach der Entnahme mit einem einfachen TRIS-Verdünner versetzt und zu je 1 ml in die Ampullen gefüllt. Der verwendete Verdünner enthielt Zucker, Penicillin, Streptomycin, Polymyxin B Sulfat und Glycerin. Anschließend wurde die Spitze hitzeversiegelt und die Ampulle auf $6\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt. Die Tiefgefrierung fand auf präpariertem Trockeneis bei $-79\text{ }^\circ\text{C}$ statt. Endgültig lagerte man die Ampullen bei $-196\text{ }^\circ\text{C}$ in LN_2 (EIBL, 1969; GRAHAM, 1978; PICKETT et al., 1978). Die Ampulle bot die Möglichkeit der Kennzeichnung. Allerdings erwies sich die Lagerung in LN_2 auf Grund der Form und Größe als nicht praktikabel. Die Ampulle besteht aus Glas und lässt als starre Materie keine schnellen Kühl- und Erwärmungsphasen zu. Diese negativen Aspekte stoppten die Etablierung der Glasampulle als Konfektionierung (MORTIMER et al., 1976). Dabei erzielten Besamungsportionen die in der Glasampulle kryokonserviert wurden, in den ersten direkten Vergleichen mit Straws, die höhere Non-Return-Rate (NRR). Dies wurde allerdings mit einer fehlenden Routine in der Handhabung und nicht durch eine schlechtere Spermienqualität begründet (PICKETT und BERNDTSON, 1974). Bei einer vergleichenden Studie verschiedener Verpackungssysteme konnten keine Unterschiede in der Spermienvitalität und Befruchtungsfähigkeit zwischen der 0,3 ml Paillette und der Glasampulle festgestellt werden. Die erzielten Trächtigkeitsraten waren beim 250 μl Straw in 14 von 21 Fällen der Ampulle überlegen. In fünf von acht Versuchen war die Fruchtbarkeit von Spermien in der Ampulle der der

Pellets überlegen (GRAHAM, 1978). Die Fertilisationsraten und die Motilität der konservierten Spermien nach dem Auftauen waren akzeptabel. Die hohen Herstellungskosten und eine schlechte Handhabung überwogen jedoch (PICKETT und BERNDTSON, 1974).

Das Aufbringen einer definierten Menge einer Spermiesuspension auf eine mit Vertiefungen präparierte Trockeneisplatte ist die **Pelletierung** (NAGASE und NIWA, 1964). Das Spermienpellet war Mitte der 1960iger Jahre eine in vielen Ländern erfolgreich eingesetzte Konfektionierung für die artifizielle Besamung beim Rind (SCHWERDTNER, 1967). Dabei wurden die Ejakulate von Bullen mit einer eigelhaltigen Zuckerlösung mit niedrigem Glycerinanteil verdünnt und unmittelbar daran in etwa 100 µl große Tropfen auf Kohlendisäureeis bei -79 °C zum Erstarren gebracht. Die Lagerung erfolgte in großen Mengen in LN₂-Containern. Die Zuckerlösung setzte sich zu 75,3 % aus einer 11 %igen Laktoselösung aus 20 % Eigelb, 4,7 % Glycerin und zwei unterschiedlichen Antibiotika zusammen (LEIPNITZ, 1965). Das Auftauen der Pellets erfolgte in einer Auftaulösung, welche 100 ml bidestilliertes Wasser, 1,2 g D-Glukose, 0,9 g Trinatriumzitatridihydrat, 0,4 g Kaliumkarbonat, 0,45 g Zitronensäure und 0,2 g Sulfanilamid enthielt (NAGASE und GRAHAM, 1964). Dazu wurden noch einmal 100 ml Milch gegeben. In verschiedenen Besamungsversuchen konnten Trächtigkeitsraten (NRR 90) bis zu 74,2 % erzielt werden (LEIPNITZ, 1965; WEITZE, 1966).

Das Einfrieren von Spermien in Kugel- bzw. Pelletform ist aus physikalischer Sicht das optimale Konservierungsverfahren. Die Kugel ist der physikalische Körper mit der geringsten Oberfläche, was eine gleichmäßige Spannungsverteilung vom Innern der Kugel hin zum äußeren Rand bedeutet (KRÖNER, 1958). Das Gefrieren erfolgt schnell und unter gleichmäßiger Verteilung von außen nach innen. Das Einfrieren als Pellet führt zu sehr guten Auftauergebnissen, da das Oberflächen-Volumen-Verhältnis für die Spermiesuspension optimal ist (BUCHMÜLLER und WEYERMANN, 1992; SCHÜTT, 2013). Verschiedene Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Pelletierung von Spermien unterschiedlicher Spezies. Die einfache Produktion und die guten Gefriereigenschaften der Pellets sind primäre Gründe dafür (KHALIFA und EL-SAIDY, 2006; VARADI et al., 2013; KUTLUYER et al., 2016). Das Pellet als Einfrierform hat zwei Nachteile. Es ist nicht identifizierbar bzw. nicht zu kennzeichnen. Es gab verschiedene Ansätze mit kleinen, aufgelegten Papiermarkierungen oder Gelkapseln, die allerdings nicht den gewünschten Erfolg brachten. Ein weiterer Nachteil ist die Beobachtung, dass zwischen den im Stickstoffcontainer gelagerten Pellets ein Spermienaustausch stattfand (MERKT et al., 1967).

Die Entwicklung einer separierten Individuallagerung von Spermienpellets, die eine exakte Kennzeichnung ermöglicht, könnte das Spermienpellet als moderne Form einer Besamungsportion wieder interessant machen.

Der **Straw** ist der weltweite Standard für die Lagerung von kryokonservierten Spermien für die artifizielle Insemination von Rindern. Die Idee der Kryokonservierung in Straw-Form (SORENSEN, 1940) wurde von französischen Wissenschaftlern wieder aufgegriffen. Sie entwickelten einen Straw mit einer Länge von 113 mm bei einem Durchmesser von 24 mm. Das Volumen betrug anfangs 500 µl, wurde aber in der weiteren Entwicklung auf Grund der Platzersparnis auf 250 µl reduziert (CASSOU, 1964; JONDET, 1964; FOOTE, 2002). Das Material besteht aus Polyvinylchlorid und wird an einem Ende per Ultraschall ohne Temperaturentwicklung und an dem anderen Ende mit einem Baumwollpfropfen, welcher Polyvinylpyrrolidon enthält und sich bei Kontakt mit einer Flüssigkeit verfestigt, verschlossen (JONDET, 1964; MACPHERSON und PENNER, 1972). Den Straw gibt es in verschiedenen Volumina. Die aktuelle Inseminationstechnik ist an den Straw angepasst. So wird der Baumwollpfropfen durch die Besamungspistole als Auswurfhilfe für den Samen genutzt (MAUTE, 2003). Parallel dazu wurde in Deutschland ein ähnliches Strohalmprinzip entwickelt, bei dem beide Enden mit Kunststoff- bzw. Metallkugeln verschlossen werden. Das bis heute verwendete **Minitüb-Röhrchen** (Minitube, Tiefenbach, Deutschland) hat eine Länge von 65 mm bei einem Volumen von 250 µl (SIMMET, 1972).

Das erste Verpackungssystem, das an die reduzierten Volumina und Spermienzahlen in der modernen Rinderzucht angepasst wurde, ist der **Nanostraw**. Der Nanostraw ist ein volumenangepasstes Verpackungssystem, das auf hochverdünnte Besamungsportionen spezialisiert ist (STROTHMEYER, 2013). Dabei handelt es sich um ein dünnes Kunststoffröhrchen, das sowohl Tiefgefrierbehältnis als auch Teil des Übertragungskatheters ist. Parallel dazu wurde ein Besamungsgerät entwickelt, das die Übertragung kleinster Volumina in den Eileiter ermöglicht (GROBFELD et al., 2011b). Der Nanostraw besteht aus einem 0,5 ml Straw (Minitube, Tiefenbach, Deutschland) ohne Polyvinylalkoholstopfen, die als Temperaturpuffer und als Oberfläche zur Kennzeichnung der Besamungsportion dienen und aus einem innenliegenden Katheter. Dieser Katheter beinhaltet die Spermiesuspension, ist in den umhüllenden 0,5 ml Straw eingeführt und wird mit diesem per Ultraschall verschweißt. Der Nanostraw ist 11 cm lang, wobei der Innendurchmesser des Katheters 0,485 mm beträgt. Der Nanostraw enthält $0,5 \times 10^6$ Spermien, was

einer Spermienkonzentration von 25×10^6 Spermien/ml entspricht. Es wurde ein an die geringen Mengen adaptiertes Einfrierprotokoll entwickelt bei dem es keinen Haltepunkt bei $-8 \text{ }^\circ\text{C}$ gibt. Als Gefriermedium wurde Sexcess[®] (Masterrind, Verden, Deutschland) mit einem Glycerinanteil von 6,7 % genutzt. Auf Grund des niedrigen Volumens von $20 \text{ }\mu\text{l}$ und der Konfektionierung im beschriebenen Katheter, reagiert die darin enthaltene Spermien suspension extrem sensitiv auf Temperaturschwankungen. Bei der Entwicklung wurde darauf durch eine sehr lange Äquilibrierungszeit bei der Verdünnung und einer Adaption des genutzten Einfrierautomaten (Abänderung der Einstromrichtung des LN_2 durch Einsatz einer perforierten Metallplatte) reagiert, ebenso wie bei der Modifizierung der Herstellung (Verzicht auf Hand-Produktkontakt, angepasste Kühlkurve im Einfrierautomat). Aktuell bietet die Produktion des Nanostraws nicht die Möglichkeit diese in irgendeiner Form zu automatisieren (STROTHMEYER, 2013).

In einer Studie entsprachen die im Thermoresistenztest ermittelten Werte des Nanostraws für die Parameter Motilität, Membranintegrität und morphologischer Integrität den von RATH et al. (2009) festgelegten Mindestanforderungen. In Besamungsversuchen mit der SIFT[®]-Technik bei Verwendung zweier gepoolter Nanostraws (entspricht 1×10^6 Spermien) pro Besamung konnten folgende Trächtigkeitsraten erzielt werden: Von fünf spontan brünstigen Färsen wurden 40 % und von sechs Kühen 33 % tragend (STROTHMEYER, 2013).

Ein Literaturvergleich in Anlehnung an SCHÜTT (2013) von den erzielten Ergebnissen der hier vorgestellten Verpackungsarten lässt folgende Schlüsse zu:

- Beim Einsatz des 250 µl Straws konnten in 14 von 21 Studien im Vergleich zur Glasampulle bessere Konzeptionsraten erzielt werden (POLGE und ROWSON, 1952).
- Für vergleichbare Befruchtungsergebnisse muss die Spermienanzahl im Pellet etwa gleich sein mit der in den Straws (NAGASE et al., 1964).
- Die Überlebensfähigkeit der Spermien im Straw ist genauso hoch wie bzw. höher als in der Glasampulle (PICKETT und BERNDTSON, 1974).
- Straws sind leichter zu kennzeichnen als Pellets und haben das geringere Kontaminationsrisiko (BUSCH et al., 1991).
- Beim Einsatz von Straws ist keine Nachverdünnung wie beim Pellet erforderlich (SCHÜTT, 2013).
- Eine vergrößerte Oberfläche und der geringere Durchmesser der Straws erlauben optimierte Einfriergeschwindigkeiten (STROTHMEYER, 2013).
- Die Pelletierung ist simpel, schnell und kosteneffizient (SCHÜTT, 2013).
- Bei der Konfektionierung und Lagerung der Straws kann mit nur einem Kühlmedium (LN₂) gearbeitet werden. Pellets und Ampullen werden auf Trockeneis zum Erstarren gebracht und erst anschließend in LN₂ überführt.

2.5 Kryokonservierung in geringen Konzentrationen

Der aktuelle Standard im Besamungseinsatz beim Rind ist die Konfektionierung in Straws. Diese fassen ein Volumen von 250 µl und enthalten 15-20x10⁶ Spermien (CRAMER et al., 2009). Die enorme Spermiengesamtzahl pro Besamungsportion soll Schädigungen durch den Kryokonservierungsprozess kompensieren. Der Verlust an befruchtungsfähigen Spermien nach dem Auftauen liegt bei bis zu 50 % (CURRY, 2000). Die angepasste Spermienzahl soll eine akzeptable Trächtigkeitsrate ermöglichen (WATSON, 1995; VISHWANATH und SHANNON, 2000). Weiterhin gibt es einen Zusammenhang zwischen der Spermienanzahl und der Samenqualität in Relation zur Fertilität bzw. der Konzeptionsrate (SALISBURY et al., 1961). Um den begleitenden Problemen durch die flächendeckende Nutzung genomisch geprüfter Jungbullen und der damit einhergehenden Spermienlimitierung entgegenwirken zu können, bedarf es verschiedener

Lösungsansätze. Mögliche Lösungen wären entweder eine drastische Erhöhung der nutzbaren Bullen oder aber eine Reduzierung der Spermienanzahl bei entsprechender Anpassung des Volumens der Besamungsportion (STROTHMEYER, 2013). Aktuell fehlt jedoch ein entsprechend hochdosiertes Konservierungs- und Konfektionsverfahren, welches tierzuchtrechtlich der Norm entspricht und praktikabel eingesetzt werden kann.

2.5.1 Einflussfaktoren Spermienanzahl und Volumen

Die bisherigen Forschungsanstrengungen beschäftigten sich ausschließlich mit dem Einfluss einer **hohen Verdünnung** auf die Spermien im 250 µl bzw. 500 µl Straw (STEVENSON et al., 2009) und nicht mit einer dem Volumen und der Spermienanzahl angepassten Konfektionierung. Die Versuche waren dabei so aufgebaut, dass zwar die Spermienanzahl in der Besamungsportion reduziert wurde, das Gesamt- bzw. Verdünnervolumen aber unangetastet blieb. Das konstante Volumen im Straw bei gleichzeitiger Reduzierung der darin enthaltenen Spermien kann problematisch sein. Eine Reduktion der Spermienanzahl bei Beibehaltung des Volumens von 250 µl löst den Verdünnungseffekt aus, was die Spermien strapazieren und schädigen kann. Das essentielle Mengen/Volumenverhältnis im konventionellen 250 µl Straw wird ab einer sortierten Spermienanzahl $\leq 3 \times 10^6$ negativ beeinflusst und spiegelt sich durch reduzierte Trächtigkeitsraten wider (BISWAS et al., 2016). Nicht sortierte Besamungsportionen im klassischen Straw sollten nicht weniger als 1×10^6 Spermien enthalten (SEIDEL und SCHENK, 2008). Verringert man die Spermienanzahl im Verhältnis zum Volumen, erhöht man dadurch die Gefahr des Verdünnungseffekts (VISHWANATH und SHANNON, 2000; GARNER et al., 2001). Demgegenüber haben andere Studien dargestellt, dass die schlechteren Trächtigkeitsraten auf einen **bullenindividuellen Effekt** zurückzuführen sind. In einem Versuch konnte festgestellt werden, dass einige Bullen, deren Spermien sortiert und nach dem Auftauen versamt worden sind, bei einer Spermienanzahl von $2,1 \times 10^6$ pro Straw schlechtere Trächtigkeitsraten erzielten. Wurde die Spermienanzahl desselben Bullen auf $3,5 \times 10^6$ Spermien/Straw erhöht, so konnte der negative dosisabhängige Effekt behoben und die Trächtigkeitsrate um 5 bis 10 % verbessert werden (DEJARNETTE et al., 2010). Allerdings gibt es diese Bulleneffekte auch bei der konventionellen Kryokonservierung mit $15\text{-}20 \times 10^6$ Spermien im Straw (KATHIRAVAN et al., 2011). Andere Autoren wiesen darauf hin, dass die Kryokonservierung mit reduzierter Spermienzahl bei beibehaltenem Volumen und Einfrierprotokoll einen bullenindividuellen Effekt offenbart

(BALLESTER et al., 2007). Weiterhin wurde festgestellt, dass in einem vergleichenden Besamungsversuch mit sortierten und „unsortierten“ Spermien mit niedriger Spermienanzahl nicht die niedrige Spermienanzahl, sondern der **Sortierprozess** einen negativen Effekt auf die Trächtigkeitsrate hat (DEJARNETTE et al., 2011).

Verschiedene Spermienkonzentrationen von 11 bis 22×10^6 Spermien pro 500 μl Straw (11, 15, 17 und 22×10^6) wurden bei einem Versuch von SCHENK et al. (1987) auf ihre Kryokonservierbarkeit und Trächtigkeitsraten anhand der NRR am Tag 75 untersucht. Die geringste Spermiedosis ergab eine NRR ($P \leq 0,05$) von 64 %, wohingegen die drei anderen Dosen eine NRR ($P \leq 0,05$) von 68 % erreichten. GÉRARD und HUMBLLOT (1991) untersuchten den Unterschied zwischen **verschiedenen Besamungsdosen** (8, 12 oder 16×10^6 Spermien) und stellten dabei einen negativen Effekt auf die NRR der niedrigen Dosierungen fest. Die Unterschiede waren zwar marginal, jedoch signifikant ($P \leq 0,05$) (65,7 %, 66,8 %, 69,2 %). Im Jahr 1997 wurde gezeigt, dass ein Herabsenken der Spermienzahl pro Besamungsdosis auf 10×10^6 ohne Beeinträchtigung der Trächtigkeitsrate möglich ist. Die NRR lag bei 70,5 % (10×10^6) sowie bei 69,8 % (20×10^6) (FOOTE und KAPROTH, 1997). Dieses Ergebnis wurde 2004 bestätigt. ANDERSSON et al. (2004) stellten weiter fest, dass eine Reduzierung auf 2×10^6 Spermien im konventionellen Straw zu signifikant schlechteren Trächtigkeitsraten führt. DEN DAAS et al. (1998) untersuchten anhand von 20 verschiedenen Bullen den Dosiseinfluss von 2,1 bis $17,3 \times 10^6$ Spermien pro Besamung. Es wurden 2.430 bis 5.330 Inseminationen pro Bulle durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass die Bullen bei Dosen zwischen 1×10^6 und 11×10^6 Spermien bereits 95 % der maximalen Trächtigkeitsrate erreichten. Verlegt man den Ort der Deponierung des Frischsamens auf tief intrauterin, so kommt es erst bei einer Reduktion auf unter 100.000 Spermien - bei mittiger Ablage im Uterushorn - zu einer signifikant ($P \leq 0,05$) verringerten Trächtigkeitsrate (SEIDEL et al., 1997). Im Jahr 2011 wurde eine nicht-chirurgische Methode der Spermienübertragung in den Eileiter entwickelt. Die Methode nennt sich „Sperm-intra-fallopian-transfer“ (SIFT®). Die Spermien werden dabei mit Hilfe eines flexiblen Katheters in den Eileiter ipsilateral direkt zum dominanten Follikel deponiert. In einem Feldversuch wurden verschiedene Konzentrationen von 0,85 bis $1,1 \times 10^6$ Spermien mit SIFT® direkt in den Eileiter von 93 spontan ovulierenden Kühen übertragen. Es wurden dafür Spermien zweier leistungsgeprüfter Bullen verwendet. Bei den niedrigdosierten Spermien erzielte Bulle A eine Trächtigkeitsrate von 30 %, Bulle B erreichte eine von 15,2 %. In

der Kontrolle (250 µl Straw mit 15×10^6 Spermien) wurden 22,9 % der Tiere durch den Bullen A und 35,4 % der Tiere durch den Bullen B tragend. Es wurde ein bullenindividueller Effekt der niedrigdosierten Besamungsportion festgestellt (GROßFELD et al., 2011b). Von einem solchen Effekt berichtete ebenfalls DEJARNETTE et al. (2011).

Der praxisreife Einsatz der geschlechtsspezifischen Sortierung führte zu einer enormen Steigerung in der Erforschung des Verdünnungseinflusses auf die Spermien. Seit mehreren Jahrzehnten befassen sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der idealen Spermienanzahl in der geschlechtsspezifisch differenzierten Besamungsdosis (ANDERSSON et al., 2006; CHRISTENSEN et al., 2011). Auf Grund der zeitintensiven Produktion von geschlechtsspezifisch getrennten Besamungsportionen enthalten diese aktuell etwa $1,5 \times 10^6$ bis $3,5 \times 10^6$ Spermien.

Es wurden verschiedene Untersuchungen veröffentlicht, die sich mit einer Reduktion der Spermiengesamtzahl in der Besamungsportion bei Bullen auseinandersetzten. Tabelle 5 fasst die dabei ermittelten Ergebnisse exemplarisch und vergleichend zusammen.

Tabelle 5: Spermienreduzierung von geschlechtsspezifisch differenzierten oder unsortiert konservierten 250 µl Besamungsportionen beim Bullen

Unsortiert Konzentration	Sortiert Konzentration	Ergebnis	Quelle
2x10 ⁶ 15x10 ⁶		<ul style="list-style-type: none"> Besamungsportion mit 15x10⁶ (n=312) erzielt signifikant höhere Kalberate verglichen mit 2x10⁶ (n=284) Spermien Bullenindividueller Effekt bei 2x10⁶. Für viele Bullen ist diese Spermienzahl zu niedrig 	(ANDERSSON et al., 2004)
2x10 ⁶	2x10 ⁶	<p>Versuch unterscheidet zw. Färse und Kuh und gibt Kalberate an.</p> <ul style="list-style-type: none"> Kalberate Färse: sortiert (n=132) 29,6 %; unsortiert (n=91) 57,8 % Kalberate Kuh: sortiert (n=132) 22,1 %; unsortiert (n=91) 23,4 % 	(BODMER et al., 2005)
20x10 ⁶	1x10 ⁶ 1,5x10 ⁶ 6x10 ⁶	<ul style="list-style-type: none"> Gesortete Besamungsportionen mit 1,5x10⁶ und 6x10⁶ Spermien führen zu vergleichbaren Trächtigkeitsraten eine Reduzierung auf 1x10⁶ reduzierte die Trächtigkeitsraten 2x10⁶ gesortete Spermien in der Besamungsportion mit vergleichbaren Trächtigkeitsraten zu 20x10⁶ konventionellen Spermien 	(SEIDEL und SCHENK, 2008)
	2,1x10 ⁶ 3,5x10 ⁶ 5x10 ⁶	<ul style="list-style-type: none"> Spermienanzahl der Bullen mit 2,1x10⁶ (46,7 %), 3,5x10⁶ (52,1 %) und 5x10⁶ (52,5 %) ohne signifikanten Effekt auf Trächtigkeitsrate bei Färsen Spermienanzahl bei Kühen 2,1x10⁶ (27,0 %), 3,5x10⁶ (29,1 %) und 5x10⁶ (30,3 %) Höhere Spermienkonzentrationen einiger Bullen in der Besamungsportion erhöhen Trächtigkeitsraten bei Färsen 	(DEJARNETTE et al., 2010)
2x10 ⁶ 10x10 ⁶	2x10 ⁶ 10x10 ⁶	<ul style="list-style-type: none"> Trächtigkeitsraten konventioneller Besamungsportionen mit 2x10⁶ (55 %) und 10x10⁶ (60 %) höher als gesortete Besamungsportionen gleicher Spermienanzahl 2x10⁶ (38 %) und 10x10⁶ (44 %) Reduzierung bei gesorteter Variante auf Grund des Sortierprozesses und nicht durch die verringerte Spermienanzahl 	(DEJARNETTE et al., 2011)
25x10 ⁶	4x10 ⁶	<ul style="list-style-type: none"> Trächtigkeitsraten bei Färsen an verschiedenen Standorten mit 25x10⁶ im 0,5 ml Straw, (60 %) signifikant (P=0,09) höher als 4,0x10⁶ im 0,25 ml Straw (52 %) 	(THOMAS et al., 2017)

CHRISTENSEN et al. (2011) erforschten die Aussagekraft verschiedener spermatologischer Untersuchungsparameter bei der Überprüfung unterschiedlicher Spermienkonzentrationen (15, 10, 7,5, 5, 3,5 und 2×10^6 Spermien/Straw) kryokonservierter Besamungsportionen von 195 Jungbullen. Dabei wurde festgestellt, dass eine hohe Verdünnungsrate die Überlebensfähigkeit der Spermien nicht herabsenkt. Bei dem Vergleich von 2 und 15×10^6 Spermien/Straw auf die Überlebensrate der Spermien und der NRR 56 wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt.

Die Trächtigkeitsraten mit Frischsamen sind besser als die von kryokonservierten Besamungsportionen. Bei einer Besamungsdosis von $0,5 \times 10^6$ Spermien ist eine Trächtigkeitsrate von 61,1 % realisierbar. Möchte man eine vergleichbare Trächtigkeitsrate (59,7 %) mit einer kryokonservierten Besamungsportion erreichen, so muss diese mindestens 5×10^6 Spermien enthalten (SHANNON und VISHWANATH, 1995). Die niedrige Dosierung bei der Besamung mit Frischsamen bringt einen Vorteil. Ein durchschnittliches Bullenejakulat eines Altbullen hat 5 ml Volumen bei $1,5 \times 10^9$ Spermien. Daraus lassen sich 350 bis 500 kryokonservierte Besamungsportionen mit $15\text{-}20 \times 10^6$ Spermien herstellen. Besamungsportionen mit Frischsamen enthalten 1×10^6 Spermien pro Portionen. Somit lassen sich aus demselben Ejakulat 7500 Portionen herstellen (VISHWANATH et al., 1996). Die errechnete Verdünnung ermöglicht eine Standardisierung der Spermienanzahl pro Besamungsportion (HAUGAN et al., 2007).

Bisherige Untersuchungen wurden zum Großteil mit töchtergeprüften Altbullen durchgeführt. Somit kann die Konfektionierung und das Verdünnungsverhältnis, das Kryokonservierungsregime und das Auftauprozedere der Ejakulatbehandlung von Altbullen nicht eins zu eins auf die Ejakulate von Jungbullen übertragen werden. Es wurde bereits beobachtet, dass es zwischen den Bullen und teilweise auch zwischen einzelnen Ejakulaten eines Tieres unterschiedliche Toleranzen bei suboptimalen Auftauverfahren gibt. Die individuellen Einflüsse spiegeln sich in einer reduzierten Akrosomintegrität nach dem Auftauen bzw. in einer reduzierten Trächtigkeitsrate wider (DEJARNETTE et al., 2000; DEJARNETTE und MARSHALL, 2005).

2.5.2 Belastung der Spermien bei der Besamung

Ein Bullenejakulat enthält ca. $5-12 \times 10^9$ Spermien die beim natürlichen Paarungsakt in das kraniale Scheidengewölbe abgesetzt werden. Auf dem Weg zum Ort der Befruchtung in die Eileiterampulle wird die hohe Spermienzahl kontinuierlich reduziert. Im Uterus beträgt sie noch 10^6 Spermien/ml, im kaudalen Isthmus 10^4 Spermien/ml und in der Eileiterampulle 10^2 Spermien/ml. Bis zum Erreichen des Eileiters sind die Spermien verschiedensten Belastungen ausgesetzt, weshalb eine ausreichende Spermiovitalität und Funktionalität eine bedeutende Rolle spielen. Nur bei entsprechend hoher Spermienviabilität ist eine Fusion mit der Eizelle möglich (HAWK, 1983). Die Belastungen bestehen dabei aus **anatomischen** bzw. **mechanischen Barrieren**, wie der Zervix oder **immunologischen** und **chemischen**, wie dem Vaginalsekret und Zervikalmukus. Für Bullen als Scheidenbesamer ist die Zervix das erste Spermienreservoir. Die Zervix kann beschädigte Spermien herausselektieren und Bakterien und Seminalplasma durch eine vermehrte Schleimproduktion ausschwemmen (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001). Bei der aktuellen Besamungstechnik werden die Spermien durch die Zervix hindurch in den Uterus deponiert – das erste Spermienreservoir wird dadurch übersprungen (VISHWANATH, 2003; RATH und JOHNSON, 2008). Untersuchungen beim Schwein zeigen, dass Spermien mit den uterinen Epithelzellen interagieren (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1990). Geschlechtsspezifisch differenzierte Spermien haben zudem eine verkürzte Lebensdauer im weiblichen Genitaltrakt sowie eine verringerte Vitalität (MAXWELL et al., 2004).

Während der Besamung durchlaufen die Spermien im weiblichen Genitaltrakt komplexe membranstrukturelle und metabolische Veränderungen, bevor sie mit der Eizelle verschmelzen. Man spricht hier von der Kapazitation, welche mit dem Erreichen des aktiven, befruchtungsfähigen Zustands abgeschlossen ist (AUSTIN, 1952). Das Einfrieren bei -196 °C und das Auftauen bei 38 °C kann eine Destabilisierung der Plasmamembran bewirken. Diese Veränderungen führen zu einem gehemmten Transport der Spermien nach der Besamung und einer verfrühten Kapazitation (WATSON, 1995; BAILEY et al., 2000). Durch die Kryokonservierung verfrüht kapazitierte Spermien sind nicht mehr befruchtungsfähig und werden durch den weiblichen Genitaltrakt ausselektiert (TÖPFER-PETERSEN und WABERSKI, 2001).

Weiterhin können autolytische Prozesse Veränderungen des Akrosoms auslösen. Die Akrosomreaktion ist ein physiologischer Prozess, der ausgelöst wird, wenn ein kapazitiertes akrosom-intaktes Spermium über Glykoproteine an der Zona pellucida der Eizelle bindet. Dabei kommt es zu einer Exozytose des Akrosoms, welche durch die Verschmelzung der äußeren akrosomalen Membran mit der darüber liegenden Plasmamembran gekennzeichnet ist. Es entstehen zunächst Poren und Kanäle, bevor das Akrosom endgültig verloren geht. Die Zona pellucida als Bindungspartnerin induziert eine rezeptorvermittelte Signaltransduktionskaskade, welche zu einem massiven Calcium-Ionen-Einstrom und letztendlich zur Exozytose des Akrosoms führt. Diese Signalkaskade ermöglicht es, dass das hyperaktivierte und kapazitierte Spermium in die Eizelle eindringen kann (BREITBART, 2003; TÖPFER-PETERSEN, 2007).

Es wird nach der falschen und echten Akrosomreaktion unterschieden (BEDFORD, 1970). Spermien, die durch das Einfrieren einer falschen Akrosomreaktion oder einer echten, jedoch verfrühten Akrosomreaktion unterliegen, können nicht mehr an der Zona pellucida binden und sind somit befruchtungsunfähig (FAZELI et al., 1997; SPINACI et al., 2010).

2.6 Gesetzliche Grundlagen für das Konfektionieren von Besamungsportionen

Die künstliche Besamung, wozu auch die Konfektionierung von Besamungsportionen als ein Verfahrensschritt zählt, ist europaweit gesetzlich geregelt. In Deutschland wird die nationale Reglementierung durch das **Tierzuchtgesetz (TierZG)** gewährleistet. Das TierZG wird seit 1936 stets an die veränderten Rahmenbedingungen angepasst und trat zum Ende des Jahres 2006 in einer novellierten Form in Kraft. Das Gesetz regelt unter anderem die Anerkennung und Arbeit der Zuchtorganisationen, das Besamungswesen, den Embryotransfer, den innergemeinschaftlichen Handel sowie die Durchführung des Gesetzes mit Ausnahmen und Bußgeldvorschriften. Darüber hinaus gelten für Bullensamen insbesondere die EU-Richtlinie 88/407/EWG und die **Samenverordnung (SamEnV)** vom 14.10.2008. Die SamEnV legt die Anforderungen an die Gewinnung, Abgabe und Verwendung von Samen, Eizellen und Embryonen von Zuchttieren fest. Neu entwickelte Verpackungssysteme für Besamungsportionen - wie der Nanostraw oder das Tube-Pellet - sind an diese gesetzlichen Vorgaben gebunden. In § 6 Absatz 1 Nr. 1 bis 3 SamEnV wird detailliert aufgeführt, wie eine Samenportion gesetzlich gekennzeichnet sein muss. Danach muss die Besamungsportion unmittelbar nach ihrer

Herstellung mit dem Gewinnungsdatum, der Rasse, der Zuchtbuchnummer des Spendertieres und der Kennzeichnungsnummer der herstellenden Besamungsstation versehen werden. Dabei hat die Kennzeichnung dauerhaft sowie gut und leicht lesbar zu erfolgen. Die Samengewinnung darf nur von Besamungsstationen durchgeführt werden, für deren Betrieb eine Erlaubnis nach dem TierZG erteilt wurde bzw. von Stationen, die nach den tierseuchenrechtlichen Vorschriften zum innergemeinschaftlichen Verbringen von Samen zugelassen sind bzw. von europäische Besamungsstationen oder Samendepots, die nach europäischem bzw. deutschem Recht als solche anerkannt worden sind (vgl. § 13 Absatz 1 Nr. 1 bis 3 TierZG). Diese Bedingungen sind mit Pellets kaum zu erfüllen, da eine permanente Kennzeichnung nahezu unmöglich ist.

3 Material und Methoden

Ziel dieser Arbeit war es, für Bullenspermien ein praxisgerechtes Konservierungsverfahren für hochdosierte Besamungsportionen in Minimalvolumina zu entwickeln.

3.1. Versuchstiere und Samengewinnung

Für die Gewinnung der Ejakulate standen insgesamt vier Bullen (A, B, C und D) zur Verfügung. Drei genomisch geprüfte HF-Bullen (A, B und C) wurden von der Master-rind GmbH, Verden zur Verfügung gestellt. Der vierte Bulle (D) war nicht genomisch geprüft und gehörte zum Bestand des Institutes für Nutztiergenetik in Mariensee. Die Bullen wurden während der gesamten Versuchsabläufe unter einheitlichen Bedingungen in planbefestigten Einzelboxen mit Stroheinstreu gehalten. Die Fütterung war leistungsgerecht und bestand aus einer Grassilage und einer rationierten Kraftfutterbeigabe, Stroh stand ad libitum zur Verfügung. Die Tiere zeigten während der gesamten Versuchsdauer ein normales Allgemeinbefinden und wiesen keine Sexualstörung oder Erkrankungen der Genitalien auf. Alle Tiere wurden mindestens einmal in der Woche gründlich gereinigt.

Im **Versuchsteil I** (VT I) wurde mit den genomisch geprüften Bullen A und B gearbeitet von denen insgesamt je zehn Ejakulate über einen Zeitraum von zwei Monaten gewonnen und je neun für den Versuch verwendet wurden. Im **Versuchsteil II** (VT II) wurde über die Dauer von zweieinhalb Monaten mit zwei genomisch geprüften (Bulle A und C) und einem ungeprüften Bullen (D) gearbeitet. Aus Tabelle 6 wird ersichtlich, dass Bulle A aus VT I den kompletten Versuchsablauf des VT II als Bulle A durchlief. Von diesem Tier wurden über die Dauer der beiden Versuche in Summe 21 Ejakulate gewonnen. Insgesamt wurden von den drei Tieren in VT II jeweils elf Ejakulate gewonnen und untersucht, je acht wurden für den weiteren Versuch verwendet. Die angegebenen Durchschnittswerte des Ejakulatvolumens und der Dichte in Tabelle 6 sind die erhobenen Mittelwerte des Versuchsteils I und II und wurden statistisch nicht miteinander verglichen.

Tabelle 6: Bullendaten Versuchsteil (VT) I und II

Parameter	Bulle A		Bulle B	Bulle C	Bulle D
Geburtsjahr	2012		2012	2014	2014
Versuchsteile	VT I	VT II	VT I	VT II	VT II
Alter in Monate (zu Versuchsbeginn)	13	32,5	15	18	13
Alter in Monate (bei Versuchsabschluss)	15	35	17	21,5	15,5
Ejakulatvolumen (ml)	2,66	2,69	2,89	2,8	5,75
Dichte/ml (x10⁶/ml)	1351	1343	1178	1002	1095
Genomischer Zuchtwert (zu Versuchsbeginn)	137		139	130	—
Genomischer Zuchtwert (bei Versuchsabschluss)	122		126	112	—

Die Ejakulatgewinnung für Versuchsteil I und II wurde aus hygienischen und sicherheitstechnischen Gründen im Sprungraum der Besamungsstation Mariensee durchgeführt. Die Bullen waren mindestens 12 Monate alt und wurden zwei Mal in der Woche zur Ejakulatgewinnung eingesetzt. Die Ejakulate wurden mit Hilfe einer künstlichen Vagina gewonnen. Die Vagina wurde für die jeweilige Sprungwoche vorbereitet, indem sie dampfautoklaviert (20 min bei 2 Bar und 121 °C), mit Wasser befüllt, luftdicht eingeschweißt und bis zu ihrer Benutzung in einem Wärmeschrank bei 42 °C gelagert wurde. Im Sprungraum wurden als Untermänner zwei unterschiedlich große Ochsen verwendet. Vor der Samengewinnung wurden zwei Blindsprünge durchgeführt. Das Auffangen der Nativejakulate geschah mit Hilfe eines zylindrischen 15 ml Schraubröhrchens, welches durch einen Gummitrichter an der künstlichen Vagina befestigt war. Das Schraubröhrchen wurde von einem Schutzmantel umgeben, um es vor der Umgebungstemperatur und vor UV-Licht zu schützen. Unverzüglich nach der Ejakulatgewinnung wurde das Schraubröhrchen von der künstlichen Vagina getrennt und in einem styroporummantelten und auf 27 °C temperierten Versandbehälter für biologisches Untersuchungsgut in das Labor transportiert.

3.2. Materialien für die Laboruntersuchungen

3.2.1 Chemikalien, Fluoreszenzfarbstoffe und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders ausgeführt, von der Carl Roth GmbH & CO (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342

BisBenzimide H33342, Trihydrochloride (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)

LIVE/DEAD[®] Sperm Viability Kit

SYBR[®]14 (1:100 Stammlösung in PBS) / PI (2,4 mM Lösung in Aqua-Dest)/Propidiumiodid (PI) (L-7011, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

FD&C Rot Nr. 40

25 mg Farbstoff in 1 ml ddH₂O (Warner-Jenkinson Company Inc., St. Louis, MO, USA)

Hancock-Medium

2,784 g Tri-Natriumzitat-Dihydrat, 4 ml 37 %iges Formaldehyd-Lösung in zweifachdestilliertem Wasser auf 100 ml

3.2.2 Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen, Verdünnermedien und Puffer

Für beide Versuchsteile wurde ausschließlich mit Sexcess[®] als Verdünnermedium gearbeitet. Die genaue Zusammensetzung ist nicht frei zugänglich. Exemplarisch werden hier einige der verwendeten Verdünnerbestandteile aufgelistet.

TRIS-Sample

199,98 mM Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan, 64,72 mM Zitronensäure-Monohydrat, 95,5 mM D-Fruktose und 50 mg/l Gentamicin-Sulfat in Aqua bidest.

TRIS-Trägerflüssigkeit

197,13 mM Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan, 55,34 mM Zitronensäure-Monohydrat, 47,46 mM D-Fruktose, 0,058 g Penicillin G und 0,05 g/l Streptomycin-Sulfat in Aqua bidest (pH 6,8).

TEST-TRIS-Eigelb-Puffer

188,73 mM N-Tris-Hydroxymethyl-Methyl-2-Aminomethan (TEST), 84,78 mM Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan, 11,1 mM Glukose, 0,05 g/l Gentamicin-Sulfat und 25 g/l Eigelb in Aqua bidest.. Nach Zentrifugation bei 850 g für 10 min, Überstand vorsichtig entfernen und wenn nötig mit Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan auf pH 7,4 einstellen.

TRIS-Eigelb Einfrierverdünner Komponente I

Mischung aus 672,0 ml Stammlösung (297,59 mM Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan, 96,32 mM Zitronensäure-Monohydrat, 82,59 mM D-Fruktose, 0,606 g/l Penicillin und 1,48 g/l Streptomycin-Sulfat verdünnt mit Aqua bidest.), 200,0 ml Eigelb und 128,0 ml Aqua bidest (pH 6,75).

TRIS-Eigelb Einfrierverdünner Komponente II

Gleiche Aufbereitung wie bei Komponente I, jedoch wurden 128,0 ml Aqua bidest. mit 128,0 ml 87 % Glyzerin ersetzt (pH 6,85).

3.2.3 Geräte für die angewendeten Messverfahren

Tabelle 7 zeigt die durchgeführten Messverfahren mit den entsprechend verwendeten Geräten, den Produzenten und dem Herstellungsort. Diese Auflistung führt alle für die Versuchsteile I und II benötigten Gerätschaften auf.

Tabelle 7: Angewandte Messverfahren und die dazugehörigen Geräte

Messverfahren	Geräte
pH-Wert	pH-Indikatorstäbchen (Merck, Darmstadt, Deutschland) pH-Wert Skalierung von 2,0 bis 9,0
Dichte Ejakulat	Photometer Spermacue (Minitube, Tiefenbach, Deutschland)
Motilität (subj.)	Phasenkontrastmikroskop (Olympus BX41, Tokio, Japan) 100x Vergrößerung
Motilität (obj.)	CASA IVOS I, Spermaanalsecomputer (Version 12.0 IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, USA)
Membranintegrität	Durchflusszytometer GALLIOS 10/3™ (Beckman Coulter Inc., Brea, USA)
Morphologie	Phasenkontrastmikroskop (Olympus BX 41, Tokio, Japan) 1000x Vergrößerung mit Ölimmersion
Geschlechtsspezifische Spermisortierung	modif. High-Speed-Flowzytometer MoFlo® SX (Beckmann Coulter, Miami, USA) Yttrium Vanadat Feststofflaser (Coherent Laser®, Dieburg, Deutschland)

3.2.4 Zubehör

Die Auflistung der Tabelle 8 gibt das für die Versuchsteile I und II benötigte Zubehör und den jeweiligen Hersteller dazu an.

Tabelle 8: Verwendetes Zubehör mit Angabe der jeweiligen Hersteller

Zubehör	Hersteller
künstliche Vagina	Modell Hannover, med. vet. Ludwig Bertram, Isernhagen, Deutschland
Wärmeschrank	CO ₂ Inkubator, SANYO Electric., Moriguchi, Japan
10 ml Kunststoffröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
zylindrisches 15 ml Schraubröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Besamungsfläschchen	Manker Eberzentrum, Mank, Deutschland
Versandbehälter für biologisches Untersuchungsgut	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
200 µl Kunststoffgefäß (Tube-Pellet)	Matrix 2D Barcoded Screw Top Tubes, 200, steril, Thermo Scientific, NY, USA
QR-Code	Denso Wave, Kariya, Japan
1,5 ml Reaktionsgefäß	Greiner-Bio-One, Frickehausen, Deutschland
52 µm Zellenmikrosieb	Falcon Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
12x75 mm Facs-Röhrchen	Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA, USA
28 G Kanüle	Becton Dickinson, Frage, Spanien
Spritze	Henke-Sass-Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Goblet	Minitube, Tiefenbach, Deutschland
modifiziertes Goblet	IMV, L'Aigle, Frankreich
250 µl Straw	Minitüb, Tiefenbach, Deutschland
500 µl Straw	Minitüb, Tiefenbach, Deutschland
0,7 mm Lichtwellenlängen Mikroküvette	Minitüb, Tiefenbach, Deutschland
Maklerkammer	SEFI Medical Instruments, Haifa, Israel
Kryokonservierung von Besamungsportionen	Einfrierautomaten Ice Cube 14 S (Minitube, Tiefenbach, Deutschland)
Verschweißen von Besamungsportionen	Ultraseal 21TM (Minitube, Tiefenbach, Deutschland)

3.3. Aufbau der Versuchsteile I und II

Der Versuch gliederte sich in zwei Teile.

Versuchsteil I befasste sich mit der Überprüfung verschiedener Einfrierverfahren mit kleinen Volumina für unsortierte Spermien.

Versuchsteil II diente der Überprüfung des Einfrierpotentials von gesorteten Spermien mit kleinen Volumina.

Die Tabellen 9 und 10 zeigen die jeweiligen Behandlungsgruppen mit den entsprechenden Volumina, der Spermienanzahl pro Besamungsportion und dem verwendeten Konservierungsverfahren der beiden Versuchsteile. Die niedrig dosierten Besamungsportionen wurden so verdünnt, dass in 30 µl Samensuspension 1×10^6 Spermien enthalten waren.

Tabelle 9: Behandlungsgruppen Versuchsteil I

Behandlung	Volumen (µl)	Spermienanzahl	Konservierungsverfahren
Kontrollstraw <i>Straw</i>	250	15×10^6	Standardverfahren als Kontrolle Einfrierprogramm 1 25,3 min im IceCube
Nanostraw <i>Nano</i>	20	$0,66 \times 10^6$	Kryokonservierung in Nanostraw Einfrierprogramm 2 90 min im IceCube
30 µl Tube-Pellet <i>30TP</i>	30	1×10^6	Kryokonservierung in Matrix 2D Barcoded ScrewTop Tubes 200 µl (1 Pellet/Tube) Einfrierprogramm 1 25,3 min im IceCube
50 µl Tube-Pellet <i>50TP</i>	50	$1,66 \times 10^6$	Kryokonservierung in Matrix 2D Barcoded ScrewTop Tubes 200 µl (1 Pellet/Tube) Einfrierprogramm 1 25,3 min im IceCube

Tabelle 10: Behandlungsgruppen Versuchsteil II

Behandlung	Volumen (µl)	Spermienanzahl	Konservierungsverfahren
Kontrollstraw <i>Straw</i>	250	15x10 ⁶	Standardverfahren als Kontrolle Einfrierprogramm 1 25,3 min im IceCube
Kontrollstraw <i>Sort</i>	160	3,3x10 ⁶	Kontrolle des Sortierprozesses Einfrierprogramm 3 10 min im IceCube
30 µl Tube-Pellet <i>30TPsort</i>	30	1x10 ⁶	Kryokonservierung in Matrix 2D Barcoded ScrewTop Tubes 200 µl (1 Pellet/Tube) in IceCube Einfrierprogramm 3 10 min im IceCube
60 µl Tube-Pellet <i>60TPsort</i>	60	2x10 ⁶	Kryokonservierung in Matrix 2D Barcoded ScrewTop Tubes 200 µl (1 Pellet/Tube) in IceCube Einfrierprogramm 3 10 min im IceCube

In den Tabellen des Ergebniskapitels wird mit den Kurzformen (**Straw**, **Nano**, **30TP**, **50TP**, **Sort**, **30TPsort** und **60TPsort**) der einzelnen Behandlungsgruppen der Tabellen 9 und 10 gearbeitet.

Abbildung 1 zeigt den Ablauf des Versuchsteils I. Die vier Behandlungsgruppen unterschieden sich in ihrem Volumen (Straw = 250 µl; Nanostraw = 20 µl; 30TP = 30 µl; 50TP = 50 µl), der Art der Konfektionierung und dem Einfrierverfahren. Der Straw wurde in einem konventionellen 250 µl Straw und der Nanostraw in einem 20 µl Katheter (STROTHMEYER, 2013) verpackt. Für die beiden Tube-Pellet-Varianten wurde eine neue Konfektionierung entwickelt. Dabei handelt es sich um zylindrisch geformte Kunststoffgefäße, welche ein Volumen von 200 µl fassen und sich per gummiummanteltem Schraubverschluss luftdicht verschließen lassen. Die verwendeten Einfrierprotokolle unterschieden sich zwischen dem konventionellem Straw und den drei Minimalvolumina. Für den konventionellen Straw und die beiden Pelletvarianten wurde ein 25,3-minütiges Einfrierprotokoll verwendet. Der Nanostraw wurde mit einer sehr langsamen Einfrierkurve von 90 min kryokonserviert.

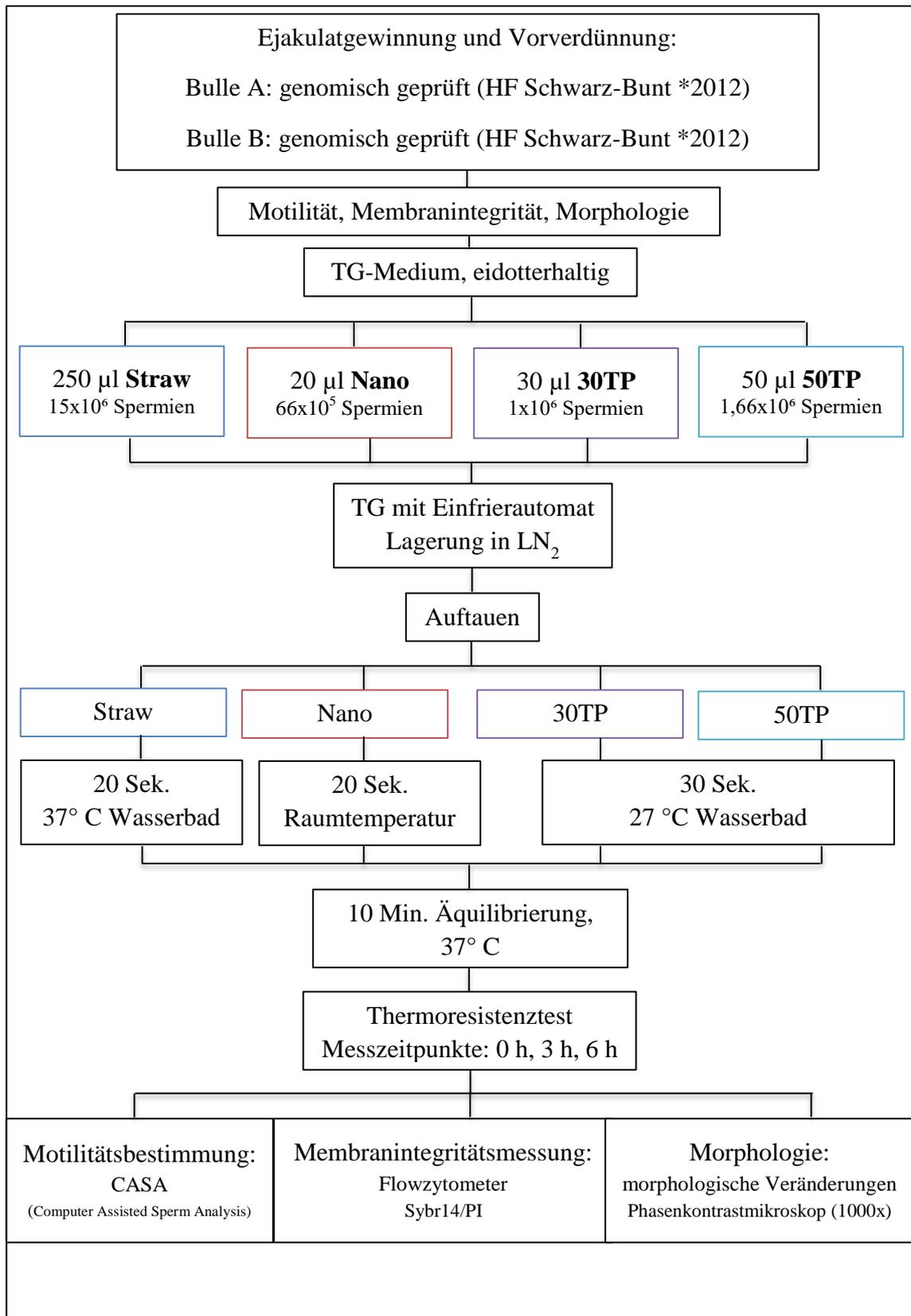


Abbildung 1: Schematischer Aufbau Versuchsteil I.

Im Versuchsteil II (siehe Abbildung 2) wurde mit dem konventionellen 250 μ l Straw als Kontrolle gearbeitet, um festzustellen, ob die Spermien der eingesetzten Bullen die herkömmliche Kryokonservierung überstehen. Die drei anderen Behandlungsgruppen wurden geschlechtsspezifisch differenziert. Hier diente der konventionelle Sort-Straw, welcher nach dem aktuell gängigen Verfahren für geschlechtsspezifisch differenzierte Spermien kryokonserviert wurde, als Kontrolle für die sortierten 30 μ l und 60 μ l Tube-Pellet-Varianten als Minimalvolumina. Die frisch sortierten Spermien wurden vor dem Einfrieren erneut auf ihre Motilität, Membranintegrität und morphologische Abnormitäten untersucht. Die dabei ermittelten Werte werden in Kapitel 4 als **post Sort** dargestellt.

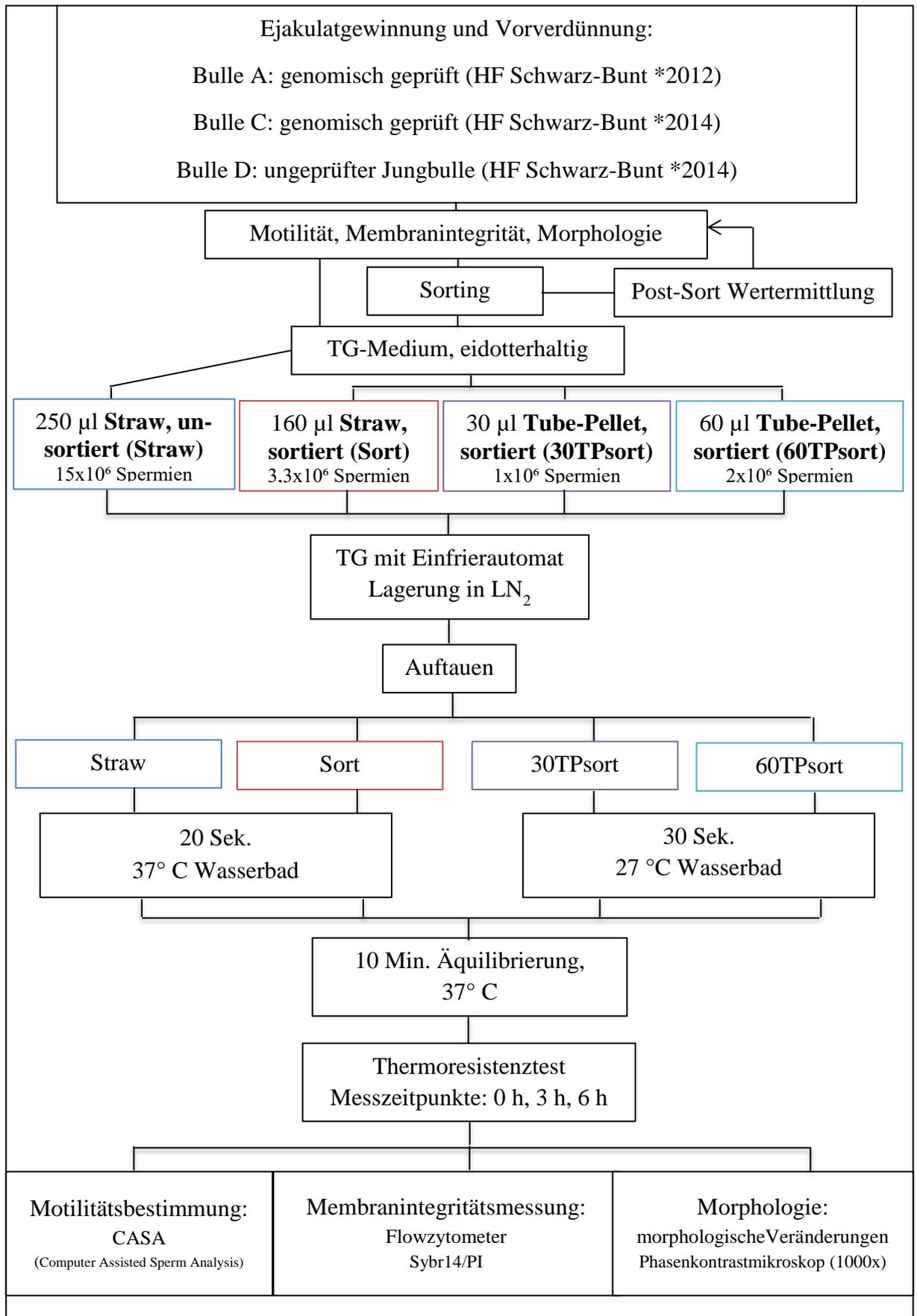


Abbildung 2: Schematischer Aufbau Versuchsteil II.

3.4. Wiederkehrende Arbeitsschritte

3.4.1 Eingangsuntersuchung

Die erste subjektive Bestimmung der Motilität und Massenbewegung fand am Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung statt. Dafür wurden drei Tropfen à 10 µl auf einen Objektträger gegeben, wovon die beiden äußeren mit einem Deckgläschen bedeckt wurden. An den äußeren Tropfen wurde die Motilität bestimmt. Generell wurden für den Versuch nur Ejakulate verwendet, welche eine Anfangsmotilität von $\geq 70\%$ aufwiesen. Der unbedeckte mittige Samentropfen diente der Ermittlung der Massenbewegung. Durch die hohe Spermiedichte und ausgeprägte Einzelmotilität bei Wiederkäuern entsteht die Massenbewegung (KRAUSE, 1966). Die Abstufung respektive Bewertung erfolgt in fünf Stufen (WEITZE, 2001) und wird in Tabelle 11 gezeigt.

Tabelle 11: Einschätzung der Massenbewegung nach WEITZE (2001)

Abstufung	Bewertung
5	Sehr gute Massenbewegung (starke Turbulenzen mit abreißenden Gegenströmen hoher Geschwindigkeit)
4	Gute bis sehr gute Massenbewegung (ausgeprägte Schwarmbewegung mit Gegenströmungen und zahlreichen Verdichtungen)
3	Gute Massenbewegung (lebhaftes Wellen- und Schwarmbewegung mit dunklen Verdichtungen)
2	Geringe Massenbewegung (träge, flache Wellen)
1	Wenig Massenbewegung (träge Bewegung ohne Wellen)
0	Keine erkennbare Massenbewegung

Der pH-Wert des Nativejakulats wurde per pH-Indikatorstäbchen bestimmt. Das tatsächliche Volumen der Ejakulate wurde anhand eines in ml skalierten zylindrischen 15 ml Kunststoffzylinders ermittelt.

Die Ejakulatdichte wurde mit einem auf Bullen kalibrierten Photometer per Doppelmessung bestimmt. Es wurden 30 µl des unverdünnten Ejakulats in eine 0,7 mm Lichtwellenlängen Mikroküvette pipettiert. Die Ergebnisse wurden als „Anzahl Spermien $\times 10^6/\text{ml}$ “ angegeben. Für die weiteren spermatologischen Untersuchungen wurde ein Aliquot von 1 ml auf eine Konzentration von 100×10^6 Spermien/ml mit

TRIS+Antioxidantien in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß verdünnt und bei 37°C auf einem Wärmeblock gelagert.

3.4.2 Weitergehende Spermauntersuchung

Für die Nativejakulate wurden Spermiogramme erstellt. Die entsprechenden Untersuchungsmethoden werden in diesem Kapitel erläutert und in den weiteren Abschnitten die tiefergreifenden Prozessschritte näher beschrieben.

3.4.2.1 Motilität

Für die CASA-Messung (Setup-Parametereinstellung siehe Tabelle 30) wurde ein 1 ml Aliquot des Ejakulats auf 100×10^6 Spermien/ml eingestellt. Davon wurden 5 µl mit 45 µl TRIS+AO in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 37°C inkubiert und dann 10 µl in eine Maklerkammer pipettiert. Das System analysiert pro Messung 60 Bilder von zehn Feldern (Parametereinstellung siehe Kapitel 9.3). Die Motilität wurde per Doppelmessung bestimmt.

3.4.2.2 Membranintegrität

Die Membranintegrität der nativen Spermaprobe wurde mittels eines Durchflusszytometers (Parametereinstellung siehe Kapitel 9.4) bestimmt. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe waren SYBR[®]14 (Komponente A) und Propidiumiodid (PI, Komponente B). Die Bestimmung der Membranintegrität erfolgte mit einem 488 nm Feststofflaser. Der Filterkanal FL-1 (530/30 nm) wurde zur Detektion der Grünfluoreszenz (SYBR[®]14) verwendet. Zur Bestimmung der Rotfluoreszenz (PI) wurde Filterkanal FL-6 (650LP nm) aktiviert. Bei jeder Messung wurden 20.000 Zellen erfasst. Die Nativprobenanalyse wurde an das Protokoll von GARNER et al. (1994) angelehnt. Insgesamt entsprach ein Probenvolumen im 12x75 mm FacS-Röhrchen 500 µl und bestand aus 480 µl TRIS-Sample (siehe Kapitel 3.1.2), 12 µl Samensuspension, 5 µl einer verdünnten SYBR[®]14 (1mM in DMSO) Stammlösung und 3 µl PI. Die SYBR[®]14- Stammlösung wurde im Verhältnis 1:100 mit Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte eine Doppelmessung am Durchflusszytometer.

SYBR[®]14 ist ein grün emittierender Fluoreszenzfarbstoff, der durch Plasmamembranen diffundiert und sich unabhängig vom funktionellen Zustand der Membran an der DNA anlagert. PI ist ein grobmolekularer, rotfluoreszierender Farbstoff und lediglich in der Lage, Spermien mit bereits beschädigter Plasmamembran zu penetrieren. Er lagert sich ebenfalls an die Spermien-DNA an und überdeckt den Farbstoff SYBR[®]14. So ist es möglich, geschädigte Spermien durch das emittierte rote Licht zu detektieren, wohingegen Spermien mit intakter Plasmamembran grünes Licht emittieren. Membrandefekte Spermien, bei denen der PI-Farbstoff SYBR[®]14 noch nicht komplett überdeckt, emittieren sowohl im grünen als auch im roten Bereich. Sie werden in der statistischen Auswertung zu den membrandefekten Spermien gezählt. Nicht-fluoreszierende Partikel wurden „ausgattet“ und waren nicht Bestandteil der statistischen Auswertung.

3.4.2.3 Morphologie

Morphologische Veränderungen am Spermium wurden mittels Phasenkontrastmikroskops beurteilt. Hierfür wurden 10 µl des Nativspermas mit 90 µl einer Fixierlösung nach Hancock (im FLI gem. Kapitel 3.1.2 angesetzt) immobilisiert und davon 8 µl auf einen Objektträger pipettiert. Pro morphologischer Untersuchung wurden 200 Spermien ausgezählt und prozentual anhand ihrer Veränderungen zugeordnet. Die morphologischen Veränderungen wurden in einem abgeänderten Protokoll (KRAUSE, 1966) dokumentiert, wobei zwischen Kopfveränderungen, Schwanzveränderungen und Missbildungen unterschieden wurde (siehe Tabelle in Kapitel 9.5). Die Nativproben durften nicht mehr als 30 % morphologische Veränderungen aufweisen, sonst wurde das Ejakulat verworfen.

3.4.3 Geschlechtsspezifische Spermisortierung

Die Sortierung der Bullenspermien in X- bzw. Y-chromosomalen Spermienpopulationen erfolgte nach dem Verfahren von KLINC und RATH (2007). Für den flowzytometrischen Sortierprozess wurde die benötigte Menge an nativem Ejakulat mit einem TRIS-Verdünner, welcher Antioxidantien und Bovines Serum Albumin Fraktion V enthielt (siehe Kapitel 3.1.2), auf eine Spermienendkonzentration von 100×10^6 /ml verdünnt und zu je 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gelagert. Dabei wurde mit verschiedenen Konzentrationen einer Lösung, die den (20 µl bzw. 25 µl) Fluoreszenzfarbstoff Hoechst

33342 enthielt, gearbeitet. Dadurch war es möglich, für den jeweiligen Versuchstag die optimale Farbstoff-Konzentration für das spezifische Ejakulat zu ermitteln, bei der die durchflusszytometrische Sortierung am effektivsten funktionierte. Nach Zugabe der benötigten Menge von Hoechst 33342 erfolgte eine einstündige Inkubation bei 34 °C im Dunkeln. Die Reaktionsgefäße wurden dafür lichtundurchlässig in Aluminiumfolie eingewickelt. Die so vorbereiteten Samenproben wurden direkt vor der Sortierung durch ein 52 µm Zellenmikrosieb filtriert und in einem Flow-Röhrchen aufgefangen, dem darauffolgend 1 µl FD&C Rot Nr. 40 zugegeben wurde. Dieser Lebensmittelfarbstoff dringt nur in membrandefekte Spermien ein und diskriminiert die Emission des Hoechst 33342 Farbstoffes. So ist es möglich, membrangeschädigte Spermien vor dem eigentlichen Sortierprozess zu selektieren.

Für die Sortierung wurde ein modifiziertes High-Speed-Flowzytometer MoFlo[®] SX genutzt. Dieses arbeitet mit einem Yttrium Vanadat Feststofflaser, welcher auf einer Wellenlänge von 351 nm bei einer Gesamtausgangsleistung von 2 W arbeitet. Für diesen Versuch wurde die Ausgangsleistung auf 180 mW reduziert. Der benötigte Hüllstrom basierte auf einem TRIS-Salzmedium (siehe Kapitel 3.1.2). In jedes Flow-Röhrchen, welches vorab mit 500 µl TEST-TRIS-Eigelb-Puffer als Auffangmedium präpariert worden war, wurden $7,3 \times 10^6$ Spermien des jeweils entsprechenden Geschlechts sortiert (JOHNSON und WELCH, 1999). Nach dem Sortieren erfolgte unverzüglich eine Zentrifugation des sortierten Samens für 20 min bei 2200 U/min und Raumtemperatur. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Das am Grund des Flow-Röhrchens zurückgebliebene Spermienpellet wurde mit der benötigten Menge an Kühlverdünner (Sexcess[®]I) resuspendiert. Als abschließender Schritt erfolgte eine zweistufige Abkühlung der Raumtemperatur über 12 °C (1 h Dauer) auf 5 °C (2,5 h Dauer) bis hin zur Kryokonservierung.

3.5 Kryokonservierung der Versuchsabschnitte I und II

Alle Behandlungsgruppen wurden in einem zweiphasigen Verdünnersystem mit demselben Verdünner konserviert. Dabei handelte es sich um die Kühl- und Tiefgefriermedien Sexcess[®] I und II, bei der die zweite Phase Glycerin als Kryoprotektivum enthält. Die benötigten Verdünnervolumina errechneten sich auf Grund der vorab bestimmten Spermiedichte im Nativejakulat. Die benötigte Menge der unverdünnten und auf 27 °C

temperierten Spermien wurden in ein 10 ml Kunststoffröhrchen gegeben. Die identisch temperierte und errechnete Verdünnerphase Sexcess[®] I wurde tröpfchenweise zugegeben. Um ein gleichmäßiges Herabkühlen sicherzustellen und rapide Temperaturschwankungen zu unterbinden, wurde das die Spermiesuspension enthaltende Kunststoffröhrchen in ein mit Aluminiumfolie ummanteltes Besamungsfläschchen für Eberspermien als Schutzgefäß überführt. Die erste einstündige Äquilibrationsphase fand bei 12 °C statt. Eine Überführung in eine 5 °C Kälte- und Arbeitskammer war der zweite Schritt der Temperaturanpassung. Nach einer Ruhe- und Kühlphase von $\geq 2,5$ h ist davon auszugehen, dass ein Volumen von ≤ 5 ml auf 5 °C durchgekühlt ist. Der Metabolismus der Spermien ist bei einer Temperatur von 5 °C auf ein Minimum herabgesenkt.

Die auf 5 °C gekühlte Verdünnerphase Sexcess[®] II wurde der Spermiesuspension tröpfchenweise und unter leichtem Schwenken in der Kühlkammer hinzugefügt. Nach Erreichen der Endverdünnung erfolgte unmittelbar die Befüllung der jeweiligen Konfektionierungsform. Für das Einfrieren der Behandlungsgruppen wurden verschiedene Einfrierkurven verwendet. Die Proben wurden mit dem Einfrierautomaten eingefroren. Die Konservierungsverfahren der unterschiedlichen Behandlungsgruppen werden in den Tabellen 9 und 10 (siehe Seite 46f.) angegeben.

Von den niedrig dosierten Behandlungsgruppen wurden jeweils 15 Portionen eingefroren. Die Proben mussten nach dem Auftauen gepoolt werden, um für die drei Messzeitpunkte des Thermoresistenztests ein ausreichendes Probenvolumen zur Verfügung zu haben.

3.5.1 Kryokonservierung in 250 µl Kontrollstraws: Verfahren, Konfektionierung und Kryokonservierung

Pro Wiederholung wurden 5 Kontrollstraws eingefroren. Die Verdünnung wurde so berechnet, dass in jedem Straw 15×10^6 Spermien enthalten waren, was der Spermienanzahl in den konventionell hergestellten Besamungsportionen entspricht.

Nach Erreichen der Endverdünnung erfolgte die Befüllung der 250 µl Straws via Handaufzug. Die nichtwattierte Öffnung des Straws wurde mit einem Ultraschallschweißgerät verschlossen. Für das Einfrieren der unsortierten Kontrollstraws wurde ein Marienseer Standardeinfrierprotokoll genutzt. Hierbei werden die Straws mit dem Einfrierau-

tomaten von +5 °C auf -7 °C in 4 min abgekühlt. Es schließt sich eine Halteperiode von 4 min an. Danach werden die Proben von -7 °C auf -120 °C in 11,3 min (10 °C/min) abgekühlt und in der Abschlussphase von -120 °C auf -130 °C in 6 min (1,67 °C/min) gekühlt. Die Gesamtzeit für den Einfrierprozess beträgt demnach 25,3 min. Nach Beendigung des Einfrierprogramms wurden die Kontrollstraws unverzüglich in LN₂ überführt. Unterhalb der LN₂-Oberfläche wurden die Straws in ein beschriftetes Goblet verpackt und im Stickstoffcontainer bis zur abschließenden Untersuchung nach dem Auftauen gelagert. Die 250 µl Kontrollstraw-Variante diente in den zwei Versuchsteilen als Referenz für die aktuelle Besamungstechnik und entsprach in Verpackung, Einfrierverfahren, Auftauverfahren und der Anzahl von Spermien pro Besamungsportion der aktuellen Technik. Weiterhin diente der Straw der Überprüfung, ob die in den Versuchen eingesetzten Bullen mit der aktuellen Einfriertechnik kryokonservierbar sind und um eine Korrelation zu den mit Minimalvolumina hergestellten Konfektionsformen abzuleiten.

3.5.2 Kryokonservierung von unsortierten Spermien in 20 µl Nanostraws: Verfahren, Konfektionierung und Kryokonservierung

Die Abbildung 3 demonstriert anhand einer roten Probenflüssigkeit die Volumenverhältnisse zwischen dem Nanostraw (Nr. 1) und dem konventionellem Straw (Nr. 3). Der Nanostraw besitzt einen innenliegenden Katheter, der mit 20 µl Flüssigkeit befüllt ist. Der mittlere konventionelle Straw (Nr. 2) ist ebenfalls mit 20 µl befüllt, um die Volumenverhältnisse zwischen dem Nanostraw und dem konventionellen Straw zu verdeutlichen (siehe schwarze Einkreisung).

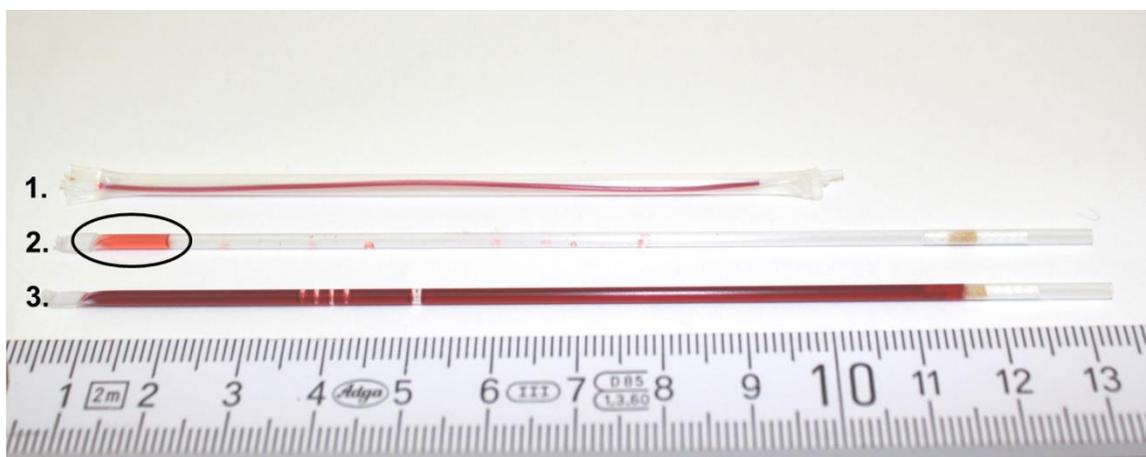


Abbildung 3: Volumenvergleich des Nano- und Kontrollstraws (SCHÜTT, 2013).

Einige Arbeitsschritte der Nanostraw-Produktion unterschieden sich von der Herstellung der konventionellen 250 µl Straws (siehe Kapitel 3.5.1). Nach der ersten einstündigen Verdünnungsphase mit Sexcess[®] I bei 12 °C wurde die Samensuspension im zweiten Abkühlprozess für vier h auf eine Temperatur von 5 °C äquilibriert. Nach der vierstündigen Äquilibrierung wurde der Suspension das errechnete Volumen an Sexcess[®] II Verdünner hinzugegeben. Das benötigte Verdünnervolumen errechnet sich anhand der Ejakulatdichte und der darin enthaltenen Spermiengesamtzahl und ist somit von Ejakulat zu Ejakulat individuell unterschiedlich.

Ein Nanostraw besteht aus einem modifizierten 0,5 ml Straw und einem 11 cm langen Innenkatheter (20 µl Volumen), in dem sich die Samensuspension befindet. Die Modifikation des 0,5 ml Straws besteht in der Entfernung des Industriestopfens und einer generellen Verkürzung auf 11 cm Gesamtlänge. Der modifizierte Straw dient als Temperaturpuffer und führt zu einer stabilisierten Einfrierkurve. Weiterhin stellt er die Möglichkeit der vorgeschriebenen Kennzeichnung dar (STROTHMEYER, 2013). Die verhältnismäßig lange Einfrierkurve ist auf die hohe Temperatursensitivität des Nanostraws zurückzuführen. Trotz des temperatur-puffernden 500 µl Straws reagiert der innenliegende Katheter bereits auf kleine Temperaturschwankungen hochsensitiv. Die Einfrierkurve verläuft daher die ersten 35 min bei 5 °C. Anschließend erfolgt eine verhältnismäßig langsame Kryokonservierung über 55 min auf eine Temperatur von -130 °C. Nach Abschluss des Einfrierprotokolls wurde der Nanostraw unverzüglich in LN₂ überführt. Unter der Stickstoffoberfläche findet die Verpackung in ein modifiziertes Goblet statt. Die Modifizierung des Goblets verhindert ein Herausschwimmen des Nanostraws. Der temperatur-puffernde 500 µl Straw ist luftgefüllt und hat demnach das tendenzielle Bestreben in einer Flüssigkeit an die Oberfläche zu schwimmen. Eine vorhandene Perforation im Goblet wurde so geweitet, dass ein Einführen des Nanostraws möglich war, ein Herausschwimmen jedoch unterbunden wird (SCHÜTT, 2013). Nach der Überführung der Nanostraws in das Goblet findet die endgültige Lagerung des modifizierten Goblets in einem Stickstoffcontainer statt.

3.5.3 Kryokonservierung von unsortierten Spermien in 30 µl und 50 µl Tube-Pellets: Verfahren, Konfektionierung und Kryokonservierung

Um für Pellets das Problem der fehlenden Markier- und Identifizierbarkeit zu lösen, wurde untersucht, inwieweit Kunststoffröhrchen mit aufgedrucktem Quick-Response (QRTM)-Code für die Kryokonservierung geeignet sind. Die 200 µl fassenden Röhrchen sind auf der Unterseite mit dem QRTM-Code individuell markiert, sodass jedes einzeln lagernde Pellet entsprechend zugeordnet werden kann. Die QRTM-Codes lassen sich individuell erstellen und drucken. Ein Code ist dabei in der Lage, bis zu 4296 alphanumerische Zeichen darzustellen. Dabei ist die Nutzung lizenz- und kostenfrei. Die Codes können aufgedruckt oder mit einem Laser eingebrannt werden. Das macht sie widerstandsfähig und haltbar. Das Ablesen erfolgt per laserunterstütztem Scanner oder Mobiltelefon. Ein Einbringen aller benötigten und durch das TierZG und die SamEnV vorgeschriebenen Informationen ist dadurch möglich. Die Abbildung 4 zeigt die genutzten Tubes. Zu erkennen sind das Tube mit innenliegendem Gewinde, eine konstruierte Öffnungshilfe, um einen Handkontakt zu unterbinden, der QRTM-Code sowie der verschraubbare Deckel.



Abbildung 4: Aufbau des Tubes (Matrix 2D Barcoded Screw Top Tubes, 200 µl, steril, Thermo Scientific, NY, USA) mit einem QRTM-Code.

Das Tube hat eine Gesamthöhe von 20 mm, ohne Schraubverschluss eine von 15 mm. Die Wandstärke beträgt 1 mm und der Innendurchmesser 7 mm. Es schließt zylindrisch ab. Die Kunststoffbehältnisse sind mit einem Schraubverschluss versehen und lassen

sich auf Grund einer temperaturbeständigen Gummidichtung am Schraubverschluss luftdicht verschließen. Diese Art der Verpackung bietet die Voraussetzungen, um die Konfektionierung und die Kryokonservierung komplett zu automatisieren. Die Tubes lassen sich, ähnlich wie es bei 96-Lochplatten möglich ist, auf einem Rack fixieren.

Der prinzipielle Vorgang der Verdünnung und des Einfrierens waren stark an die konventionelle Einfriertechnik im Straw angelehnt. So wurde ebenfalls mit dem zweiphasigen Verdünnungsprotokoll Sexcess[®] I und II gearbeitet. Nachdem am gewonnenen Ejakulat die Dichte bestimmt wurde, konnten die benötigten Mengen von Sexcess[®] I und II berechnet werden. Das benötigte Volumen an Ejakulat wurde in ein 10 ml Kunststoffröhrchen pipettiert. Die errechnete Menge an Sexcess[®] I wurde vorsichtig tröpfchenweise in dasselbe Kunststoffröhrchen gegeben. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung mit Hilfe einer Pipette, um eine Durchmischung von Spermien und Verdünnung zu erreichen. Das Röhrchen wird in einen Wassermantel überführt und zweiphasig von Raumtemperatur über 12 °C (1 h) auf 5 °C (2 h) herabgekühlt. Die zweistündige Äquilibration bei 5 °C erfolgte in einer geschlossenen Arbeitsbox, in welcher auch das Abfüllen stattfindet. Nach dem Erreichen der Kerntemperatur von 5 °C erfolgte die Zugabe der benötigten Menge von vorgekühltem Sexcess[®] II und anschließend die unverzügliche Abfüllung in die vorbereiteten Tubes. Das Abfüllen geschah mit einer Pipette. In jedes Tube wurden 30 µl der Samensuspension pipettiert. Verglichen mit dem Nanostraw sind die Tube-Pellets weniger sensitiv gegenüber Temperaturschwankungen. Um Temperaturschwankungen zu minimieren, wird nach dem Hinzugeben der zweiten Verdünnungsphase auf direkten Hand-Tube-Oberflächen-Kontakt verzichtet und alle weiteren Arbeiten an den Tube-Pellets mit einer Pinzette durchgeführt. Die Abbildung 5 zeigt die Lagerung der Tube-Pellets während der Versuche und die Verschlusshilfe. Die Tube-Pellets werden auf einer Lochplatte fixiert und so in LN₂ aufbewahrt.



Abbildung 5: Lagerung der Tube-Pellets auf einem Rack mit entwickelter Verschluss-hilfe.

Das Einfrierprogramm ist identisch zu dem der unsortierten 250 µl Kontrollstraws. Ein Ziel bei der Entwicklung der Tube-Pellets war es, dass diese sich von Einfrierregime der konventionellen Straws nicht sonderlich unterscheiden. So sollte mit denselben Einfriermedien und -techniken gearbeitet werden. Einziger Unterschied sollte die an die niedrigen Volumina angepasste Konfektionierung sein. Nach Beendigung des Einfrierprotokolls wurde das Tube-Pellet-fixierende Rack direkt in LN₂ überführt. Die endgültige Lagerung bis zum Auftauen und dem Thermoresistenztest erfolgte in einem Stickstoffcontainer. Die einzelnen Schritte der Verdünnung, Äquilibrierung und Kryokonservierung der 50 µl Tube-Pellets verlief identisch zu dem Herstellungsverfahren der 30 µl Tube-Pellets. Die Abbildung 6 zeigt die Volumenunterschiede der drei verschiedenen Tube-Pellet-Varianten.

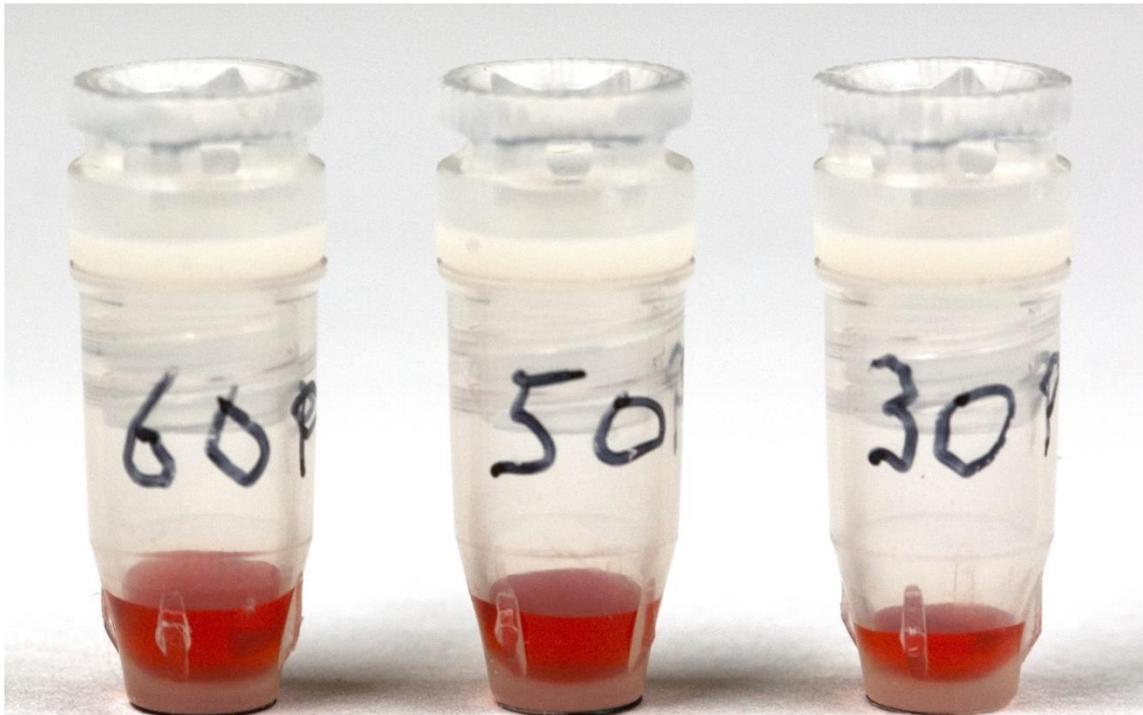


Abbildung 6: Die unterschiedlichen Volumina (60, 50, 30 µl) der Tube-Pellets der Versuchsteile I und II.

3.5.4 Kryokonservierung von sortierten Spermien in 250 µl Kontrollstraws: Verfahren, Konfektionierung und Kryokonservierung

Spermien, die nach dem Sortierprozess als 250 µl Kontrollstraw eingefroren werden sollten, wurden ebenso nach dem Sexcess[®] I und II Verdünnungsprotokoll kryokonserviert.

Um sortierte Spermien durch Kontakt mit dem Polyvinylalkoholanteil im Straw nicht zu verlieren, wurden zunächst 30 µl einer Vorlage in den Straw aufgezogen. Die Vorlage bestand dabei zu gleichen Teilen aus Sexcess[®] I und II. Zwischen der Vorlage und dem anschließend aufgezogenen Volumen von 160 µl der Samensuspension, bestand ein Abstand von ca. 1,2 cm. Beim weiteren Aufziehen der Flüssigkeiten kam somit nur die Vorlage in Kontakt mit dem Wattepfropfen und verschloss eine Seite des Straws. Das Befüllen der fünf sortierten Kontrollstraws erfolgt per Hand bei 5 °C. Verschlussen wurden sie mit dem Ultraschallverschweißgerät. Das gewählte Einfrierprogramm im Einfrierautomaten entsprach dem des Sexcess[®]-Protokolls und war im Vergleich zur unsortierten Kontrolle wesentlich schneller (Dauer ca. 10 min) als die Einfrierge-

schwindigkeit der unsortierten Portionen. Bei der sortierten Variante wurden die Spermien von +5 °C auf -8 °C in 4,33 min gekühlt. Es schloss sich eine Haltezeit von 1 Minute an, gefolgt von einer schnellen Kühlphase von 50,15 °C/min auf -120 °C und einer Endphase von -120 °C auf -140 °C innerhalb von 2 min.

3.5.5 Kryokonservierung von sortierten Spermien in 30 µl und 60µl Tube-Pellet: Verfahren, Konfektionierung und Kryokonservierung

Die Konservierungsschritte der sortierten 30 µl und 60 µl Tube-Pellet-Variante unterscheiden sich, abgesehen von dem gewählten Einfrierprotokoll, nicht von der unsortierten 30 µl und 50 µl Pellet-Variante bzw. der sortierten 250 µl Kontrollstraw-Variante. Die Konfektionierung entsprach der Art der unsortierten Tube-Pellet-Variante. Die Abfüllung in die 200 µl Tubes war ebenso identisch. Im Vergleich zur sortierten Kontrollstraw-Variante wurde bei der Abfüllung der sortierten Tube-Pellet-Varianten auf den Einsatz einer Vorlage verzichtet. Als Einfrierprogramm im Einfrierautomaten wurde dieselbe Einfrierkurve wie für die sortierten 160 µl Sort-Straws verwendet. Die Produktion der sortierten 60 µl Tube-Pellets unterschied sich durch das verwendete Volumen von den sortierten 30 µl Tube-Pellets. Das Endvolumen entsprach der doppelten Menge, was auch auf die Spermienzahl übertragen wurde.

3.6 Auftauverfahren der Behandlungsgruppen

Die AuftauprozEDUREN der Behandlungsgruppen unterschieden sich voneinander. Im Folgenden werden die jeweiligen Unterschiede erläutert.

3.6.1 Auftauverfahren der unsortierten und sortierten 250 µl Kontrollstraws

Die Straws wurden aus dem LN₂ entnommen, unverzüglich in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und für 20 sek aufgetaut. Nach der Entnahme aus dem Wasserbad und dem gründlichen Abtrocknen wurden je vier Straws gepoolt in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Das Poolen der Besamungsportionen war notwendig, um Variationen innerhalb verschiedener Straws eines Ejakulates ausgleichen zu können und bei niedrig dosierten Besamungsportionen ein ausreichendes Probenvolumen zu erlangen. Die gepoolte Probe (ca. 1 ml) wurde für 10 min auf einem auf 37 °C erhitzten Wärmeblock äquilibriert. Unmittelbar danach wurde der sechsstündige Thermoresistenztest durchgeführt.

3.6.2 Auftauverfahren der Nanostraws

Die Nanostraws wurden nach der Entnahme aus dem Stickstoffcontainer für 20 sek bei Raumtemperatur auf einer Arbeitsplatte aufgetaut und jeweils 15 Nanostraws mit einem Gesamtvolumen von ca. 300 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gepoolt.

3.6.3 Auftauverfahren der unsortierten und sortierten Tube-Pellets

Die für den Thermoresistenztest benötigte Anzahl an Tube-Pellets beider untersuchten Varianten mit Minimalvolumen der jeweiligen Versuchsteile (30 µl und 50 µl unsortiert im Versuchsteil I, 30 µl und 60 µl sortiert im Versuchsteil II) waren gemeinsam auf einem Rack fixiert und im Stickstoffcontainer gelagert. Das Auftauen geschah für 30 sek in einem 27 °C warmen Wasserbad. Nach der Entnahme aus dem Wasserbad erfolgte eine gründliche Abtrocknung der Tube-Pellets. Die Spermiesuspension eines jeden einzelnen Tubes wurde mit Hilfe einer 10-100 µl Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 15 Tube-Pellets in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gepoolt. Somit erhielt man ein Probenvolumen von ca. 450 µl aus den 30 µl Tube-Pellets (unsort-

tiert und sortiert), eines von 750 μl bei den 50 μl Tube-Pellets (unsortiert) und 900 μl bei den 60 μl Tube-Pellets (sortiert).

3.7 Thermoresistenztest nach dem Auftauen

Die spermatologische Untersuchung der Parameter Motilität, Membranintegrität und der morphologischen Integrität der jeweiligen Behandlungsgruppen aller untersuchten Konfektionierungsformen der zwei Versuchsteile nach dem Auftauen wurde durch einen sechsstündigen Thermoresistenztest verifiziert. Direkt nach dem Auftauen erfolgte das Umfüllen der Spermienproben in die Untersuchungsgefäße (1,5 ml Reaktionsgefäß) und eine 10-minütige Äquilibrationsphase bei 37°C und Dunkelheit. Es wurden zu drei verschiedenen Messzeitpunkten (0, 3 und 6 h) die spermatologischen Parameter untersucht. Dabei befanden sich die zu untersuchenden Proben permanent auf einem 37 °C warmen Wärmeblock bei absoluter Dunkelheit. Die Messung zur Stunde 0 fand direkt nach der 10-minütigen Äquilibration statt. Um die Aussagekraft der ermittelten Messwerte einer Behandlungsgruppe zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten zu erhöhen, wurden jeweils Doppelmessungen durchgeführt.

3.7.1 Motilität

Bei der Motilitätsmessung muss in der Präparation der Messproben zwischen unsortierten und sortierten Besamungsportionen unterschieden werden. Um bei der Motilitätsbestimmung mittels CASA die Spermien von im Verdünner enthaltenen Eigelbpartikeln separieren zu können, ist es notwendig mit Hoechst 33342 zu arbeiten. Der Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht die optische Trennung von Spermien und anderen Partikeln, welche von der Kamera fälschlicherweise als Spermien gedeutet werden könnten.

Den unsortierten Behandlungsgruppen (250 μl Kontrollstraw, 20 μl Nanostraw, 30 μl Tube-Pellet und 50 μl Tube-Pellet) wurden 5 μl der aufgetauten Samensuspension entnommen und in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammen mit 45 μl TRIS+AO und 3 μl Hoechst 33342 pipettiert. Die Inkubation des Aliquots erfolgte für 10 min bei 37°C im Dunklen. Nach der Inkubation wurden 10 μl des Aliquots auf eine Maklerkammer gegeben. Der Probentisch des CASA-Systems war dabei permanent auf 37 °C erwärmt.

Pro Messung wurden 300-900 Spermien ausgewertet. Für die statistische Auswertung wurde die prozentuale Gesamtbeweglichkeit der Spermien herangezogen.

Die vor der Kryokonservierung sortierten Behandlungsgruppen (160 µl Sort-Straw, 30 µl Tube-Pellet und 60 µl Tube-Pellet) wurden bereits für den Sortierprozess mit Hoechst 33342 angefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff verbleibt auch nach dem Sortieren an der DNA der Spermienköpfen gebunden. Somit konnte der vorher in diesem Kapitel beschriebene Behandlungsschritt des Anfärbens ausbleiben und das Probenvolumen von 10 µl direkt aus den Reaktionsgefäßen, in denen die aufgetauten sortierten Behandlungsgruppen bei 37 °C und Dunkelheit lagerten, entnommen und auf die Maklerkammer pipettiert werden. Die weiteren Arbeitsschritte entsprachen denen der unsortierten Behandlungsgruppen.

3.7.2 Membranintegrität

Die Membranbeschaffenheit und -vitalität aller aufgetauten Behandlungsgruppen wurde mit einer flowzytometrischen Messung verifiziert. Für die Messung wurde ein Durchflusssytometer genutzt. Die Messung der Fluoreszenz wurde durch den Einsatz zweier Filter erreicht. Die Grünfluoreszenz wurde mit einem FL-1 (488 nm/22 mW) Filter und die Rotfluoreszenz mit einem FL-3 (638 LP nm) Filter gemessen.

Für die Messung wurden die Proben auf $13,2 \times 10^6$ Spermien/ml verdünnt. Für die Doppelmessungen wurden in jedes Facs-Röhrchen 8 µl eines SYBR[®]14/PI (5 µl SYBR[®]14, 3 µl PI) Aliquots, 480 µl TRIS und 12 µl der aufgetauten Samensuspension gegeben und für 15 min bei 37 °C und Dunkelheit inkubiert. Pro Messung wurden mindestens 10.000 Zellen gezählt.

3.7.3 Morphologie

Die Behandlungsgruppen wurden auf ihren morphologischen Status nach dem Auftauen untersucht. Hierfür wurden 10 µl der Spermiesuspension einer jeden Behandlungsgruppe in ein vorab präpariertes 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und dadurch fixiert. Das Reaktionsgefäß enthielt 100 µl einer Hancock-Lösung. Davon wurden 8 µl auf einen Objektträger gegeben. Mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops bei 1000-facher Vergrößerung unter Öl wurden jeweils 200 Spermien ausgezählt. Für diesen Versuch

fand die Bewertung der morphologischen Abweichungen zur Stunde 0, zur Stunde 3 und zur Stunde 6 statt. Es wurden verschiedene Bereiche des Spermiums auf dessen morphologische Integrität hin untersucht. Tabelle 12 zeigt die bewerteten morphologischen Abweichungen.

Tabelle 12: Darstellung der morphologischen Abweichungen von Spermien

Ort der morphologischen Abweichung	Art der morphologischen Abweichung
Kappenabweichungen	abgelöst, in Ablösung, geschwollen, deformiert, persistierendes Akrosomgranulom
Kopfabweichungen	deformiert, paraxialer Schwanzansatz
Halsabweichungen	Halsbruch, Plasmotropfen
Verbindungsstückabweichungen	Plasmotropfen, deformiert
Haupt- und Endstückabweichungen	Plasmotropfen, Schleifenform, aufgerollt, um den Kopf gerollt, abgeknickt
Doppel- und Mehrfachmissbildungen	Missbildungen

3.8 Statistische Auswertung

Die ermittelten Daten wurden mit dem statistischen Analyseprogramm „SigmaStat 2.03 for Windows®“ (Jandel Scientific Cooperation, San Rafael, CA, USA) auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen überprüft. Zunächst wurden die Ergebnisse auf ihre Normalverteilung hin geprüft. Ein 95 %-Konfidenzintervall wurde als signifikant ($P \leq 0,05$) angenommen. Die Daten wurden bullenindividuell erfasst und ausgewertet. Für die jeweils durchgeführten Doppelmessungen der Motilität und Membranintegrität wurden die Mittelwerte erfasst. Die Ergebnisse wurden bei Normalverteilung mittels einer One Way Analysis of Variance (ANOVA), oder bei Fehlen einer Normalverteilung, durch ANOVA on Ranks und Tukey-Test als Mehrfach-Vergleich analysiert. Der Kolmogorov-Smirnov-Test diente der Annahmeüberprüfung der Normalverteilung und der Levene-Mediantest als Annahmeüberprüfung der Variabilität der Gruppenmittelwerte. Der Tukey-Test diente der Bestimmung eines Unterschiedes zwischen allen Behandlungen. Für den Versuchsteil I wurden die Messungen pro Bulle achtmal wiederholt. Für den Versuchsteil II wurden die Messungen pro Bulle neunmal wiederholt. Bei den Ergebnissen in Kapitel 4 repräsentieren Buchstaben sich signifikant unterscheidende Werte. Großbuchstaben stellen signifikante Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten unter den Behandlungsgruppen dar und Kleinbuchstaben stehen für signifikante Unterschiede unter den Behandlungsgruppen innerhalb eines Messzeitpunktes.

In den folgenden Tabellen des Ergebniskapitels wird durchgehend das arithmetische Mittel (\bar{x}) \pm Standardabweichung (STD) angegeben. Die Datenerfassung wurde über die Dauer der zwei Versuchsteile von derselben Person durchgeführt.

4 Ergebnisse

Für die Versuchsteile I und II werden die Gesamtmotilität, die Membranintegrität auf Grund der Fluoreszenzfärbung und der Anteil morphologisch intakter Spermien für frisch gewonnene Ejakulate und zwischen den Messzeitpunkten 0 h, 3 h und 6 h im Thermoresistenztest präsentiert. Im Versuchsteil II wird zusätzlich der Wert für frisch sortierte Proben angegeben. Die Darstellung erfolgt bullenindividuell und in tabellarischer Form.

4.1 Versuchsteil I: Verifizierung der Kryokonservierbarkeit von unsortierten Spermien in Minimalvolumina

4.1.1 Motilität Bulle A

Tabelle 13 zeigt die prozentualen Werte der Gesamtmotilität des Bullen A nativ und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests der einzelnen Behandlungsgruppen.

Zwischen dem Nativwert und den ermittelten Werten des Kontrollstraws, des Nanostraws, des 30 µl Tube-Pellets und des 50 µl Tube-Pellets zur **Stunde 0** nach dem Auftauen wurde kein signifikanter Unterschied nachgewiesen. Der Straw zur **Stunde 3** war signifikant ($P \leq 0,05$) besser als der Nano, während jeweils keine signifikanten Unterschiede zu den beiden Tube-Pellets bestanden. Zur **Stunde 6** war der Straw dem Nano ebenso ($P \leq 0,05$) überlegen. Die Gesamtmotilität der Spermien des **30TP** zur Stunde 0 war der zu den Stunden 3 und 6 signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Der **Nano** zur Stunde 0 war dem zur Stunde 6 statistisch bei $P \leq 0,05$ überlegen.

Tabelle 13: Prozentualer Anteil motiler Spermien im Thermoresistenztest

(n= 9)	nativ $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	77,8±6,6 ^A			
Straw		72,3±12,0 ^{A,B}	68,9±4,5 ^{a,A,B}	63,8±6,9 ^{a,A,B}
Nano		66,8±8,3 ^A	54,1±5,3 ^{b,B}	47,7±11,2 ^{b,B}
30TP		73,4±9,8 ^A	58,2±5,6 ^{a,b,B}	58,6±9,4 ^{a,b,B}
50TP		69,8±8,9 ^{A,B}	61,7±9,7 ^{a,b,B}	56,4±8,2 ^{a,b,B}

a, b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich innerhalb eines Messzeitpunktes signifikant ($P \leq 0,05$)

A, B: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.1.2 Motilität Bulle B

Die prozentualen Werte der Gesamtmotilität des Bullen B nativ und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests der einzelnen Behandlungsgruppen werden in Tabelle 14 gezeigt.

Vergleicht man den Wert „**unverdünnt**“ mit den Messwerten der einzelnen Behandlungsgruppen zur **Stunde 0** so wird ersichtlich, dass „unverdünnt“ wesentlich besser ($P \leq 0,05$) als der Motilitätswert des **Nanos** ist. Im weiteren Verlauf des Thermoresistenztests gab es keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Behandlungsgruppen. Die untersuchten minimaldosierten Behandlungsgruppen im Tube-Pellet, ebenso wie der Straw, entsprachen den Qualitätsanforderungen nach RATH et al. (2009). Innerhalb der Messzeitpunkte unterschieden sich die Werte der vier Behandlungsgruppen nicht signifikant voneinander.

Tabelle 14: Prozentualer Anteil motiler Spermien im Thermoresistenztest

(n= 9)	nativ $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	63,8±11,5 ^A			
Straw		54,9±6,2 ^{A,B}	50,4±6,5 ^{A,B}	47,3±9,0 ^{A,B}
Nano		43,1±15,8 ^B	35,0±11,6 ^B	31,8±10,9 ^B
30TP		50,6±14,0 ^{A,B}	36,1±8,6 ^B	34,2±10,2 ^B
50TP		50,4±11,4 ^{A,B}	44,2±11,8 ^B	37,6±12,7 ^B

A, B: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.1.3 Membranintegrität Bulle A

Die Tabelle 15 gibt die prozentualen Werte der Membranintegrität des Bullen A in der nativen Probe und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests und in den einzelnen Behandlungsgruppen an.

Der Wert „unverdünnt“ war im Vergleich zur **Stunde 0** dem Straw, dem 30TP, dem 50TP und dem Nano signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Die vier Behandlungsgruppen unterschieden sich untereinander zur **Stunde 0** nicht signifikant. Zur **Stunde 3** war der Straw dem Nano signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Der Straw war zur **Stunde 6** sowohl dem Nano als auch dem 50TP ($P \leq 0,05$) überlegen. Die Membranintegrität im Nano zur Stunde 0 war dem zur Stunde 6 signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen.

Tabelle 15: Prozentualer Anteil membranintakter Spermien im Thermoresistenztest

(n= 9)	nativ $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	88,7±3,6 ^A			
Straw		67,6±7,1 ^B	66,3±6,7 ^{a,B}	65,7±6,3 ^{a,B}
Nano		61,4±5,7 ^B	53,1±4,9 ^{b,B}	47,1±6,3 ^{b,C}
30TP		63,6±6,1 ^B	60,2±5,1 ^{a,b,B}	57,4±6,3 ^{a,b,B}
50TP		63,6±6,1 ^B	57,6±4,2 ^{a,b,B}	55,3±4,8 ^{b,B}

a, b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich innerhalb eines Messzeitpunktes signifikant ($P \leq 0,05$)

A, B, C: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.1.4 Membranintegrität Bulle B

Tabelle 16 zeigt die prozentualen Werte der Membranintegrität des Bullen B in der nativen Probe und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests und in den einzelnen Behandlungsgruppen.

Der Wert für die Membranintegrität „unverdünnt“ war der im Straw, dem 30TP und dem 50TP sowie dem Nano zur **Stunde 0** überlegen ($P \leq 0,05$). Die Behandlungsgruppen unterschieden sich innerhalb der Messzeitpunkte nicht signifikant voneinander.

Tabelle 16: Prozentualer Anteil membranintakter Spermien im Thermoresistenztest

(n= 9)	nativ $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	69,1±10,4 ^A			
Straw		47,8±8,6 ^B	48,8±9,0 ^B	47,8±8,7 ^B
Nano		43,8±11,1 ^B	39,3±9,5 ^B	32,6±12,7 ^B
30TP		45,8±9,8 ^B	42,3±11,1 ^B	41,1±10,3 ^B
50TP		45,7±10,5 ^B	45,5±11,3 ^B	42,2±11,9 ^B

A, B: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.1.5 Morphologie Bulle A

Tabelle 17 zeigt den prozentualen Anteil morphologisch intakter Spermien des Bullen A im nativen Zustand und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests und innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen.

Der Wert „unverdünnt“ war dem Straw und dem Nano zur **Stunde 0** signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Zwischen den Behandlungsgruppen gab es zu den Messzeitpunkten 0, 3 und 6 h keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 17: Prozentualer Anteil morphologisch intakter Spermien im Thermoresistenztest

(n= 9)	nativ $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	86,5±3,5 ^A			
Straw		79,6±3,8 ^B	77,2±3,8 ^B	72,8±3,9 ^C
Nano		76,6±3,3 ^B	71,6±7,0 ^B	69,2±2,0 ^C
30TP		81,1±3,8 ^{A,B}	77,8±3,2 ^{A,B}	73,2±3,0 ^B
50TP		80,0±3,8 ^{A,B}	76,3±3,9 ^B	71,8±3,7 ^C

A, B, C: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.1.6 Morphologie Bulle B

Tabelle 18 zeigt den prozentualen Anteil morphologisch intakter Spermien des Bullen B im nativen Zustand und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests und innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen.

Der Wert „unverdünnt“ war dem Wert des Nanos zur **Stunde 0** signifikant überlegen ($P \leq 0,05$). Die vier Behandlungsgruppen unterschieden sich zu den Messzeitpunkten 0, 3 und 6 h nicht signifikant voneinander.

Tabelle 18: Prozentualer Anteil morphologisch intakter Spermien im Thermoresistenztest

(n= 9)	nativ $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	82,7±5,2 ^A			
Straw		75,0±5,5 ^{A,B}	71,6±7,6 ^B	69,8±4,9 ^B
Nano		73,6±4,4 ^B	67,0±4,2 ^B	64,8±4,7 ^C
30TP		78,0±3,7 ^{A,B}	73,9±4,4 ^B	68,3±5,1 ^C
50TP		76,4±4,4 ^{A,B}	71,9±4,1 ^B	67,9±5,6 ^C

A, B, C: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.2 Versuchsteil II: Verifizierung der Kryokonservierbarkeit von sortierten Spermien in Minimalvolumina

4.2.1 Motilität Bulle A

Die prozentualen Anteile der Gesamtmotilität des Bullen A im nativen Zustand, nach dem Sortierprozess und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen werden in Tabelle 19 aufgeführt.

Die Motilität nach dem Sortierprozess (**post Sort**) war signifikant ($P \leq 0,05$) höher als die Nativprobe (**unverdünnt**). Der post Sort Wert war statistisch besser ($P \leq 0,05$) als das 60TPsort) zur Stunde 0. Nach dem Auftauen zur **Stunde 0** war innerhalb der Behandlungsgruppen die Motilität im Straw signifikant ($P \leq 0,05$) besser als die des 60TPsort. Der Motilitätswert im Straw zur Stunde 0 war höher ($P \leq 0,05$) als der Wert „unverdünnt“ vor dem Einfrieren. Zur **Stunde 3** war der Straw dem 60TPsort signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Sowohl der Straw als auch der **Sort** und das 30TPsort waren zur **Stunde 6** dem 60TPsort statistisch ($P \leq 0,05$) überlegen. Der Straw zur Stunde 0 war dem Straw zur Stunde 6 signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Auch das 30TPsort und das 60TPsort zur Stunde 0 waren signifikant ($P \leq 0,05$) besser als das 30TPsort und 60TPsort zur Stunde 6.

Tabelle 19: Prozentualer Anteil motiler Spermien im Thermoresistenztest

(n= 8)	nativ $\bar{x} \pm SD$	post Sort $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	72,4±6,2 ^B	90,4±2,9 ^A			
Straw			85,8±5,8 ^{a,A}	73,3±7,4 ^a	68,9±5,3 ^{a,B}
Sort			79,4±6,4 ^{a,b,A,B}	68,1±5,4 ^{a,b,B}	61,5±7,5 ^{a,B}
30TPsort			78,6±9,6 ^{a,b,A,B}	67,1±9,1 ^{a,b,B}	61,9±7,2 ^{a,C}
60TPsort			70,4±6,5 ^{b,B}	55,9±6,2 ^{b,C}	46,4±10,3 ^{b,D}

a, b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich innerhalb eines Messzeitpunktes signifikant ($P \leq 0,05$)

A, B, C, D: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert, dem post Sort Wert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.2.2 Motilität Bulle C

In der Tabelle 20 werden die prozentualen Anteile der Gesamtmotilität des Bullen C im nativen Zustand, nach dem Sortierprozess und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen dargestellt.

Der post Sort Wert war signifikant höher ($P \leq 0,05$) als der des 30TPsort, des Sorts und des 60TPsort zur Stunde 0. Zusätzlich war der Wert „unverdünnt“ signifikant ($P \leq 0,05$) besser als der des Sorts und des 60TPsort. Innerhalb der Behandlungsgruppen zur **Stunde 0** war das 60TPsort dem Straw deutlich ($P \leq 0,05$) unterlegen. Der Sort und das 60TPsort zur **Stunde 3** waren signifikant schlechter als der Straw. Zur **Stunde 6** war der Straw dem Sort, dem 30TPsort und dem 60TPsort signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Alle vier Behandlungsgruppen zur Stunde 0 verschlechterten sich zwischen den Messzeiträumen Stunde 3 und 6 signifikant ($P \leq 0,05$).

Tabelle 20: Prozentualer Anteil motiler Spermien im Thermoresistenztest

(n= 8)	nativ $\bar{x} \pm SD$	post Sort $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	78,3±6,8 ^A	87,1±5,3 ^A			
Straw			76,5±8,5 ^{a,A,B}	59,5±3,3 ^{a,B}	54,5±6,3 ^{a,C}
Sort			61,6±6,1 ^{a,b,B}	43,1±9,5 ^{b,C}	28,6±10,9 ^{b,D}
30TPsort			65,4±8,2 ^{a,b,A,B}	46,1±6,3 ^{a,b,C}	37,3±5,1 ^{b,D}
60TPsort			54,3±7,5 ^{b,B}	38,3±10,1 ^{b,C}	23,3±9,7 ^{b,D}

a, b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich innerhalb eines Messzeitpunktes signifikant ($P \leq 0,05$)

A, B, C, D: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert, dem post Sort Wert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.2.3 Motilität Bulle D

Tabelle 21 stellt die ermittelten prozentualen Anteile der Gesamtmotilität des Bullen D im nativen Zustand, nach dem Sortierprozess und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen dar.

Der post Sort Wert und der Wert „unverdünnt“ waren signifikant ($P \leq 0,05$) besser als der Sort und das 60TPsort zur Stunde 0. Der post Sort Wert war zusätzlich dem 30TPsort

überlegen ($P \leq 0,05$). Innerhalb des Messzeitpunkts zur **Stunde 0** waren der Straw und das 30TPsort dem 60TPsort signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Zur **Stunde 3** waren der Straw und das 30TPsort statistisch besser ($P \leq 0,05$) als der Sort und das 60TPsort. Der Straw und das 30TPsort waren zur **Stunde 6** dem Sort und dem 60TPsort signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen.

Tabelle 21: Prozentualer Anteil motiler Spermien im Thermoresistenztest

(n= 8)	nativ $\bar{x} \pm SD$	post Sort $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	79,9±9,2 ^A	90,4±3,0 ^A			
Straw			77,4±6,6 ^{a,A,B}	64,1±8,7 ^{a,B}	58,8±3,7 ^{a,B}
Sort			64,9±6,5 ^{a,b,B}	48,1±10,4 ^{b,C}	31,3±7,6 ^{b,D}
30TPsort			70,4±10,5 ^{a,A,B}	57,0±5,5 ^{a,B}	45,1±7,8 ^{a,C}
60TPsort			56,6±4,6 ^{b,B}	40,7±8,7 ^{b,C}	20,1±7,2 ^{b,D}

a, b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich innerhalb eines Messzeitpunktes signifikant ($P \leq 0,05$)

A, B, C, D: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert, dem post Sort Wert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.2.4 Membranintegrität Bulle A

Für den Bullen A werden die prozentualen Werte der Membranintegrität im nativen Zustand, nach dem Sortierprozess und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests der einzelnen Behandlungsgruppen in der Tabelle 22 gezeigt.

Sowohl der Wert „unverdünnt“ als auch der post Sort Wert waren dem Straw, dem Sort, dem 30TPsort und dem 60TPsort zur Stunde 0 signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Im Vergleich der Membranintegrität des 60TPsort zur **Stunde 0**, war der Sort signifikant ($P \leq 0,05$) besser. Zur **Stunde 3** waren der Sort, der Straw und das 30TPsort dem 60TPsort signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Auch zur **Stunde 6** schnitten der Straw, der Sort und das 30TPsort statistisch signifikant ($P \leq 0,05$) besser ab als das 60TPsort. Der Straw, der Sort und das 30TPsort unterschieden sich zwischen den Messzeiträumen nicht signifikant voneinander. Der Sort und das 30TPsort zur Stunde 0 waren signifikant ($P \leq 0,05$) besser, als deren Ergebnisse zur Stunde 6. Das 60TPsort zur Stunde 0 war statistisch signifikant ($P \leq 0,05$) besser im Vergleich zur Stunde 3 und 6.

Tabelle 22: Prozentualer Anteil membranintakter Spermien im Thermoresistenztest

(n= 8)	nativ $\bar{x} \pm SD$	post Sort $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	85,1±4,0 ^A	82,8±5,6 ^A			
Straw			69,2±4,2 ^{a,b,B}	67,5±3,5 ^{a,B}	65,4±3,1 ^{a,B}
Sort			73,5±3,9 ^{a,B}	67,6±3,2 ^{a,B}	61,3±5,3 ^{a,C}
30TPsort			68,7±4,9 ^{a,b,B}	61,2±5,0 ^{a,B}	57,0±6,6 ^{a,C}
60TPsort			62,6±5,0 ^{b,B}	51,3±5,3 ^{b,C}	43,6±6,1 ^{b,D}

a, b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich innerhalb eines Messzeitpunktes signifikant ($P \leq 0,05$)

A, B, C, D: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert, dem post Sort Wert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.2.5 Membranintegrität Bulle C

Tabelle 23 zeigt die prozentualen Werte der Membranintegrität des Bullen C im nativen Zustand, nach dem Sortierprozess und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests der einzelnen Behandlungsgruppen.

Der post Sort Wert und der Wert „unverdünnt“ unterschieden sich signifikant ($P \leq 0,05$) im Vergleich zu dem Straw, dem 30TPsort, dem Sort und dem 60TPsort zur Stunde 0. Weiterhin war der Straw zur **Stunde 0** signifikant ($P \leq 0,05$) besser als das 60TPsort zum selben Messzeitpunkt. Zur **Stunde 3** war der Straw dem 60TPsort signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Das 30TPsort und das 60TPsort waren dem Straw zur **Stunde 6** statistisch signifikant ($P \leq 0,05$) unterlegen. Das 30TPsort, der Sort und das 60TPsort zur Stunde 0 waren über die Dauer des Thermoresistenztests jeweils signifikant ($P \leq 0,05$) besser als die Werte zur Stunde 3 und 6.

Tabelle 23: Prozentualer Anteil membranintakter Spermien im Thermoresistenztest

(n= 8)	nativ $\bar{x} \pm SD$	post Sort $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	79,3±3,4 ^A	80,1±5,4 ^A			
Straw			61,7±3,8 ^{a,B}	55,3±3,5 ^{b,B}	52,7±3,5 ^{b,B}
Sort			60,1±4,2 ^{a,b,B}	47,2±5,9 ^{b,c,C}	43,9±5,4 ^{b,c,D}
30TPsort			60,8±4,1 ^{a,b,B}	47,5±5,4 ^{b,c,C}	43,5±5,0 ^{c,D}
60TPsort			52,3±3,3 ^{b,B}	41,6±1,6 ^{c,C}	37,6±4,7 ^{c,D}

a, b, c: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich innerhalb eines Messzeitpunktes signifikant ($P \leq 0,05$)

A, B, C, D: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert, dem post Sort Wert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.2.6 Membranintegrität Bulle D

Tabelle 24 zeigt die prozentualen Werte der Membranintegrität des Bullen D im nativen Zustand, nach dem Sortierprozess und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests der einzelnen Behandlungsgruppen.

Sowohl der Wert „unverdünnt“ als auch der post Sort Wert waren dem Straw, dem 30TPsort, dem Sort und dem 60TPsort zur Stunde 0 überlegen ($P \leq 0,05$). Der Straw zur **Stunde 0** war dem Sort und dem 60TPsort statistisch ($P \leq 0,05$) überlegen. Das 30TPsort und der Sort waren dem 60TPsort zur Stunde 0 ebenfalls statistisch ($P \leq 0,05$) überlegen. Zur **Stunde 3** war der Straw dem 30TPsort, dem Sort und dem 60 TPsort signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Auch hier waren das 30TPsort und der Sort dem 60TPsort ($P \leq 0,05$) überlegen. Der Straw war zur **Stunde 6** den drei anderen Behandlungsgruppen signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Das 30TPsort und der Sort waren auch hier signifikant ($P \leq 0,05$) besser als das 60TPsort.

Tabelle 24: Prozentualer Anteil membranintakter Spermien im Thermoresistenztest

(n= 8)	nativ $\bar{x} \pm SD$	post Sort $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	83,0±1,9 ^A	80,5±3,5 ^A			
Straw			69,2±4,3 ^{a,B}	64,9±4,5 ^{a,B}	62,5±4,6 ^{a,B}
Sort			60,9±4,7 ^{b,c,B}	51,7±4,8 ^{b,C}	46,7±5,7 ^{b,C}
30TPsort			63,0±3,2 ^{a,b,B}	54,9±3,0 ^{b,C}	49,5±3,0 ^{b,C}
60TPsort			49,0±2,7 ^{c,B}	37,1±3,9 ^{b,c,C}	31,2±4,5 ^{b,c,C}

a, b, c: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich innerhalb eines Messzeitpunktes signifikant ($P \leq 0,05$)

A, B, C: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert, dem post Sort Wert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.2.7 Morphologie Bulle A

Tabelle 25 zeigt den prozentualen Anteil morphologisch intakter Spermien des Bullen A im nativen Zustand, nach dem Sortierprozess und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests und innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen.

Der post Sort Wert war signifikant ($P \leq 0,05$) höher als die entsprechenden Werte zur **Stunde 0** des Straws, des 30TPsort, des Sorts und des 60TPsort. Der Wert „unverdünnt“ war dem 60TPsort zur Stunde 0 signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Zur **Stunde 3** war der Straw dem 60TPsort signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Ebenso zur **Stunde 6** war der Straw dem 60TPsort signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Zwischen den Messzeiträumen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Straw, dem Sort und dem 30TPsort. Über den Messzeitraum des Thermoresistenztests war das 60TPsort zur Stunde 0 signifikant ($P \leq 0,05$) besser als das 60TPsort zur Stunde 3 und zur Stunde 6. Selbiges traf auch auf das 30TPsort zu. Der Sort war zur Stunde 0 dem entsprechenden Sort zur Stunde 6 signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen.

Tabelle 25: Prozentualer Anteil morphologisch intakter Spermien im Thermoresistenztest

(n= 8)	nativ $\bar{x} \pm SD$	post Sort $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	88,3±2,5 ^{A,B}	91,4±3,6 ^A			
Straw			86,9±3,0 ^{A,B}	84,6±1,8 ^{a,A,B}	82,8±2,5 ^{a,B}
Sort			85,0±1,9 ^{A,B}	81,3±2,0 ^{a,b,A,B}	80,5±2,2 ^{a,b,B}
30TPsort			85,9±2,1 ^{A,B}	81,5±2,1 ^{a,b,B}	79,8±2,0 ^{a,b,B}
60TPsort			83,4±1,4 ^B	78,9±2,0 ^{b,C}	77,8±2,2 ^{b,C}

a, b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich innerhalb eines Messzeitpunktes signifikant ($P \leq 0,05$)

A, B, C: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert, dem post Sort Wert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.2.8 Morphologie Bulle C

Von dem Bullen C wird der prozentuale Anteil morphologisch intakter Spermien im nativen Zustand, nach dem Sortierprozess und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests und innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen in Tabelle 26 dargestellt.

Der Wert „unverdünnt“ war dem 60TPsort zur Stunde 0 signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Der post Sort Wert war dem Sort, dem 30TPsort, dem 60TPsort und dem Straw zur **Stunde 0** signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen. Der Sort, das 30TPsort und das 60TPsort zur Stunde 0 waren signifikant ($P \leq 0,05$) besser als ihre Pendants zur **Stunde 6**.

Tabelle 26: Prozentualer Anteil morphologisch intakter Spermien im Thermoresistenztest

(n= 8)	nativ $\bar{x} \pm SD$	post Sort $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	87,2±2,1 ^{A,B}	89,6±3,2 ^A			
Straw			82,7±5,4 ^{A,B}	83,0±3,2 ^{A,B}	80,3±2,1 ^{A,B}
Sort			85,0±2,3 ^{A,B}	80,7±1,0 ^{A,B}	77,3±1,3 ^B
30TPsort			84,1±2,1 ^{A,B}	80,9±1,4 ^{A,B}	79,0±2,1 ^B
60TPsort			82,1±1,5 ^B	78,7±1,2 ^B	76,7±2,3 ^C

A, B, C: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert, dem post Sort Wert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

4.2.9 Morphologie Bulle D

Tabelle 27 zeigt den prozentualen Anteil morphologisch intakter Spermien des Bullen D im nativen Zustand, nach dem Sortierprozess und nach dem Auftauen über die Dauer des Thermoresistenztests und innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen.

Der post Sort Wert war dem aufgetauten Sort und dem 60TPsort zur **Stunde 0** überlegen ($P \leq 0,05$). Zur **Stunde 6** war der Straw signifikant ($P \leq 0,05$) besser als das 60TPsort. Zu den drei Messzeitpunkten des Thermoresistenztests gab es keine statistischen Unterschiede zwischen dem Straw, dem Sort und dem 30TPsort. Der Wert „unverdünnt“ war dem 30TPsort zur Stunde 3 signifikant ($P \leq 0,05$) überlegen allerdings nicht zur Stunde 6.

Tabelle 27: Prozentualer Anteil morphologisch intakter Spermien im Thermoresistenztest

(n= 8)	nativ $\bar{x} \pm SD$	post Sort $\bar{x} \pm SD$	0 h $\bar{x} \pm SD$	3 h $\bar{x} \pm SD$	6 h $\bar{x} \pm SD$
unverdünnt	82,8±5,7 ^{A,B}	83,5±4,9 ^A			
Straw			80,9±4,0 ^{A,B}	78,6±2,8 ^{A,B}	77,1±3,9 ^{a,A,B}
Sort			76,0±3,0 ^B	73,3±4,6 ^B	72,6±2,8 ^{a,b,B}
30TPsort			78,6±4,6 ^{A,B}	75,1±4,8 ^B	75,9±2,8 ^{a,b,A,B}
60TPsort			75,9±3,0 ^B	71,6±4,8 ^B	69,5±3,0 ^{b,B}

a, b: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich innerhalb eines Messzeitpunktes signifikant ($P \leq 0,05$)

A, B: Werte mit unterschiedlichen Indizes unterscheiden sich zwischen dem Nativwert, dem post Sort Wert und den Messzeitpunkten signifikant ($P \leq 0,05$)

5 Diskussion

5.1 Fragestellung und Versuchshypothese

Es galt in dieser Arbeit zu prüfen, ob ein Pelletierverfahren - angelehnt an die Methode von NAGASE und NIWA (1964) - eine Alternative zur konventionellen Kryokonservierung in handelsüblichen Straws darstellen kann. Dazu musste das Problem der fehlenden Identifizierbarkeit von Pellets gelöst werden.

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines **praktikablen Verpackungssystems**, welches es ermöglicht, unsortierte und geschlechtsspezifisch differenzierte Spermien in niedrigen Volumina von 20-60 µl als einzeln identifizierbare und lagerfähige Besamungsportionen einzufrieren. Die Qualität der Besamungsportion wurde nach dem Auftauen *in-vitro* im Zeitablauf eines sechsständigen Thermoresistenztests verglichen. Es wurden die spermatologischen Untersuchungsparameter Motilität, Membranintegrität und Morphologie bewertet. Dabei sind die Untersuchungen immer nach demselben Verfahren und zu denselben Messzeitpunkten durchgeführt worden. Eine Ausnahme bildete die Motilitätsbestimmung nach dem Auftauen mittels CASA. Um die Verdünnerkomponenten, wie beispielsweise Eidotterpartikel in der unsortierten Behandlungsgruppen von Spermienköpfen unterscheiden zu können, wurde die Identifizierung der Spermien mit einer Fluoreszenzmessung auf Basis des Farbstoffs Hoechst 33342 durchgeführt. Die Halogen-Lichtquelle des CASA regte den Fluoreszenzfarbstoff in den Spermienköpfen an, womit Verdünnerbestandteile, die z.T. Spermienkopfgröße erreichen können und als immotile Spermien gemessen würden, von der Messung ausgeschlossen wurden. Gesexte Spermien enthielten den Fluoreszenzfarbstoff ohnehin.

Richtwerte für die Beurteilung der Auftauergebnisse liefern sowohl die Anforderungen von RATH et al. (2009) an sortierte Spermien (siehe Tabelle 4), als auch die Anforderung 8.2 an Zuchtbullen der ADR (2006A) (siehe Tabelle 1).

5.2 Laboruntersuchungen

5.2.1 Versuchsteil I

Im diesem Versuchsteil sollte der Frage nachgegangen werden, ob die in seiner Herstellung sehr komplizierte minimaldosierte Konfektionierung in Nanostraws (STROTHMEYER, 2013) durch eine praktikablere Alternative zu ersetzen ist. Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass eine Alternative auf dem Verfahren der Pelletierung (NAGASE und NIWA, 1964) aufbauen kann (SCHÜTT, 2013). Die Konfektionierungen sollten mittels SIFT[®] - einer tief intrauterinen Besamungstechnik in den Eileiter - nutzbar sein. Das Verpackungssystem sollte dabei möglichst praxisgerecht produzierbar und hochkonzentriert verdünnt sein, um die Nutzung von Jungbullenejakulaten optimieren zu können. Seit mehreren Jahren wird in der Rinderzucht der genomische Zuchtwert als Grundlage für die Auswahl der Besamungsbullen eingesetzt (DE ROOS et al., 2011). Dadurch können Jungbullen bereits ab dem 10. Lebensmonat zur Samengewinnung herangezogen werden. Untersuchungen zeigen, dass die Spermaqualität und die Gesamtzahl der ejakulierten Spermien zu diesem Zeitpunkt aber häufig reduziert sind (HALLAP et al., 2004; PADRIK und JAAKMA, 2004; OSMERS und HERMANN, 2017). Weiterhin ist eine geringe Spermiendichte sowie eine wesentlich labilere Spermienchromatinstruktur zu beobachten (KARABINUS et al., 1990; LIGNER, 2009; LICHTNER, 2010). Die Behandlungsgruppen wurden mit dem für gesortete Spermien entwickelten Gefrierverdünner Sexcess[®] eingefroren. Der positive Effekt dieses Verdünnerverfahrens, auch auf nicht sortierte Spermien, wurde bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen (KLINC, 2005; MÖNCH-TEGEDER, 2012).

Im **Versuchsteil I** konnte gezeigt werden, dass die Auftauwerte der drei untersuchten Varianten mit Minimalvolumina für Motilität, Membranintegrität und Morphologie qualitativ mit dem Kontrollstraw vergleichbar sind. Zwischen den eingesetzten Bullen gab es Unterschiede in den Auftauergebnissen. So erfüllte Bulle A die Richtwerte von RATH et al. (2009) und der ADR (2006A) zur Stunde 0 nach dem Auftauen für die **Motilität** in allen Behandlungsgruppen. Dabei liegt der Richtwert zur Stunde 0 bei einer Motilität von $\geq 50\%$ und zur Stunde 6 von $\geq 30\%$. Bulle B erfüllte den Richtwert zur Stunde 0 mit dem Nanostraw nicht, zur Stunde 6 jedoch schon.

Der Anteil **morphologisch intakter Spermien** wurde vor dem Einfrieren von beiden Bullen entsprechend der Anforderungen der ADR (2006A) erreicht. Nach dem Auftauen erfüllte Bulle A mit den beiden Tube-Pellet-Varianten die Mindestanforderungen nach RATH et al. (2009), Bulle B hingegen mit keiner der Behandlungsgruppen.

Bei wertvollen Bullen mit einem entsprechend hohem Zuchtwert wird häufig versucht, die Spermienzahl pro Besamungsportion zu senken, um die Anzahl produzierbarer Straws pro Ejakulat erhöhen zu können (DEN DAAS et al., 1998). Verschiedene Autoren haben dabei eine Mindestzahl von Spermien pro Straw ermittelt. Im Straw sollte die Anzahl von sortierten Spermien nicht unter 3×10^6 Spermien gesenkt werden (BISWAS et al., 2016). Unsortierte Spermien können auf 1×10^6 im Straw reduziert werden (SEIDEL und SCHENK, 2008). In der Praxis wird eine Konzentration von $2,5 - 5,0 \times 10^6$ Spermien/Straw verwendet (RATH, 2016). Eine Verringerung der Spermienkonzentration in der Besamungsportion kann zu reduzierten Trächtigkeitsraten und einer verminderten Auftauqualität führen (GÉRARD und HUMBLLOT, 1991; STROTHMEYER, 2013; THOMAS et al., 2017). Die untersuchten minimaldosierten Behandlungsgruppen enthielten 1×10^6 Spermien/30 µl. Das Verdünnungsverhältnis ist dadurch wesentlich konzentrierter verglichen mit 1×10^6 Spermien/250 µl Straw. Dies könnte einer der Gründe sein, warum die beiden Tube-Pellet-Varianten in ihren Auftauergebnissen mit dem Kontrollstraw vergleichbar sind. Auf Grund der hochkonzentrierten Relation zwischen Spermien und Verdünnermedium scheint kein Verdünnungseffekt eingetreten zu sein. Eine Reduzierung der Spermiengesamtzahl im Straw bei gleichzeitiger Erhöhung des Verdünneranteils beeinflusst das Mengen-/Volumenverhältnis negativ, der Verdünnungseffekt tritt ein (MAZUR, 1984). Je niedriger die Spermienanzahl in Relation zum Konfektionsvolumen ausfällt, desto höher ist das Risiko einen Verdünnungseffekt herbeizuführen (VISHWANATH und SHANNON, 2000; GARNER et al., 2001).

Als zusätzlicher Test kann die Überprüfung der **Membranintegrität** zur Absicherung der Befruchtungsvorhersage dienen. Eine direkte Korrelation zu lichtmikroskopisch erkennbaren morphologischen Abweichungen lässt sich jedoch nicht ziehen. In der Literatur wird aber von einer Korrelation zwischen der NRR56 und der ermittelten Membranintegrität nach dem Auftauen ($r=0,506$) berichtet. Die Autoren sehen die per Durchflusszytometrie ermittelte Membranintegrität vor und nach dem Auftauen als aussagekräftige Methode über die Fertilität einer Besamungsportion an. Laut der Studie führt ein Anteil von 40 – 60 % SYBR[®]14 -positiver Spermien nach dem Auftauen zu einer

Steigerung der Non-Return-Rate 56 von 71,65 % auf 74,45 % (CHRISTENSEN et al., 2011). Es ist jedoch zu früh, um abzuschätzen inwieweit die Untersuchung der Membranintegrität im Rahmen eines sechsstündigen Thermoresistenztestes eine Prognose der Fruchtbarkeit zulässt. Sowohl Bulle A als auch Bulle B erreichen zur Stunde 6 im Thermoresistenztest noch Werte membranintakter Spermien zwischen 41,1 % und 65,7 % und liegen damit innerhalb der in der Literatur angegebenen Varianz, welche direkt nach dem Auftauen ermittelt wurde.

5.2.1.1 Einfluss des eingesetzten Verdünnerverfahrens

Obwohl die nativen Ausgangswerte der Ejakulate unterschiedlich waren, ließen sich die spermatologischen Werte der vier Behandlungsgruppen miteinander vergleichen. Das galt nicht für die absoluten Zahlen des jeweiligen Tieres, sondern für die erkennbare Tendenz der einzelnen Behandlungsgruppen über die Dauer des Thermoresistenztests der einzelnen Bullen. In der Literatur werden qualitative Einbußen der Spermien durch die Kryokonservierung von bis zu 50 % beschrieben (CURRY, 2000). Die tatsächliche Reduktion der untersuchten Parameter Motilität, Membranintegrität und Morphologie lag bei beiden untersuchten Bullen über die Dauer des Thermoresistenztests weit unter 50 %. Ein möglicher Grund des positiven Einflusses auf die Auftauergebnisse der Behandlungsgruppen ist das verwendete Verdünnerverfahren. Das Tiefgefrierverfahren **Sexcess**[®] ist für die Konservierung sortierter Spermien entwickelt worden (KLINC, 2005), wurde im Versuchsteil I jedoch auch für die unsortierten Behandlungsgruppen angewandt. Bereits 2012 wurden kleine Zellmengen ($3,5 \times 10^6$ und 15×10^6 Spermien) unsortierter Spermien mit **Sexcess**[®] im 250 µl Straw kryokonserviert. Die Trächtigkeitsraten der beiden Spermienkonzentrationen unterschieden sich nur marginal (76,9 % zu 77,3 %) (MÖNCH-TEGEDER, 2012). Die Motilitäts- und Membranintegritätswerte der unsortierten Straws mit $3,5 \times 10^6$ Spermien sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Tube-Pellet-Varianten dieser Arbeit, vor allem mit denen von Bulle A.

Sexcess[®] enthält u.a. Antioxidantien, die zu einer Steigerung der Lebensfähigkeit der Spermien führen (KLINC und RATH, 2007). Dabei ist der **positive Effekt der Antioxidantien** auf eine Reduktion der schädigenden Einflüsse durch reaktive Sauerstoffspezies zurückzuführen (FOOTE et al., 1993). Eine hohe Verdünnung der Besamungsportion

sowie die Sortierung können zu einem oxidativem Stress der Spermien führen (KLINC und RATH, 2007). Mit Zugabe des Verdünnermediums reduziert man den Seminalplasmaanteil, der die Spermien umgibt. Das Seminalplasma ist insbesondere nach der Passage der Spermien durch den Spermiensorter nicht mehr in der Lage, kompensatorisch zu wirken (MAXWELL und JOHNSON, 1999). Es kann zu einer Lipidperoxidation der Spermienmembran kommen (PARKS und GRAHAM, 1992). Die zugesetzten Antioxidantien können als Antagonisten wirken und die stark verdünnten Spermien vor den reaktiven Sauerstoffspezies und der Oxidation schützen (BUCAK et al., 2010). Der Einsatz des Gefrierverdünners Sexcess[®] erschwert den Vergleich der Ergebnisse mit anderen Arbeiten. Hier wird meist auf konventionelle Fertigverdünner - wie Triladyl[®] oder Laiciphos[®] - zurückgegriffen, die keine Antioxidantien enthalten.

Es ist festzuhalten, dass es nur zu einer geringen Reduktion der untersuchten Qualitätsparameter nach dem Auftauen gekommen ist. Die Auftauwerte zur Stunde 0 zeigten die potentiell positive Wirkung des Tiefgefrierfahrens Sexcess[®]. Der Verdünner ist in der Lage die Einfrierverluste eines Nativejakulats mit guten Ausgangswerten, wie von Bulle A, aber auch die eines vermeintlich schlechten Nativejakulats, wie von Bulle B, über die Dauer der Kryokonservierung und den anschließenden Thermoresistenztest sehr gering zu halten (KLINC, 2005; MÖNCH-TEGEDER, 2012). Vergleicht man die Auftauergebnisse des Bullen B mit Studien, die sich an einen Mindestwert der nativen Gesamtbeweglichkeit von ≥ 70 % orientiert haben (DEN DAAS et al., 1998; LICHTNER, 2010; STROTHMEYER, 2013), so wird ersichtlich, dass die Werte mit den Ergebnissen der Studien vergleichbar waren. Bei LICHTNER (2010) schwankten die nativen Motilitätswerte der Jungbullen zwischen 71,3 % und 78,3 %. Nach dem Auftauen lagen sie bei 37,5 % bis 55 %. Bei der Untersuchung von zehn Jungbullen lag der Nativwert bei 80,52 % Gesamtmotilität. Nach dem Auftauen im vierstündigen Thermoresistenztest lag die Motilität bei 44,1 %. Als Gefrierverdünnung wurde Triladyl[®] eingesetzt (OSMERS und HERMANN, 2017). Das wesentlich schlechtere Ausgangsejakulat des Bullen B erreichte vorliegend durch den Einsatz des Sexcess[®]-Verdünners nach dem Auftauen einen vergleichbaren Motilitätswert von $54,9 \pm 6,2$ % zur Stunde 0. Zur Stunde 3 im Thermoresistenztest konnte der Wert wesentlich stabiler gehalten werden ($50,4 \pm 6,5$ %).

5.2.1.2 Vergleich der unsortierten Minimalvolumina

Die Ergebnisse des Versuchsteils I konnten zeigen, dass das Tube-Pellet für die Kryokonservierung von Minimalvolumina und stark reduzierten Spermienzahlen in Frage kommt. Die untersuchten Behandlungsgruppen in Minimalvolumen als **Nano** sowie **30TP** und **50TP** unterschieden sich nicht signifikant untereinander. Es kam im Laufe des Thermoresistenztests allerdings zu signifikanten Unterschieden ($P \leq 0,05$) zwischen dem eingesetzten Straw und dem Nano. Diese Unterschiede - sowohl bei der Motilität, der Membranintegrität und der Morphologie - wurden bereits von STROTHMEYER (2013) beobachtet. Daher wurde für den weiteren Versuchsablauf auf den Nanostraw verzichtet. Weitere Gründe für die Abkehr vom Nanostraw sind seine komplizierte Produktion und die sensitive Handhabung (STROTHMEYER, 2013). Bei den untersuchten Tube-Pellet-Varianten kommt es nicht zu diesen signifikanten Unterschieden verglichen mit der Kontrolle. Mögliche Ursache für diesen positiven Effekt kann die adaptierte Konfektionierung für Pellets im Tube sein. Die Tube-Pellets scheinen weniger anfällig gegenüber Temperaturschwankungen zu sein.

Das **Tube-Pellet** ist ein - im Verhältnis zum eingesetzten Volumen - großes Verpackungssystem. Es kann ohne Zuhilfenahme von Ultraschall oder Ähnlichem verschlossen werden und ist somit keinen externen Störfaktoren ausgesetzt. Die Produktion des **Nanostraws** ist bislang nicht automatisierbar, es muss mit Gerätschaften, die dafür nicht ausgelegt sind, hergestellt werden. Die Samensuspension befindet sich beim Nanostraw in einem festverschlossenen Katheter der keinerlei Ausdehnung zulässt - so sind durch die Kryokonservierung bedingte Schädigungen beispielsweise durch Eiskristallbildung wahrscheinlich (COURTENS und PAQUIGNON, 1985). Die Spermiesuspension im Tube-Pellet hat hingegen ausreichend Raum, um sich während der Kryokonservierung auf veränderte Temperaturen einstellen zu können. Durch das niedrige Flüssigkeitsvolumen und einem veränderten Oberflächenverhältnis kommt es im Nanostraw schnell zu enormen Temperaturschwankungen, die sich nach dem Auftauen durch eine Hyperaktivierung der Spermien und einer verfrühten Kapazitation darstellen (STROTHMEYER, 2013). Die Kryokonservierung in Kugelform könnte eine Alternative darstellen. Die Kugel stellt physikalisch gesehen die kleinste Oberfläche dar. Bei einer ausgeglichenen Spannungsverteilung kommt es zu einem gleichmäßigen und schnellen Einfrieren von außen nach innen (KRÖNER, 1958). Es besteht ein optimales Verhältnis

zwischen Oberfläche und Volumen (BUCHMÜLLER und WEYERMANN, 1992). Durch die Verpackung als Tube-Pellet, den Schraubverschluss und einer Fixierung auf einer Lochplatte kann gänzlich auf einen Handkontakt verzichtet und die Produktion automatisiert werden. Allerdings waren die Auftauergebnisse des 30TP verglichen mit denen des 50TP besser. Dies kann damit begründet werden, dass das Einfrieren einer kleinen Kugelform schneller vonstattengeht. Ein Volumen von 50 µl scheint einen veränderten Kristallisationspunkt zu haben. Während der äußere Rand des 50TP bereits gefroren ist, können die Spermien im Inneren der Kugel noch im flüssigen Medium verweilen und unter Umständen einem Kälteschock unterliegen oder durch intra- oder extrazelluläre Eiskristallbildung Membranschäden erleiden (MAZUR, 1963; WATSON et al., 1981). Interessant wäre eine Temperaturlaufzeichnung innerhalb der Pellets während der Kryokonservierung. Diese müsste allerdings kontaktfrei erfolgen, was bei den geringen Volumina technisch sehr aufwendig wäre und deshalb in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt wurde.

Das Auftauverfahren der Tube-Pellets wurde an das Verfahren des Kontrollstraws angelehnt. Zukünftig gilt es, das Design des Tube-Deckels zu optimieren, da sich im Deckel der Tube-Pellets Wasser ansammeln kann. Dies führt bei unsachgemäßer Öffnung zu einem Wassereintritt in das Innere. Der Wassereintritt in die präzise verdünnte Spermien suspension kann zu einer osmolaren Veränderung der Spermienumgebung führen, was unter anderem morphologische Schädigungen hervorrufen kann und als hyperosmolarer Schock bezeichnet wird. Diese plötzliche Veränderung von einer hypertonen in eine isotonische Umgebungen kann zu irreversiblen Schädigungen der Spermien führen (GAO et al., 1993; HOLT und NORTH, 1994; GRÖPPER, 2004). STROTHMEYER (2013) beobachtete morphologische Veränderungen (Schleifenform am Spermischwanz) der Spermien aus dem Nanostraw und führte dies auf einen nicht vollständigen Verschluss der Nanostraws zurück. Durch den gummierten Schraubverschluss des Tube-Pellets scheint ein Wasser-, Luft- oder Stickstoffeintritt während des Kryokonservierungsprozesses nicht stattzufinden. Die Ergebnisse der morphologischen Auswertung bekräftigen diese Theorie.

Die Idee der Tube-Pellets war darauf ausgelegt, möglichst viele Schritte der Herstellung automatisieren zu können. Weiterhin sollten dieselben Gerätschaften und dasselbe Einfrierregime wie bei der Straw-Produktion verwendet werden können. Dies würde die Investitionskosten für Besamungsstationen gering halten. STROTHMEYER (2013) stellte

in ihrer Studie fest, dass Besamungsportionen, welche in kleinem Volumen und einer niedrigen Spermiengesamtzahl kryokonserviert werden, sensitiv auf Temperaturschwankungen reagieren. Die Tube-Pellets könnten in einer temperierten und von externen Einflüssen abgeschotteten Produktionsstraße hergestellt werden. Durch ein Schleusensystem könnten die auf Racks fixierten Tube-Pellets zwischen den benötigten Temperaturbereichen bewegt und mit Hilfe einer entsprechend programmierten Gefriersoftware kryokonserviert werden. So könnte ohne Temperaturschwankungen eine gleichmäßige und die Spermienvitalität erhaltende Kühl- und Einfrierkurve gefahren werden. Das geschlossene System erlaubt sensitives und reproduzierbares Arbeiten.

5.2.1.3 Identifizierung und Kennzeichnung der Tube-Pellet-Varianten

Die Kryokonservierung in Pelletform für Bullenspermien wurde Ende der 1960iger Jahre nicht weiter fortgeführt (PIASECKA-SERAFIN et al., 1967). Hauptargumente waren eine fehlende Möglichkeit der Identifizierung der einzelnen Besamungsportionen und eine mögliche Kontamination durch bakterielle Keimübertragung zwischen den im Stickstoffcontainer lose gelagerten Spermapellets (LEIPNITZ, 1967; HAWKINS et al., 1996). Das für diese Arbeit entwickelte Tube-Pellet löst sowohl das Problem der fehlenden Identifizierbarkeit als auch das einer möglichen Kontamination, da die Tube-Pellets in einem verschließbaren Gefäß einzeln gelagert sind. Für den Vertrieb von Besamungsportionen ist eine Kennzeichnung für den europa- bzw. weltweiten Einsatz zwingend erforderlich. Der aufgedruckte QRTM-Code auf dem Boden jedes einzelnen Tube-Pellets erfüllt die gesetzlichen Vorgaben, wie zum Beispiel die individuelle Identifizierbarkeit des Besamungsbullen, das Gewinnungsdatum oder die Besamungsstation und bietet weiterhin die Möglichkeit das Bedrucken der Konfektionierung auszulagern. Durch die Tubes sind die Pellets separiert auf der fixierenden Lochplatte lagerfähig und können dem Stickstoffcontainer einzeln entnommen werden. Der benötigte Lagercontainer sollte für die Entnahme der Tube-Pellets adaptiert werden, um Temperaturschwankungen ausschließen zu können. Ein Kassettensystem, in dem in jeder einzelnen Kassette ein Fixierack mit Tube-Pellets eingelagert werden kann, wäre eine Möglichkeit wie sie z.B. auch in Zellbanken Verwendung findet.

5.2.2 Versuchsteil II

Der **Versuchsteils II** diene der Klärung, ob das Einfrieren von geschlechtsspezifisch differenzierten Bullenspermien mittels Tube-Pellets möglich ist. Im Thermoresistenztest wurde die Langlebigkeit und Belastbarkeit der sortierten Spermien überprüft. Als Substitut für die Niedrigdosierung im Nanostraw wurde das 60 µl Tube-Pellet eingesetzt. Der Einsatz von 250 µl Besamungsportionen mit wenigen Spermien findet bereits in der Praxis statt (RATH, 2016). Es wird weiterhin auf die bewährte Konservierung im Straw und den Einsatz bekannter Besamungstechnik gesetzt. Durch den daraus resultierenden Verdünnungseffekt könnten die Spermien wertvoller Jungbullen zusätzlich geschädigt werden. Eine Adaption der Besamungskonfektionierung erscheint daher logisch, möchte man die Spermienqualität und das Fertilitätspotential nach dem Auftauen aufrechterhalten.

Der Versuchsteil II konnte zeigen, dass die Auftauergebnisse der beiden untersuchten Minimalvolumina im Tube-Pellet qualitativ mit dem Sort-Straw vergleichbar sind. Zwischen der unsortierten Kontrolle und den drei sortiert eingefrorenen Behandlungsgruppen kam es zu teils signifikanten ($P \leq 0,05$) Unterschieden. Die ermittelten Ergebnisse sind jedoch nur bedingt aussagekräftig, da der unsortierte Kontrollstraw wesentlich mehr Spermien enthielt und nicht den strapaziösen Sortierprozess durchlief. Allerdings lassen die Ergebnisse des unsortierten Kontrollstraws und des sortierten Sort-Straws den direkten Vergleich zu, inwieweit sich die Spermien der eingesetzten Bullen konventionell und sortiert kryokonservieren ließen. Der Sort-Straw enthielt $3,5 \times 10^6$ Spermien und demnach fast viermal weniger Spermien als in der unsortierten Kontrolle. Zwar führen reduzierte Spermienzahlen in sortierten Besamungsportionen nicht zwangsläufig zu reduzierten Trächtigkeitsraten (BALLESTER et al., 2007), es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Sortierprozess zu einer Reduktion der Spermiovitalität unabhängig von der verwendeten Konfektionierungsform führen kann (DEJARNETTE et al., 2011). Interessant sind hier vor allem die erhobenen Richtwerte für die **Motilität** nach dem Auftauen für geschlechtsspezifisch differenzierte Spermien (RATH et al., 2009). Bulle A erfüllt die Richtwerte bei allen Behandlungsgruppen. Vergleicht man die Motilitätswerte zur Stunde 0 nach dem Auftauen mit dem nativen Ausgangswert von Bulle A, so wird ersichtlich, dass alle vier Behandlungsgruppen eine höhere Motilität erzielten. Fraglich ist, ob es sich um kapazitationsähnliche Prozesse der Hyperaktivierung von

Spermien handelt, oder ob die verwendete Sortiertechnik in der Lage ist, qualitativ hochwertige bzw. membranintakte von bereits geschädigten Spermien zu unterscheiden. Einige Studien berichten von verbesserten Motilitätswerten geschlechtsspezifisch differenzierter und kryokonservierter Besamungsportionen. Die verbesserten Motilitätswerte wurden dabei über 12 Stunden bei 37 °C beobachtet, weshalb eine temporäre Hyperaktivierung durch Kapazitationseffekte eher unwahrscheinlich ist (KLINC, 2005; MÖNCH-TEGEDER, 2012). Der eingesetzte **Bulle A** im Versuchsteil II entsprach dem Bullen A aus dem Versuchsteil I. Zu Beginn des Versuchsteils I war der eingesetzte Bulle A 13 Monate alt. Zu Beginn des Versuchsteils II war das Tier hingegen älter als 2 Jahre (32,5 Monate) (siehe Tabelle 6). Ein Vergleich der Motilität, der Membranintegrität und der Morphologie des Tieres aus beiden Versuchsteilen lässt erkennen, dass sich die Werte im Versuchsteil II verbessert haben. Es lassen sich jedoch nur die jeweils untersuchten Kontrollstraws direkt miteinander vergleichen, da hier sowohl derselbe Gefrierverdünner als auch dasselbe Einfrierverfahren verwendet wurde.

In einer Studie wurde die Entwicklung der Ejakulatparameter im Verhältnis zur Lebensdauer des Bullen (3, 5 und 7 Jahre) untersucht. Es wurde festgestellt, dass es während der Entwicklung bis zum Alter von sieben Jahren zu einer signifikanten ($P \leq 0,05$) Verbesserung der Gesamtmotilität, der Membranintegrität und der Morphologie kam (HALLAP et al., 2006). Da hier lediglich ein Bulle beobachtet wurde, besitzen die Daten keinen statistischen Wert – diese Auffälligkeit sollte bei einer größeren Bullengruppe über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

Bulle C erfüllt die Richtwerte zur Stunde 0 mit allen Behandlungsgruppen, zur Stunde 6 allerdings nicht mit dem Sort-Straw und dem 60 µl Tube-Pellet. **Bulle D** erfüllt sie ebenfalls zur Stunde 0. Das 60 µl Tube-Pellet zur Stunde 6 erreichte weniger als 30 % Gesamtmotilität. Weiterhin gibt es signifikante ($P \leq 0,05$) Motilitätsunterschiede zwischen der eingesetzten Kontrolle gegenüber dem Sort-Straw und den 30 µl und 60 µl Tube-Pellet-Varianten. Eine reduzierte Motilität ist vor allem bei sortierten Spermien bekannt und wird nicht mit den reduzierten Spermienzahlen, sondern durch den strapaziösen Sortierprozess begründet (DEJARNETTE et al., 2011). Da sowohl die unsortierten als auch die sortierten Behandlungsgruppen mit demselben Gefrierverdünner verarbeitet und die sortierten Behandlungsgruppen mit demselben Einfrierprogramm kryokonserviert wurden, liegt die reduzierte Motilität in diesem Fall wahrscheinlich am Sortierprozess und nicht an der Verwendung einer an niedrige Volumina adaptierten Konfektio-

nierung. Es gibt sowohl bei Jung- als auch bei Altbullen Tiere, die schlechter bzw. besser sortierfähig und einfrierbar sind (KATHIRAVAN et al., 2011; STROTHMEYER, 2013), weshalb das Alter der Bullen C und D beachtet werden muss. Setzt man die im Thermoresistenztest ermittelten Ergebnisse zueinander in Relation, so fällt auf, dass Bulle C (18 Monate) in Versuchsteil II einen wesentlich höheren Abfall der Werte über die Dauer des Thermoresistenztests im Vergleich zu Bulle A (32,5 Monate) aufweist. Vergleicht man die Motilitätswerte des Sort-Straws zur Stunde 0 miteinander, so beträgt der Unterschied zwischen beiden Tieren bereits 17,8 % (Bulle A: $79,4 \pm 6,4$ %; Bulle C: $61,6 \pm 6,1$ %). Der post Sort Wert beider Tiere unterschied sich aber nur um 3,3 %. Diese Unterschiede spiegeln sich bei allen drei untersuchten Messgrößen wider. Folglich kann spekuliert werden, dass die Spermien eines Bullen mit einem Alter von unter zwei Jahren eine schlechtere Einfrierbarkeit von sortierten Spermien aufweisen, verglichen mit einem Tier, welches älter als zwei Jahre ist. Dies müsste an einer großen Bullenpopulation überprüft werden.

Bulle D war zum Versuchszeitpunkt 13 Monate alt. In den Werten der Motilität und Membranintegrität war er mit dem 18 Monate alten Bullen C vergleichbar. Allerdings waren die untersuchten Morphologieparameter auffallend schlechter. Der Anteil morphologisch intakter Spermien scheint also mit dem Alter der untersuchten Tiere anzusteigen – dies würde sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten decken (OSMERS und HERMANN, 2017). Die Ejakulatparameter sollen sich während des Alterungsprozesses qualitativ verbessern und weiterentwickeln (LICHTNER, 2010). Hier wäre es von besonderem Interesse die Seminalplasmabestandteile von Alt- und Jungbullen zu entschlüsseln, um bei offensichtlichen Differenzen, gegebenenfalls durch Zusätze zu den Gefrierverdünnern, die fehlenden Seminalplasmabestandteile eines Jungbullen supplementieren zu können und dadurch die Auftauqualität weiter zu verbessern. Diese Hypothese bekräftigt die Idee dieser Arbeit, eine an die verminderten Ejakulatvolumina und reduzierten Spermiengesamtzahlen adaptierte Konfektionierung für Jungbullen und sortierte Spermien zu entwickeln.

Ein Vergleich der erzielten Werte für die **Membranintegrität** ist auch hier auf Grund der unterschiedlichen Messverfahren nicht möglich. Der Abgleich der erzielten Ergebnisse des Bullen A mit den Werten der Membranintegrität des Nanostraws aus der Studie von STROTHMEYER (2013) zeigt, dass sowohl der Sort-Straw als auch das 30 µl Tube-Pellet den Werten des Nanostraws überlegen sind. Die ermittelten Werte des 60 µl

Tube-Pellets sind vergleichbar mit den Werten des Nanostraws. Auch die Werte der Bullen C und D sind mit dem Niveau des Nanostraws aus der Arbeit von STROTHMEYER (2013) vergleichbar. Die ermittelten Werte der Membranintegrität nach dem Auftauen liegen bei anderen Studien zur Stunde 0 durchschnittlich zwischen 40 – 65 % (MUINO et al., 2007; GRIGA, 2010). Den Untersuchungen angeschlossen waren Besamungsversuche, bei denen akzeptable Trächtigkeitsraten von ca. 64 % erzielt wurden.

Die **gesamtmorphologischen Veränderungen** für aufgetaute und sortierte Spermien sollen weniger als 20 % betragen (RATH et al., 2009). Der eingesetzte Bulle D erreichte diesen Wert nicht. Ein Grund dafür kann das Alter des Versuchstieres sein. In einer Untersuchung von OSMERS und HERMANN (2017) wurde festgestellt, dass der Anteil morphologisch veränderter Spermien vor und nach dem Einfrieren bei Bullen zwischen 10 und 14 Monaten auffallend hoch ist. Zudem besagen verschiedene Studien, dass es durch den Alterungsprozess zu einer morphologisch stabileren Spermienproduktion kommen kann (AMANN und ALMQUIST, 1976; OSMERS und HERMANN, 2017). Unterschiedliche Studien haben außerdem einen signifikanten ($P \leq 0,05$) Zusammenhang zwischen der Einfrierbarkeit von geringen Spermienkonzentrationen und des eingesetzten Bullens festgestellt (STROTHMEYER, 2013; BISWAS et al., 2016). Die ermittelten Werte der Membranintegrität und der Morphologie der Bullen C und D könnten als weiterer Faktor neben ihrem Altern (18 und 13 Monate) eine Tendenz erkennen lassen, dass die Tiere sowohl den Sortierprozess als auch das Einfrieren kleiner Zellmengen nur bedingt tolerieren. Neben einem reduzierten Ejakulatvolumen und reduzierten Spermienkonzentrationen scheinen Jungbullen bis zu einem Alter von 14 Monaten somit einen erhöhten Anteil an morphologisch veränderten Spermien zu besitzen, was zu einem verringerten Fertilitätspotential führen kann (PHILLIPS et al., 2004).

5.2.2.1 Vergleich der sortierten Minimalvolumina

Im Laufe der zwei Versuchsteile konnte vor allem das unsortierte und sortierte 30 μl Tube-Pellet mit einer Spermiengesamtzahl von 1×10^6 pro Tube überzeugen. Offensichtlich scheint es ein optimales Verhältnis zwischen Spermienanzahl und Verdünnervolumen zu besitzen. Das 30 μl Tube-Pellet konnte sich gegenüber der 60 μl Tube-Pellet-Variante durch bessere Auftauergebnisse auszeichnen. Abgesehen von vereinzelten signifikanten Unterschieden ($P \leq 0,05$) zwischen dem 30 μl Tube-Pellet und dem eingesetz-

ten Kontrollstraw, gab es generell sowohl bei der Nutzung unterschiedlicher Bullen als auch in Betrachtung der Messzeitpunkte keine signifikanten Unterschiede zwischen der eingesetzten minimalisierten Besamungsportion und dem Kontrollstraw. Die Ergebnisse des sortierten 30 µl Tube-Pellet sind mit dem Sort-Straw vergleichbar und diesem teilweise sogar überlegen ($P \leq 0,05$). Der Sort-Straw entspricht der aktuellen Konservierungstechnik für sortierte Besamungsportionen. Dabei muss der eingesetzte Sort-Straw speziell befüllt werden, um Verluste der sortierten Spermien zu reduzieren. Der filigrane Befüllvorgang ist allerdings bereits automatisiert. Dieser sensitive Arbeitsschritt entfällt bei dem Tube-Pellet-Verfahren. Die sortierten Spermien können direkt in das Tube pipettiert werden. Die Konfektionierung im Tube bietet somit für sortierte Spermien einen Vorteil gegenüber der etablierten Technik.

Die Arbeit mit Tube-Pellets ist als Grundlagenforschung zu verstehen. Mit den Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sowohl Jung- als auch Altbullen mit Hilfe der Tube-Pellets und des Tiefgefrierverfahrens Sexcess[®] eine kontinuierlich hohe Vitalität nach dem Auftauen in vitro erzielen. Die Laborergebnisse sollten durch einen großangelegten Besamungsversuch verifiziert werden.

5.3 Mögliche Einsatzgebiete der niedrigdosierten Besamungsportionen

Das Tube-Pellet ist ein Lösungsansatz für die optimale Nutzung von Jungbullenejakulaten bei denen man das Fertilitätspotential nach dem Auftauen aufrechterhalten möchte. Die Sortierung von Spermien ist ein sehr zeitintensives und langsames Verfahren, das mit hohen Materialkosten bei gleichzeitig relativ niedriger Spermienausbeute einhergeht (BORO et al., 2016). Dies macht die Tube-Pellets für die Kryokonservierung von geschlechtsspezifisch differenzierten Spermien interessant. Weiterhin kombiniert das Tube-Pellet den Vorteil einer Frischsamenportion (niedrige Spermienzahl) mit der langen Lager- und Transportfähigkeit von kryokonservierten Besamungsportionen. Der Einsatz des Tube-Pellets ermöglicht eine Erhöhung der Anzahl von Besamungsportionen pro Ejakulat bei gleichzeitiger Reduktion der benötigten Spermiengesamtzahl.

Aktuell fehlt für das Tube-Pellet eine **adaptierte Besamungstechnik**. Der konventionelle Straw mit der dazugehörigen Besamungspistole ist ein Verfahren, welches weltweit ohne Elektronik, leicht erlern- und einsetzbar ist. Die Technik funktioniert manuell und ist bei adäquater Schulung des Personals eine simple Methode zur erfolgreichen

Besamung. Die **Besamungstechnik SIFT[®]** ist komplex und kostenintensiv, und müsste an die einfache Handhabung der Tube-Pellets angepasst werden. Die Herstellung der Tube-Pellets in verschiedenen Volumina ist einfach, schnell und benötigt keine neuen Gerätschaften im Spermalabor einer Besamungsstation. Das Lesen des QR[™]-Codes zur Identifizierung der Besamungsportion erfolgt zügig per Smartphone. Das 30 µl Tube-Pellet kann durch sein Volumen mit SIFT[®] kombiniert werden. Hierfür wäre eine Modifikation notwendig, bei der man sich den Schraubverschluss zunutze machen könnte. Per Adapter, den man auf das Tube-Pellet schraubt und es damit luftdicht an die SIFT[®]-Technik anschließt, könnte die Suspension in den Besamungskatheter aufgesogen und versamt werden.

Eine Aussage über die **Fertilität der Tube-Pellets** ist aktuell nicht möglich. Das Befruchtungspotential des Nanostraws in Kombination mit der Besamungstechnik SIFT[®] konnte bereits nachgewiesen werden (STROTHMEYER, 2013). Die In-vitro-Auftauergebnisse des 30 µl Tube-Pellet sind mit dem 20 µl Nanostraw vergleichbar. Somit wäre eine weitergehende Überprüfung des Fertilitätspotentials von großem Interesse für das Forschungsgebiet der niedrigdosierten Besamungstechnik. Es wird vermutet, dass eine intratubale Besamung und damit eine Verkürzung des durch die Spermien zurückzulegenden Weges zu besseren Befruchtungsergebnissen führen kann (Holt, 2000a). Diese Theorie wurde sowohl von GROßFELD ET AL. (2011A) als auch STROTHMEYER (2013) bestätigt.

Gelingt es die offenen Fragestellungen der zu verwendenden Besamungstechnik zu eruieren, so stellt die minimaldosierte Besamungsportion in Form eines Tube-Pellets eine potentielle Alternative zur herkömmlichen Besamungstechnik für die optimale Nutzung von Jungbullen und die Kryokonservierung geschlechtsspezifisch sortierter Spermien dar.

6 Zusammenfassung

Seit Einführung der genomischen Selektion arbeiten Besamungsstationen mit genomisch wertvollen Jungbullen ab einem Alter von 10 Monaten im regelmäßigen Sprungeinsatz (MELBAUM et al., 2016). Jungbullen haben ein reduziertes Ejakulatvolumen mit einer niedrigeren Spermienkonzentration im Vergleich zu einem Altbullen (WEITZE, 2001). Ungeachtet der steigenden Nachfrage ist die Herstellung von geschlechtsspezifisch differenzierten Besamungsportionen trotz technischer Innovationen weiterhin zeitintensiv und kostspielig (SEIDEL, 2007). Um die Nachfrage nach Jungbullen der Spitzengenetik und gesexten Besamungsportionen befriedigen zu können, muss entweder mit einer höheren Tierzahl gearbeitet oder die Spermienanzahl in der einzelnen Besamungsportion reduziert werden.

Folglich war das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung eines praxistauglichen Verpackungssystems, welches es ermöglicht unsortierte und geschlechtsspezifisch differenzierte Spermien in niedrigen Volumina von 20-60 µl als einzeln identifizierbare und lagerfähige Besamungsportionen einzufrieren. Die Minimalvolumina sollten dabei die qualitativen Anforderungen der konventionellen Einfriertechnik im 250 µl Straw nach dem Auftauen erfüllen. Die Qualität der Besamungsportionen wurde im Labor mittels Thermoresistenztest überprüft.

Die Arbeit war in zwei Versuchsteile gegliedert, wobei für alle Versuchsteile eine unsortierte konventionelle Besamungsportion mit 15×10^6 Spermien pro Straw als Kontrolle diente. Im **Versuchsteil I** wurden drei verschiedene unsortierte Minimalvolumina (20 µl Nanostraw mit 66×10^5 , 30 µl Tube-Pellet mit 1×10^6 und 50 µl Tube-Pellet mit $1,66 \times 10^6$ Spermien) auf ihre Einfriertauglichkeit hin untersucht, wobei nativ und nach dem Auftauen die spermatologischen Untersuchungsparameter Motilität (CASA), Membranintegrität (SYBR[®]14 /PI-Färbung) und Morphologie (Phasenkontrastmikroskop) ermittelt wurden. Es wurden zwei Jungbullen getestet. Im **Versuchsteil II** wurden zwei sortierte Minimalvolumina (30 µl Tube-Pellet mit 1×10^6 und 60 µl Tube-Pellet mit 2×10^6 Spermien) von einem Alt- und zwei Jungbullen untersucht, bei denen der Sort-Straw (160 µl mit $3,3 \times 10^6$ Spermien) als Kontrolle für die Einfrierbarkeit sortierter Spermien fungierte. Zusätzlich wurde der „post Sort“ Wert ermittelt. Alle Behandlungsgruppen der Versuchsteile I und II wurden mit dem zweiphasigen Tiefgefriermedium Sexcess[®] (Masterrind, Verden, Deutschland) verdünnt.

Versuchsteil I: Bulle A erfüllte die Mindestanforderungen nach dem Auftauen (RATH et al., 2009) mit allen Behandlungsgruppen zur Stunde 0 und 6. Über den gesamten Messzeitraum gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle, dem 50 µl Tube-Pellet und dem 30 µl Tube-Pellet. Bulle B hatte die wesentlich schlechteren Ausgangswerte in den nativen Ejakulaten, erfüllte aber auch die Mindestanforderungen der Motilität nach dem Auftauen mit allen Behandlungsgruppen. Bei der Membranintegrität und der Morphologie lag er unter den Mindestanforderungen, im Vergleich zu anderen Studien jedoch in einem vergleichbar akzeptablen Rahmen (SEHNER, 2005).

Versuchsteil II: Der Wert des gesexten Spermias direkt nach dem Sortierprozess (post-Sort Wert) von Bulle A war signifikant ($P \leq 0,05$) höher, als die Nativprobe. Über die Messdauer des Thermoresistenztests kam es zu keinen signifikanten Motilitätsunterschieden zwischen dem Kontrollstraw, dem Sort-Straw und dem 30 µl Tube-Pellet. Die Proben des Bullen C ließen sich sortiert weniger gut einfrieren - der unsortierte Kontrollstraw war den sortierten Behandlungsgruppen zur Stunde 3 (Ausnahme war das 30 µl Tube-Pellet) und 6 überlegen ($P \leq 0,05$). Bei der Membranintegrität unterschieden sich der Kontrollstraw, der Sort-Straw und das 30 µl Tube-Pellet über den gesamten Messzeitraum der Membranintegrität nicht signifikant voneinander. Bulle C hatte zur Stunde 0 und 3 keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Kontrollstraw, dem Sort-Straw und dem 30 µl Tube-Pellet. Die Werte der morphologisch intakten Spermien beider Bullen entsprachen den Mindestanforderungen. Die ermittelten Motilitätswerte des Bullen D waren im Kontrollstraw und 30 µl Tube-Pellet zur Stunde 0 besser ($P \leq 0,05$) als das 60 µl Tube-Pellet und zu den Stunden 3 und 6 signifikant besser ($P \leq 0,05$) als der Sort-Straw und das 60 µl Tube-Pellet. Bei der Membranintegrität war der Kontrollstraw zwar dem Sort-Straw und den beiden sortierten Minimalvolumina zu allen Messzeitpunkten statistisch überlegen ($P \leq 0,05$), allerdings bestand kein statistischer Unterschied zwischen dem Sort-Straw und dem 30 µl Tube-Pellet. Bei der Morphologie gab es zu den drei Messzeitpunkten des Thermoresistenztests keine statistischen Unterschiede zwischen dem Kontrollstraw, dem Sort-Straw und dem 30 µl Tube-Pellet.

Durch die genomische Selektion und der kontinuierlichen Nachfragesteigerung nach geschlechtsspezifisch differenzierten Besamungsportionen genetisch wertvoller Tiere, besteht ein Interesse daran, die Spermienanzahl in der Besamungsportion zu reduzieren (DEN DAAS et al., 1998). Vor allem mit dem 30 µl Tube-Pellet konnte gezeigt werden,

dass bovine Spermien in kleinen Volumina kryokonserviert und mit hoher Vitalität aufgetaut werden können. Abgesehen von dem 60 µl Tube-Pellet, welches für die Kryokonservierung von gesorteten Spermien eingesetzt wurde, haben die untersuchten Minimalvolumina der sortierten und unsortierten 30 µl Tube-Pellets, der unsortierten 20 µl Nanostraws und des unsortierten 50 µl Tube-Pellets ihre Einfriertauglichkeit unter Beweis gestellt.

7 Summary

Since the introduction of the genomic selection, insemination centers are function with genomically proofed young bulls at the age of 10 months onwards (MELBAUM et al., 2016). Young bulls have a reduced ejaculate volume with a lower sperm number compared to older bulls (WEITZE, 2001). Despite the growing demand on sexed sorted semen, it is still a time-intensive and costly technique (SEIDEL, 2007). In order to be able to comply the demand for insemination doses of young bulls with high genomically potential and for sexed sorted semen - either a higher number of animals must be used or the number of sperm in the individual seizure portion should be reduced.

The aim of this work was the development of a practical packaging system, which allows the freezing of unsorted and sorted sperm in low volumes of 20-60 μl as individually identifiable and storable insemination portions. The minimum volumes should achieve the qualitative requirements of the conventional freezing technique in 250 μl straws after thawing. The quality of the insemination doses was checked in the laboratory by performing a thermo-tolerance-test.

The work was divided into two parts. An unsorted 250 μl Straw with 15×10^6 sperm served as a control for all experimental parts. In **experiment I**, three different unsorted minimum volumes (20 μl Nanostraw with 66×10^5 , 30 μl Tube Pellet with 1×10^6 and 50 μl Tube Pellet with $1,66 \times 10^6$ sperm) were examined for their deep freezing capacity. The spermatological parameters motility (CASA), membrane integrity (SYBR[®]14 / PI staining) and morphology (phase contrast microscopy) were tested native and after thawing. Two young bulls were tested. In the **experimental part II**, two sorted minimum volumes (30 μl Tube-Pellet with 1×10^6 and 60 μl Tube-Pellet with 2×10^6 sperm) were examined for one old and two young bulls. The sorted straw (160 μl with $3,3 \times 10^6$ sperm) served as a control for the freezeability of sorted sperm of the used bulls. In addition, the post-sort value was determined. All treatment groups of booth experimental parts were diluted with the two-phase freezing medium Sexcess[®] (Masterrind, Verden, Germany).

Experiment I: Bull A achieved the minimum thawing requirements (RATH et al., 2009) with all treatment groups at 0 h and 6 h. Over the entire measurement period there were no significant differences between the control, the 50 μl Tube-Pellet and the 30 μl Tube-

Pellet. Bull B had lower initial semen quality values, but also fulfilled the minimum requirements of the motility after thawing with all treatment groups. In the case of membrane integrity and morphology, it was below the minimum requirements, but compared to other studies in a comparable acceptable framework (SEHNER, 2005).

Experiment II: The value of the sexed sorted sperm immediately after the sorting process (post-sort value) (90.4 ± 2.9 %) of bull A was significantly ($P \leq 0.05$) higher than the native sample (72.4 ± 6.2 %). During a the thermo-tolerance-test there was no significant difference in motility between the control straw, the sort-straw, and the 30 μ l Tube-Pellet. The sorted samples of bull C did not freeze well in comparison to the other bulls. The unsorted control straw was superior to the sorted treatment groups at 3 h (except for the 30 μ l Tube-Pellet) and 6 h ($P \leq 0.05$). The membrane integrity of the control straw, of the sort-straw and of the 30 μ l Tube-Pellet did not differ significantly from each other over the entire measurement period. Bull C showed no significant differences between the control straw, the sort-straw and the 30 μ l Tube-Pellet at 0 h and 3 h. The values of the morphologically intact sperm of both bulls corresponded to the minimum requirements. The motility of bull D in the control straw and the 30 μ l Tube-Pellet were significantly better ($P \leq 0.05$) than the 60 μ l Tube-Pellet at 0 h ($P \leq 0.05$). After 3 h and 6 h the control straw and the 30 μ l Tube-Pellet were significantly better ($P \leq 0,05$) compared to the sort-straw and the 60 μ l Tube-Pellet. The membrane integrity of the control straw was superior ($P \leq 0.05$) to the sort-straw and the two sorted minimum volumes at all measurement times, but there was no difference between the sort straw and the 30 μ l Tube-Pellet. Sperm morphology was not different between the control straw, the sort-straw, and the 30 μ l Tube-Pellet at the three time points of measurement.

Due to the genomic selection and a continuous increase demanding sexed sorted insemination doses of genetically valuable bulls there has always been an interest in reducing sperm numbers (Den Daas et al., 1998). In this experiment, especially the 30 μ l Tube-Pellet was proven to allow successful semen preservation in small volumes and sperm had high vitality after freezing and thawing. Apart from the 60 μ l Tube-Pellet the minimum volumes tested for the sorted and unsorted 30 μ l Tube-Pellets, the unsorted 20 μ l Nanostraws and the unsorted 50 μ l Tube-Pellets have demonstrated their freezing properties.

8 Literaturverzeichnis

- ABECASIS, G. R., GHOSH, D. & NICHOLS, T. E. 2005. Linkage disequilibrium: ancient history drives the new genetics. *Hum Hered*, 59, 118-24.
- ADR 2006a. 8.2 Empfehlungen für Anforderungen an Zuchtbullen für den Einsatz in der Künstlichen Besamung und für Deckbullen. *Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e.V.*, 8.2, 1-3.
- ADR 2006b. 8.3 Empfehlung für garantierte Qualität für Bullensperma im Handel. *Arbeitsgemeinschaft Deutscher Rinderzüchter e.V.*, 8.3, 1.
- AIRES, V. A., HINSCH, K. D., MUELLER-SCHLOESSER, F., BOGNER, K., MUELLER-SCHLOESSER, S. & HINSCH, E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60, 269-79.
- AITKEN, R. J., WHITING, S., DE IULIIS, G. N., MCCLYMONT, S., MITCHELL, L. A. & BAKER, M. A. 2012. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 287, 33048-60.
- ALKABES, S. 2015. Persönliche Mitteilung vom 12.06.2015. *Masterrind Verden GmbH*.
- ALLEN, C. H. & ALMQUIST, J. O. 1981. Effect of bulk freezing straws of bovine spermatozoa in a programmed freezer on post - thaw survival. *J Anim Sci*, 53, 1432-39.
- ALVAREZ, J. G., TOUCHSTONE, J. C., BLASCO, L. & STOREY, B. T. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl.*, 8, 338-48.
- AMANN, R. P. & ALMQUIST, J. O. 1976. Reproductive Capacity of Dairy Bulls. VIII. Direct and Indirect Measurement of Testicular Sperm Production. *J Dairy Sci*, 45, 774-81.
- AMANN, R. P., SEIDEL, G. E., JR. & MORTIMER, R. G. 2000. Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*, 54, 1499-515.
- ANDERSSON, M., TAPONEN, J., KOSKINEN, E. & DAHLBOM, M. 2004. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology*, 61, 1583-588.
- ANDERSSON, M., TAPONEN, J., KOMMERI, M. & DAHLBOM, M. 2006. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. *Reprod Dom Anim*, 41, 95-7.

- ANDRABI, S. M. 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod Dom Anim*, 44, 552-69.
- ANTON, M., MARTINET, V., DALGALARRONDO, M., BEAUMAL, V., DAVID-BRIAND, E. & RABESONA, H. 2003. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, 83, 175-83.
- ARAV, A. & ZERON, Y. 1997. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology*, 47, 341.
- AUSTIN, C. R. 1952. The capacitation of the mammalian sperm. *Nature*, 170, 326.
- BAILEY, J. L., BILODEAU, J. F. & CORMIER, N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.*, 21, 1-7.
- BALLESTER, J., JOHANNISSON, A., SARAVIA, F., HAARD, M., GUSTAFSSON, H., BAJRAMOVIC, D. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2007. Post-thaw viability of bull AI-doses with low-sperm numbers. *Theriogenology*, 68, 934-43.
- BANSAL, A. K. & BILASPURI, G. S. 2011. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*, 2011, 7.
- BAUST, J. G. 1973. Mechanisms of cryoprotection in freezing tolerant animal systems. *Cryobiology*, 10, 197-205.
- BEDFORD, J. M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol Reprod.*, 2, 128-58.
- BERGERON, A., CRETE, M. H., BRINDLE, Y. & MANJUNATH, P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod.*, 70, 708-17.
- BERNEMANN, I., HOFFMANN, N., GLASMACHER, B., SZENTIVANY, A. & KUBERKA, M. 2008. Optimierung von Kryokonservierungsprotokollen: Systematische Parameteranalyse. *Wissenschaft*, 1, 24-7.
- BEßELING, M. 2001. Tiefgefrierung von flowzytometrisch gesextem Ebersperma: Verbesserung der Tiefgefrierfähigkeit durch Crossflowfiltration. *Dissertation*. Tierärztliche Hochschule Hannover.
- BILODEAU, J. F., CHATTERJEE, S., SIRARD, M. A. & GAGNON, C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*, 55, 282-88.
- BISWAS, J., CHAKRABARTI, A., DE, A., PAL, M., DAS, U., SAHA, K., MONDAL, A. & PAN, S. 2016. Minimum Number of Sex-Sorted Frozen Sperm per Dose in Sahiwal (*Bos indicus*) Cattle. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 4, 613-18.

- BODMER, M., JANETT, F., HASSIG, M., DEN DAAS, N., REICHERT, P. & THUN, R. 2005. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology*, 64, 1647-55.
- BORO, P., NAHA, B. C., MADKAR, A. & PRAKASH, C. 2016. Sexing of semen in bulls: A mini review. *IJAR*, 2, 460-62.
- BOUSSEAU, S., BRILLARD, J. P., MARGUANT-LE GUIENNE, B., GUERIN, B., CAMUS, A. & LECHAT, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 50, 699-706.
- BREITBART, H. 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 49, 321-27.
- BRITO, L. F., SILVA, A. E., RODRIGUES, L. H., VIEIRA, F. V., DERAGON, L. A. & KASTELIC, J. P. 2002. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology*, 58, 1175-86.
- BUCAK, M. N., TUNCER, P. B., SARIOZKAN, S., BASPINAR, N., TASPINAR, M., COYAN, K., BILGILI, A., AKALIN, P. P., BUYUKLEBLEBICI, S., AYDOS, S., ILGAZ, S., SUNGUROGLU, A. & OZTUNA, D. 2010. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, 61, 248-53.
- BUCHMÜLLER, J. & WEYERMANN, G. 1992. Device for rapid and uniform freezing of viscous liquids. <http://www.freepatentsonline.com/EP0284837B1.html>: Messer Griesheim GmbH.
- BUSCH, W., LÖHLE, K. & PETER, W. 1991. *Künstliche Besamung bei Nutztieren*, Jena, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.
- CASSOU, R. 1964. The plastic straw method adapted for freezing semen. *Proc. 5th Int. Cong. Anim. Reprod. & A. I., Trento, Italy*, 4, 540-46.
- CHANDLER, J. E., ADKINSON, R. W. & NEBEL, R. L. 1984. Thawing optimums for bovine spermatozoa processed by three methods and packaged in Continental and French straws. *J Dairy Sci*, 67, 398-404.
- CHANG, M. C. 1957. A Detrimental Effect of Seminal Plasma on the Fertilizing Capacity of Sperm. *Nature*, 179, 258-259.
- CHAVEIRO, A., MACHADO, L., FRIJTERS, A., ENGEL, B. & WOELDERS, H. 2006. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*, 65, 1875-90.

- CHEN, Y., FOOTE, R. H. & BROCKETT, C. C. 1993. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology*, 30, 423-31.
- CHRISTENSEN, P., BOELLING, D., PEDERSEN, K. M., KORSGAARD, I. R. & JENSEN, J. 2005. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. *J Androl*, 26, 98-106.
- CHRISTENSEN, P., LABOURIAU, R., BIRCK, A., BOE-HANSEN, G. B., PEDERSEN, J. & BORCHERSEN, S. 2011. Relationship among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. *J Dairy Sci*, 94, 1744-54.
- COURTENS, J. L. & PAQUIGNON, M. 1985. Ultrastructure of fresh, frozen, and frozen-thawed spermatozoa of the boar. *Proc. 1st Int. Conf. On Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala, Sweden*, 977-80.
- CRAMER, H., DIRNBERGER, M., ONKEN, F., RÖSSNER, M., SCHÄFER, C. S., WEIDEL, M. & WUTKE, M. 2009. Rinderproduktion in Deutschland 2008. *Arbeitsgemeinschaft deutscher Rinderzüchter e. V.*, 1-2.
- CURRY, M. R. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod*, 5, 46-52.
- DARIN-BENNETT, A. & WHITE, I. G. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14, 466-70.
- DE LAMIRANDE, E. & GAGNON, C. 1993. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med*, 14, 157-66.
- DE LEEUW, F. E., DE LEEUW, A. M., DEN DAAS, J. H., COLENBRANDER, B. & VERKLEIJ, A. J. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30, 32-44.
- DE ROOS, A. P., HAYES, B. J., SPELMAN, R. J. & GODDARD, M. E. 2008. Linkage disequilibrium and persistence of phase in Holstein-Friesian, Jersey and Angus cattle. *Genetics*, 179, 1503-12.
- DE ROOS, A. P., SCHROOTEN, C., VEERKAMP, R. F. & VAN ARENDONK, J. A. 2011. Effects of genomic selection on genetic improvement, inbreeding, and merit of young versus proven bulls. *J Dairy Sci*, 94, 1559-67.
- DEJARNETTE, J. M., BARNES, D. A. & MARSHALL, C. E. 2000. Effects of pre- and post-thaw thermal insults on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *Theriogenology*, 53, 1225-238.
- DEJARNETTE, J. M. & MARSHALL, C. E. 2005. Straw-thawing method interacts with sire and extender to influence sperm motility and conception rates of dairy cows. *J Dairy Sci*, 88, 3868-75.

- DEJARNETTE, J. M., NEBEL, R. L., MARSHALL, C. E., MORENO, J. F., MCCLEARY, C. R. & LENZ, R. W. 2008. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci*, 91, 1778-85.
- DEJARNETTE, J. M., MCCLEARY, C. R., LEACH, M. A., MORENO, J. F., NEBEL, R. L. & MARSHALL, C. E. 2010. Effects of 2.1 and 3.5x10⁶ sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *J Dairy Sci*, 93, 4079-85.
- DEJARNETTE, J. M., LEACH, M. A., NEBEL, R. L., MARSHALL, C. E., MCCLEARY, C. R. & MORENO, J. F. 2011. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *J Dairy Sci*, 94, 3477-483.
- DEN DAAS, J. H., DE JONG, G., LANSBERGEN, L. M. & VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. 1998. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *J Dairy Sci*, 81, 1714-23.
- DESNOYERS, L. & MANJUNATH, P. 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem*, 267, 10149-55.
- DHAMI, A. J. & SAHNI, K. L. 1993. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. *Theriogenology*, 40, 1269-280.
- DOROSTKAR, K., SHOUSHARI, S. M. A. & KHAKI, A. 2014. Effects of in vitro zinc sulphate additive to the semen extender on water buffalo (*bubalus bubalis*) spermatozoa before and after freezing. *Int J of Fertil Steril*, 8, 325.
- EIBL, K. 1969. Einbau der Zuchtarbeit in KB-Betrieben. *III. Teil der Routinestationsbetrieblichen Zuchthygiene*, 4, 102.
- ENGELHARDT VON, W., BREVES, G. & AHRENS, F. 2005. *Physiologie der Haustiere*. 2. Auflage, 203-56.
- ENNEN, B. D., BERNDTSON, W. E., MORTIMER, R. G. & PICKETT, B. W. 1976. Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in .25-ML straws. *J Anim Sci*, 43, 651-56.
- FARNIR, F., COPPIETERS, W., ARRANZ, J. J., BERZI, P., CAMBISANO, N., GRISART, B., KARIM, L., MARCQ, F., MOREAU, L., MNI, M., NEZER, C., SIMON, P., VANMANSHOVEN, P., WAGENAAR, D. & GEORGES, M. 2000. Extensive genome-wide linkage disequilibrium in cattle. *Genome Res*, 10, 220-27.
- FARRELL, P. B., PRESICCE, G. A., BROCKETT, C. C. & FOOTE, R. H. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, 49, 871-79.

- FAZELI, A., HAGE, W. J., CHENG, F. P., VOORHOUT, W. F., MARKS, A., BEVERS, M. M. & COLENBRANDER, B. 1997. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol Reprod*, 56, 430-38.
- FOOTE, R. H. 1982. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: Past, present, and future. *J Androl.*, 3, 85-100.
- FOOTE, R. H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci*, 80, 1-10.
- FOOTE, R. H. & DUNN, H. O. 1962. Motility and Fertility of Bull Semen Extended at High Rates in Yolk Extender Containing Catalase. *J Dairy Sci*, 45, 1237-241.
- FOOTE, R. H., CHEN, Y., BROCKETT, C. C. & KAPROTH, M. T. 1993. Fertility of bull spermatozoa frozen in whole milk extender with trehalose, taurine, or blood serum. *J Dairy Sci*, 76, 1908-13.
- FOOTE, R. H. & KAPROTH, M. T. 1997. Sperm numbers inseminated in dairy cattle and nonreturn rates revisited. *J Dairy Sci*, 80, 3072-076.
- FREUDENBERG, J., CICHON, S., NÖTHEN, M. & PROPPING, P. 2002. Blockstruktur des menschlichen Genoms: Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. *Dtsch. Arztebl*, 99(47), 48-49.
- FÜRST, C., DODENHOFF, J., EGGER-DANNER, C., EMMERLING, R., HAMANN, H., KROGMEIER, D. & SCHWARZENBACHER, H. 2017. Zuchtwertschätzung beim Rind Grundlagen, Methoden und Interpretationen. *ZuchtData EDV-Dienstleistungen GmbH*, 12-1 - 12-4.
- GAO, D. Y., ASHWORTH, E., WATSON, P. F., KLEINHANS, F. W., MAZUR, P. & CRITSER, J. K. 1993. Hyperosmotic Tolerance of Human Spermatozoa: Separate Effects of Glycerol, Sodium Chloride, and Sucrose on Spermolysis I. *Biol Reprod*, 49, 112-23.
- GAO, D. Y. & CRITSER, J. K. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J*, 41, 187-96.
- GARCIA, J. F., ALONSO, R. V., UTSUNOMIYA, Y. T. & CARMO, A. S. 2013. Genomic selection and assisted reproduction technologies to foster cattle breeding. *Anim Reprod*, 10, 297-301.
- GARNER, D. L. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, 65, 943-57.
- GARNER, D. L., GLEDHILL, B. L., PINKEL, D., LAKE, S., STEPHENSON, D., VAN DILLA, M. A. & JOHNSON, L. A. 1983. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biol Reprod*, 28, 312-21.

- GARNER, D. L., JOHNSON, L. A., YUE, S. T., ROTH, B. L. & HAUGLAND, R. P. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl.*, 15, 620-29.
- GARNER, D. L., THOMAS, C. A. & ALLEN, C. H. 1997. Effect of Semen Dilution on Bovine Sperm Viability as Determined by Dual-DNA Staining and Flow Cytometry. *J Androl.*, 18, 324-31.
- GARNER, D. L., THOMAS, C. A., GRAVANCE, C. G., MARSHALL, C. E., DEJARNETTE, J. M. & ALLEN, C. H. 2001. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, 56, 31-40.
- GASSE, H., NICKEL, R., SCHUMMER, A. & SEIFERLE, E. 1999. Akzessorische Geschlechtsdrüsen. Männliche Geschlechtsorgane Rind. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, 8. Auflage, 352-73.
- GÉRARD, O. & HUMBLLOT, P. 1991. Influence of interactions between semen extender and number of spermatozoa on nonreturn rate estimates of fertility for individual Holstein bulls. *Theriogenology*, 36, 727-36.
- GHETLER, Y., YAVIN, S., SHALGI, R. & ARAV, A. 2005. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod*, 20, 3385-89.
- GOCKEL, M. 2017. Mehr Zuchtfortschritt durch genomische Typisierung weiblicher Tiere. *RIND IM BILD*, 1, 77-80.
- GRAHAM, E. 1978. Fundamentals of the preservation of spermatozoa. *The Integrity of Frozen Spermatozoa. Proc. Conf. Natl. Acad. Sci., Washington, DC*, 4-44.
- GRIGA, M. C. 2010. *Untersuchungen zur Verbesserung der Technologie der Gefrierkonservierung von Bullensperma*. Dissertation, Freie Universität Berlin.
- GRÖPPER, B. 2004. *Einflüsse unterschiedlicher Verfahren zur Sperma-Tiefgefrierkonservierung auf Motilität und Membranintegrität von Hundespermien-Einsatz moderner spermatologischer Analyseverfahren*. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- GROßFELD, R., SIEG, B., STRUCKMANN, C., FRENZEL, A., MAXWELL, W. M. C. & RATH, D. 2008. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, 70, 1225-233.
- GROßFELD, R., HADELER, K. G., VELAZQUEZ, M. & RATH, D. 2011a. Non-surgical, low dosage semen-intra-fallopian-transfer in cattle (SIFT). *Reprod Dom Anim*, 46 (Suppl 3), 68.
- GROßFELD, R., STROTHMEYER, M. S. & RATH, D. 2011b. Low-dosage sperm-intra-fallopian-transfer (SIFT) in dairy cows. *Reprod Dom Anim*, 46, 109.
- GWATHMEY, T. M., IGNOTZ, G. G. & SUAREZ, S. S. 2003. PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod*, 69, 809-15.

- HABIER, D., FERNANDO, R. L. & DEKKERS, J. C. M. 2007. The Impact of Genetic Relationship Information on Genome-Assisted Breeding Values. *Genetics*, 177, 2389-397.
- HAHN, R., KUPFERSCHMIED, H. U. & FISCHERLEITNER, F. 1993. Künstliche Besamung beim Rind *Tierärztliche Praxis*, Enke Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, 131-38.
- HALLAP, T., HÅÅRD, M., JAAKMA, Ü., LARSSON, B. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2004. Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish Red and White AI sires at 1 and 4 years of age. *J Androl.*, 27, 166-71.
- HALLAP, T., JAAKMA, Ü. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2006. Changes in semen quality in Estonian Holstein AI bulls at 3, 5 and 7 years of age. *Reprod Dom Anim*, 41, 214-18.
- HAMMERSTEDT, R. H., GRAHAM, J. K. & NOLAN, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl.*, 11, 73-88.
- HAUGAN, T., GROHN, Y. T., KOMMISRUUD, E., ROPSTAD, E. & REKSEN, O. 2007. Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. *Anim Reprod Sci*, 97, 1-11.
- HAWK, H. W. 1983. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J Dairy Sci*, 66, 2645-60.
- HAWKINS, A. E., ZUCKERMAN, M. A., BRIGGS, M., GILSON, R. J. C., GOLDSTONE, A. H., BRINK, N. S. & TEDDER, R. S. 1996. Hepatitis B nucleotide sequence analysis: linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. *J Virol Meth*, 60, 81-88.
- HAYES, B. J., LEWIN, H. A. & GODDARD, M. E. 2013. The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. *Trends in Genetics*, 29, 206-14.
- HERNANDEZ, M., ROCA, J., CALVETE, J. J., SANZ, L., MUINO-BLANCO, T., CEBRIAN-PEREZ, J. A., VAZQUEZ, J. M. & MARTINEZ, E. A. 2007. Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J Androl*, 28, 689-97.
- HOLDEN, S. A., FERNANDEZ-FUERTE, B., MURPHY, C., WHELAN, H., O'GORMAN, A., BRENNAN, L., BUTLER, S. T., LONERGAN, P. & FAIR, S. 2017. Relationship between in vitro sperm functional assessments, seminal plasma composition, and field fertility after AI with either non-sorted or sex-sorted bull semen. *Theriogenology*, 87, 221-28.
- HOLT, W. V. 2000a. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53, 47-58.
- HOLT, W. V. 2000b. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 62, 3-22.

- HOLT, W. V. & NORTH, R. D. 1994. Effects of Temperature and Restoration of Osmotic Equilibrium during Thawing on the Induction of Plasma Membrane Damage in Cryopreserved Ram Spermatozoa. *Biol Reprod*, 51, 414-24.
- HUMBLLOT, P., LE BOURHIS, D., FRITZ, S., COLLEAU, J. J., GONZALEZ, C., GUYADER JOLY, C., MALAFOSSE, A., HEYMAN, Y., AMIGUES, Y., TISSIER, M. & PONSART, C. 2010. Reproductive Technologies and Genomic Selection in Cattle. *Vet Med Int.*, 10, 1-8.
- IWASAKI, A. & GAGNON, C. 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril*, 57, 409-16.
- JANUSKAUSKAS, A., GIL, J., SODERQUIST, L., HAARD, M. G., HAARD, M. C., JOHANNISSON, A. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1999. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, 52, 641-58.
- JANUSKAUSKAS, A., JOHANNISSON, A. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*, 55, 947-61.
- JIMENEZ, E., PEREZ-MARIN, C. C., VIZUETE, G., MILLAN, Y. & AGUERA, E. I. 2013. Effect of different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation. *Reprod Dom Anim*, 48, 665-72.
- JOHNSON, L. A. 1985. Fertility results of frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. *Proc. 1st Int. Conf on Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala, Sweden*, 199-222.
- JOHNSON, L. A., FLOOK, J. P. & LOOK, M. V. 1987. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gam Res*, 17, 203-12.
- JOHNSON, L. A. & CLARKE, R. N. 1988. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm: activation and pronuclear development of sorted bull, boar, and ram sperm microinjected into hamster oocytes. *Gamete Res*, 21, 335-43.
- JOHNSON, L. A. & WELCH, G. R. 1999. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology*, 52, 1323-41.
- JONDET, R. 1964. Congelation rapide du sperme de taureau conditionne en paillettes. *Proc. 5th Int. Cong. Anim Reprod & A. I.*, 4, 463-68.
- KARABINUS, D. S., EVENSON, D. P., JOST, L. K., BAER, R. K. & KAPROTH, M. T. 1990. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. *J Dairy Sci*, 73, 2364-71.

- KATHIRAVAN, P., KALATHARAN, J., KARTHIKEYA, G., RENGARAJAN, K. & KADIRVEL, G. 2011. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system--a review. *Reprod Dom Anim*, 46, 165-72.
- KHALIFA, T. A. & EL-SAYDY, B. E. 2006. Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. *Anim Reprod Sci*, 93, 303-15.
- KHATKAR, M. S., NICHOLAS, F. W., COLLINS, A. R., ZENGER, K. R., CAVANAGH, J. A., BARRIS, W., SCHNABEL, R. D., TAYLOR, J. F. & RAADSMA, H. W. 2008. Extent of genome-wide linkage disequilibrium in Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. *BMC Genom.*, 9, 187.
- KILLIAN, G. J., CHAPMAN, D. A. & ROGOWSKI, L. A. 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, 49, 1202-7.
- KLEMM, R., FISCHER, R. & BERGFELD, U. 2010. Genomische Selektion in der Tierzucht ist praxisreif! *Abteilung 9 - Tierische Erzeugung*, 1-8.
- KLINC, P. 2005. *Improved fertility of flowcytometrically sex selected bull spermatozoa*. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- KLINC, P. & RATH, D. 2005. Stat of the art and perspectives of application of sorted sperm cells in farm animals. *Züchtungskunde*, 77, 218-29.
- KLINC, P., FRESE, D., OSMERS, H. & RATH, D. 2007. Insemination with sex sorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidative substances. *Reprod Dom Anim*, 42, 58-62.
- KLINC, P. & RATH, D. 2007. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reprod Dom Anim*, 42, 63-67.
- KÖNIG, S. & SIMIANER, H. 2008. Genomische Selektion–Grundlagen und Perspektiven in der Milchrinderzucht. *Züchtungskunde*, 80, 50-60.
- KOPPERS, A. J., DE IULIIS, G. N., FINNIE, J. M., MCLAUGHLIN, E. A. & AITKEN, R. J. 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.*, 93, 3199-207.
- KRAUSE, D. 1966. *Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der fertilitätsdiagnostischen Bedeutung der Befunde*. Habilitations-Schrift, Tierärztliche Hochschule, Hannover.
- KRÖNER, E. 1958. Berechnung der elastischen Konstanten des Vielkristalls aus den Konstanten des Einkristalls. *Zeitschrift für Physik*, 151, 504-18.
- KUNDU, C. N., CHAKRABARTY, J., DUTTA, P., BHATTACHARYYA, D., GHOSH, A. & MAJUMDER, G. C. 2002. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction*, 123, 907-13.

- KUTLUYER, F., OGRET MEN, F. & INANAN, B. E. 2016. Cryopreservation of Goldfish (*Carassius auratus*) spermatozoa: Effects of extender supplemented with taurine on sperm motility and DNA damage. *Cryo Letters*, 37, 41-46.
- LEIDING, C. 2007. *Künstliche Besamung beim Rind*, Stuttgart/New York, 1. Auflage, In: W. Busch und D. Waberski (Hrsg.): *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*, 250-53.
- LEIPNITZ, C. 1965. Routinebesamung mit Tiefkühlsperma, das in Pillenform gefroren wurde. *Deut tierärztl Wschr*, 72, 469-70.
- LEIPNITZ, C. 1967. Ein Beitrag zur Tiefkühlung von Rindersperma: Kennzeichnung der Pillen. *Deut tierärztl Wschr*, 10, 257.
- LICHTNER, C. 2010. *Samengewinnung am stehenden Bullen ohne Aufsprung unter besonderer Berücksichtigung des Sexualverhaltens und der Samenqualität*. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- LIEBERMANN, J. 2003. *Die Vitrifikation: eine Alternative zum traditionellen Kryokonservierungsverfahren*. Dissertation, Universitäts-Frauenklinik und Poliklinik Würzburg.
- LIGNER, A. 2009. *Charakterisierung von Besamungsbullen anhand der mehrdimensionalen Graustufenanalyse sonografischer Bilder des Genitales sowie einem erweiterten spermatologischen Untersuchungsspektrum*. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- LU, C.-L. & BAKER, R. C. 1986. Characteristics of Egg Yolk Phosvitin as an Antioxidant for Inhibiting Metal-Catalyzed Phospholipid Oxidations. *Poultry Sci*, 65, 2065-70.
- LUND, M., DE ROOS, A., DE VRIES, A., DRUET, T., DUCROCQ, V., FRITZ, S., GUILLAUME, F., GULDBRANDTSEN, B., LIU, Z. & REENTS, R. 2010. Improving genomic prediction by EuroGenomics collaboration. *Proc. 9th World Cong. Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Germany*, 1-4.
- LYHS, L. 1982. Physiologie der landwirtschaftlichen Nutztiere. *Lehrbücher für Veterinäringenieure*, 3. Auflage, S. Hirzel Verlag, Leipzig, 120-128.
- MA, P., BRØNDUM, R. F., ZHANG, Q., LUND, M. S. & SU, G. 2013. Comparison of different methods for imputing genome-wide marker genotypes in Swedish and Finnish Red Cattle. *J Dairy Sci*, 96, 4666-77.
- MACPHERSON, J. W. & PENNER, P. 1972. A modified straw technique for frozen semen. *A. I. Digest.*, 20 (2), 6.
- MANJUNATH, P., NAUC, V., BERGERON, A. & MENARD, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod*, 67, 1250-58.
- MANN, T. 1964. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. Wiley, New York, 493-98.

- MANN, T. & LUTWAK-MANN, C. 1981. Male Reproductive Function and Semen. *Springer-Verlag, Berlin, Hamburg*, 55-81.
- MARTIN, W. G., AUGUSTYNIAK, J. & COOK, W. H. 1964. Fractionation and Characterization of the Low-Density Lipoproteins of Hen's Egg Yolk. *Biochim Biophys Acta*, 84, 714-20.
- MAUTE, A. 2003. *Vergleichende Untersuchung zu Organisations- und Arbeitsstrukturen von Rinderbesamungsstationen in Europa, Nordamerika, Australien und Neuseeland*. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- MAXWELL, W. M. & JOHNSON, L. A. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52, 1353-62.
- MAXWELL, W. M., EVANS, G., HOLLINSHEAD, F. K., BATHGATE, R., DE GRAAF, S. P., ERIKSSON, B. M., GILLAN, L., MORTON, K. M. & O'BRIEN, J. K. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 79-95.
- MAZUR, P. 1963. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular Freezing. *J Gen Physiol*, 47, 347-69.
- MAZUR, P. 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis in mammalian ova and embryos. *Proc. 9th Int Congr. On Anim Reprod & A. I., Madrid, Spain*, 2-13.
- MAZUR, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 247, C125-42.
- MAZUR, P. 1985. Basic concepts in freezing cells. *Proc. 1st Int. Conf. On Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala, Sweden*, 91-111.
- MELBAUM, J., SCHWERHOFF, M., GEHRMEYER, D., MELBAUM, H. & WAßMUTH, R. 2016. Einfluss des Alters auf die Spermaproduktion und auf die Non-Return Rate in der künstlichen Besamung von Ersteinsatzbulln der Rasse Holstein-Friesian. *Züchtungskunde*, 88, 371-78.
- MERKT, H., WEITZE, K. F. & LORRMANN, W. 1967. Kapselpellets mit Deckel, eine Möglichkeit zur Vervollkommnung der Pelletmethode bei der Tiefgefrierung von Bullensamen. *Deut tierärztl. Wschr*, 20, 505.
- MEUWISSEN, T. H., HAYES, B. J. & GODDARD, M. E. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157, 1819-29.
- MICHL, J. 2014. *Ultrastrukturelle Charakterisierung geschlechtsspezifisch sortierter Spermien*. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen.
- MÖNCH-TEGEDER, G. 2012. *Einfluss verschiedener Ejakulatbehandlungen auf die Lebensfähigkeit und das Befruchtungspotential geschlechtsspezifisch differenzierter Bullenspermien*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

- MONTANHOLI, Y. R., FONTOURA, A. B., DIEL DE AMORIM, M., FOSTER, R. A., CHENIER, T. & MILLER, S. P. 2016. Seminal plasma protein concentrations vary with feed efficiency and fertility-related measures in young beef bulls. *Reprod Biol*, 16, 147-56.
- MORTIMER, R. G., BERNDTSON, W. E., PICKETT, B. W. & BALL, L. 1976. Fertility of frozen bovine spermatozoa packaged in continental straws or ampules. *J Dairy Sci*, 59, 1595-98.
- MOUSSA, M., MARINET, V., TRIMECHE, A., TAINTURIER, D. & ANTON, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57, 1695-706.
- MUINO, R., FERNANDEZ, M. & PENA, A. I. 2007. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Dom Anim*, 42, 305-11.
- MULLER, C. H. 2000. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. *J Androl.*, 21, 10-30.
- NAGASE, H. & GRAHAM, E. F. 1964. Pelleted semen: Comparison of different extenders and processes on fertility of bovine spermatozoa. *Proc. 5th Int. Congr. On Anim. Reprod. & A. I., Trento, Italy*, 4, 387-91.
- NAGASE, H., GRAHAM, E. F. & NIWA, T. 1964. Pelleted semen: the effect of glycerol level and composition of thawing solution on fertility of bovine spermatozoa. *Proc. 5th Int. Congr. On Anim. Reprod. & A. I., Trento, Italy*, 3, 404-15.
- NAGASE, H. & NIWA, T. 1964. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. I. Factors affecting survival of spermatozoa. *Proc. 5th Int. Congr. On Anim. Reprod. & A. I., Trento, Italy*, 3, 410-415.
- NEY, P. G. 1986. The intravaginal absorption of male generated hormones and their possible effect on female behaviour. *Med Hypotheses*, 20, 221-31.
- NOLAN, J. P. & HAMMERSTEDT, R. H. 1997. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J*, 11, 670-82.
- OSMERS, J. H. & HERMANN, C. 2017. Reproduktion und Fitness bei genomisch selektierten Jungbullen. *Züchtungskunde*, 89, 9-21.
- PACE, M. M. & GRAHAM, E. F. 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*, 39, 1144-49.
- PADRIK, P. & JAAKMA, Ü. 2004. Sperm motility characteristics of Estonian Holstein dairy bulls and their relations to fertility. *J Agri Sci*, XV 4, 225-33.
- PARKS, J. E. & GRAHAM, J. K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38, 209-22.

- PEGG, D. E. 2002. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med*, 20, 5-13.
- PHILLIPS, N. J., MCGOWAN, M. R., JOHNSTON, S. D. & MAYER, D. G. 2004. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Anim Reprod Sci*, 81, 47-61.
- PHILLIPS, P. H. 1939. The Preservation of Bull Semen. *J Biol Chem*, 130, 415.
- PHILLIPS, P. H. & LARDY, H. A. 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. *J Dairy Sci*, 23, 399-404.
- PIASECKA-SERAFIN, M., BRANNY, J. & WIERZBOWSKY, S. 1967. Untersuchung der Möglichkeit einer bakteriellen Infektion von Sperma, das in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurde. *Med. weteryn.*, 8.
- PICKETT, B. W. & BERNDTSON, W. E. 1974. Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws: a review. *J Dairy Sci*, 57, 1287-308.
- PICKETT, B. W., BERNDTSON, W. E. & SULLIVAN, J. J. 1978. Influence of seminal additives and packaging systems on fertility of frozen bovine spermatozoa. *J Anim Sci*, 47 Suppl 2, 12-47.
- POLGE, C. 1957. Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. *Proc R Soc Lond B Biol Sci, London, England*, 147, 498-508.
- POLGE, C., SMITH, A. U. & PARKES, A. S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 666-67.
- POLGE, C. & ROWSON, L. E. A. 1952. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C. *Nature*, 169, 626-27.
- PRYCE, J. E. & DAETWYLER, H. D. 2012. Designing dairy cattle breeding schemes under genomic selection: a review of international research. *Anim Prod Sci*, 52, 107-114.
- RASUL, Z., AHMED, N. & ANZAR, M. 2007. Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology*, 68, 813-19.
- RATH, D. 2016. Persönliche Mitteilung vom 14.04.2016. FLI, Institut für Nutztiergenetik, Mariensee.
- RATH, D., RUIZ, S. & SIEG, B. 2003. Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen. *Vet Rec*, 152, 400-1.
- RATH, D. & JOHNSON, L. A. 2008. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reprod Domest Anim*, 43 Suppl 2, 338-46.

- RATH, D., MOENCH-TEGEDER, G., TAYLOR, U. & JOHNSON, L. A. 2009. Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology*, 71, 22-29.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., NICANDER, L., VIRING, S., EINARSSON, S. & LARSSON, K. 1990. Ultrastructure of the uterotubal junction in preovulatory pigs. *Anat Histol Embryol*, 19, 16-36.
- ROSENBERGER, G., DIRKSEN, G., GRÜNDER, H.-D., GRUNERT, E., KRAUSE, D. & STÖBER, M. 1977. Die klinische Untersuchung des Rindes. *Verlag Paul Parey. Berlin und Hamburg*, 2. Auflage, 368-69.
- SAACKE, R. G., DALTON, J. C., NADIR, S., NEBEL, R. L. & BAME, J. H. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci*, 60-61, 663-77.
- SALISBURY, G. W., VANDEMARK, N. L. & LODGE, J. R. 1961. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. *W.H. Freeman, San Francisco, USA*, 411-96.
- SCHAEFFER, L. 2006. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *J Anim Breed Gen*, 123, 218-23.
- SCHEFERS, J. M. & WEIGEL, K. A. 2012. Genomic selection in dairy cattle: Integration of DNA testing into breeding programs. *Animal Frontiers*, 2, 4-9.
- SCHENK, J., AMANN, R. & ALLEN, C. 1987. Effects of extender and insemination dose on postthaw quality and fertility of bovine sperm. *J Dairy Sci*, 70, 1458-64.
- SCHÜTT, R. O. 2013. *Einfluss verschiedener Tiefgefrierverfahren auf die Auftauqualität boviner Spermien aus Minimalvolumina*. Masterarbeit, Georg-August-Universität Göttingen.
- SCHWARTZ, D., MACDONALD, P. D. & HEUCHEL, V. 1981. On the relationship between the number of spermatozoa and the probability of conception. *Reprod Nutr Dev*, 21, 979-88.
- SCHWERDTNER, H. 1967. Spermapelletierung. *Mh. Vet.-Med.*, 26, 432-37.
- SCHWERHOFF, M. 2012. *Fruchtbarkeit nach intravaginaler und intrazervikaler Applikation von Seminalplasma bei der artifiziellen Insemination des Rindes sowie bei Embryonenempfängertieren*. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- SEEFRIED, F., LIU, Z., THALLER, G. & REINHARDT, F. 2010. Die genomische Zuchtwertschätzung bei der Rasse Deutsche Holstein. *Züchtungskunde*, 82, 14-21.
- SEHNER, R. 2005. *Untersuchungen zum Einsatz modifizierter Medien und Bedingungen bei der Kryokonservierung von Bullensperma*. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München.

- SEIDEL, G. E. 2007. Overview of sexing sperm. *Theriogenology*, 68, 443-46.
- SEIDEL, G. E., JR., JOHNSON, L. A., ALLEN, C. A., WELCH, G. R., HOLLAND, M. D., BRINK, Z. & CATTELL, M. B. 1996. Artificial insemination with X- and Y-bearing bovine sperm. *Theriogenology*, 45, 309.
- SEIDEL, G. E., ALLEN, C. H., JOHNSON, L. A., HOLLAND, M. D., BRINK, Z., WELCH, G. R., GRAHAM, J. K. & CATTELL, M. B. 1997. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology*, 48, 1255-64.
- SEIDEL, G. E., JR. & GARNER, D. L. 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*, 124, 733-43.
- SEIDEL, G. E., JR. & SCHENK, J. L. 2008. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Anim Reprod Sci*, 105, 129-38.
- SENGER, P. L., MITCHELL, J. R. & ALMQUIST, J. O. 1983. Influence of cooling rates and extenders upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in .25- and .5-ml French straws. *J Anim Sci*, 56, 1261-68.
- SHANNON, P. & VISHWANATH, R. 1995. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim Reprod Sci*, 39, 1-10.
- SIKKA, S. C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci*, 1, e78-86.
- SIMMET, L. 1972. A fully automatic method of packing bull semen in plastic tubes according to the Landshut method. *Proc. 7th Int. Congr. Anim. Reprod. & Artif. Insem., München, Germany*, 2, 1357-62.
- SORENSEN, A. 1972. Straws vs. ampules—which way. *Proc. 21st and 22nd Beef Cattle Short Course, Texas A & M University*, 128.
- SORENSEN, E. 1940. Overforing of gelatineret sperma: parafinerede cellophanror. *Medlemsbldanske Dyrlaegeforen*, 23, 166.
- SPINACI, M., VALLORANI, C., BUCCI, D., BERNARDINI, C., TAMANINI, C., SEREN, E. & GALEATI, G. 2010. Effect of liquid storage on sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*, 74, 741-48.
- STEUP, A.-K. 2015. Geschäftsbericht 2013/2014 Erstes Geschäftsjahr der RinderAllianz GmbH erfolgreich gemeistert Positive Zahlen sorgen für einen guten Start. *RIND UND WIR*, 6-9.
- STEVENSON, J. S., HIGGINS, J. J. & JUNG, Y. 2009. Pregnancy outcome after insemination of frozen-thawed bovine semen packaged in two straw sizes: A meta-analysis1. *J Dairy Sci*, 92, 4432-38.

- STROTHMEYER, M. S. 2013. *Kryokonservierung von Bullensperma in kleinen Volumina*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- SUAREZ, S. S. 2006. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev*, 19, 103-10.
- SWALVE, H. H. 2002. Aktuelle Aspekte der Rinder- und Pferdezücht. *Archiv für Tierzucht Dummerstorf*, 45, 5-19.
- TEDESCHI, G., OUNGRE, E., MORTARINO, M., NEGRI, A., MAFFEO, G. & RONCHI, S. 2000. Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *Eur J Biochem*, 267, 6175-79.
- THOMAS, J. M., LOCKE, J. W. C., VISHWANATH, R., HALL, J. B., ELLERSIECK, M. R., SMITH, M. F. & PATTERSON, D. J. 2017. Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology*, 98, 88-93.
- THUN, R., HURTADO, M. & JANETT, F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, 57, 1087-94.
- TÖPFER-PETERSEN, E. 2007. Spermienreifung, Transport und Befruchtung. In: *Busch, W. und Waberski D. (Hrsg) Künstliche Besamung bei Haus und Nutztieren*, 1. Auflage, 84-93.
- TÖPFER-PETERSEN, E. & WABERSKI, D. 2001. Spermienreifung und Befruchtung. In: *Busch, W. und A. Holzmann (Hrsg) Veterinärmedizinische Andrologie*, 1. Auflage, 67-82.
- VARADI, E., VEGI, B., LIPTOI, K. & BARNA, J. 2013. Methods for cryopreservation of guinea fowl sperm. *PLoS One*, 8, e62759.
- VENTURA, W. P. & FREUND, M. 1973. Evidence for a new class of uterine stimulants in rat semen and male accessory gland secretions. *J Reprod Fertil*, 33, 507-11.
- VISHWANATH, R. 2003. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, 59, 571-84.
- VISHWANATH, R., PITT, C. J. & SHANNON, P. 1996. Sperm numbers, semen age and fertility in fresh and frozen bovine semen. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 56, 31-34.
- VISHWANATH, R. & SHANNON, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci*, 62, 23-53.
- VIT 2016. Publikationen zur ZWS. *Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung w.V.*, <http://www.vit.de/index.php?id=publikationen-zws&L=0> (aufgerufen am 12.08.2017).

- VIT 2017. Beschreibung der Zuchtwertschätzung für Milchleistungsmerkmale, Zellzahl, Exterieurmerkmale, Nutzungsdauer und Zuchtleistungsmerkmale. http://www.vit.de/fileadmin/user_upload/vit-fuers-rind/zuchtwertschaetzung/milchrinder-zws-online/Zws_Bes_deu.pdf (aufgerufen am 09.08.2017).
- WABERSKI, D., WEITZE, K. F. & TÖPFER-PETERSEN, E. 1999. In-vitro Beurteilung von Sperma zur Vorhersage der Fertilität. *Tierärztliche Praxis*, 27, 1-7.
- WABERSKI, D. & PETRUNKINA, A. M. 2007. Arbeits- und Untersuchungsmethoden- Spermatologie. In: BUSCH, W. U. W. D. (ed.) *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, 99-106.
- WATSON, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, 7, 871-91.
- WATSON, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60-61, 481-92.
- WATSON, P. F., MORRIS, G. J. & CLARKE, A. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. *Effects of low temperatures on biological membranes*. Academic Press, London, 189, 189-218.
- WATSON, P. F. & PLUMMER, J. M. 1985. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. *Proc. 1st Int. Conf. On Deep Freezing of Boar Semen, Uppsala, Sweden*, 113-27.
- WEITZE, K. F. 1966. *Die Kaltbesamung mit Kapselpellets, ein neuer Weg in der Anwendung von Tiefgefriersperma beim Rind*. Inaugural-Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- WEITZE, K. F. 2001. Prinzipien der Verdünnung und Konservierung. In: Busch, W. und Holzmann, A. (Hrsg): *Veterinärmedizinische Andrologie: Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*, Verlag Schattauer, Stuttgart, 511-513.
- WEITZE, K. F. & PETRUNKINA, A. M. 2007. Samenkonservierung, Biochemische Grundlagen und Prinzipien der Einfrier- und Auftautechnik. In: Busch, W. und Waberski, D. (Hrsg): *Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren*, Stuttgart, New-York: Schattenhauer Verlag, 131-199.
- WHITE, I. G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*, 5, 639-58.
- WIESNER, E. R., R. 2000. Lexikon der Veterinärmedizin. *Enke Verlag, Stuttgart*, 4. Auflage 82-390.
- WOLFE, C. A., JAMES, P. S., GUNNING, A. P., LADHA, S., CHRISTOVA, Y. & JONES, R. 2001. Lipid dynamics in the plasma membrane of ram and bull

spermatozoa after washing and exposure to macromolecules BSA and PVP. *Mol Reprod Dev*, 59, 306-13.

WOLKERS, W. F., TABLIN, F. & CROWE, J. H. 2002. From anhydrobiosis to freeze-drying of eukaryotic cells. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 131, 535-43.

ZERBE, H., SCHUBERTH, H. J., ENGELKE, F., FRANK, J., KLUG, E. & LEIBOLD, W. 2003. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. *Theriogenology*, 60, 209-23.

9 Anhang

9.1 Materialien

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders ausgeführt, durch die Carl Roth GmbH & CO (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und sind unter Kapitel 3.2.1 aufgelistet.

9.2 Parametereinstellung Gallios 10/3TM Durchflusszytometer (Beckmann Coulter Inc., Brea, USA)

Tabelle 28: Messparameter Gallios 10/3TM Durchflusszytometer zur Detektion der Färbung mit SYBR14®/PI (FS=forward scatter, SS=side scatter, FL=fluoreszenz channel, BP=band pass, PI=Propidium Iodid)

Parameter	FS	SS	FL1	FL3
Voltage	26	363	396	406
Gain	2.0	10.0	1.0	1.0
Discriminator	120	Off	Off	Off
Compensation factor (FL1 to FL3)	5,8			
Blue laser	On, Schutter Closed			
Excitation wavelength (nm) Sybr14	488			
Excitation wavelength (nm) PI	488			
Detection wacelength (nm) FL1 (BP)	525 (40)			
Detection wavelength (nm) FL3 (BP)	620 (30)			
Detection wavelength (nm) FL3 (BP)	620 (30)			
Sybr14 detection channel	FL1			
PI detection channel	FL3			
Software Version	Gallios 1.2			

9.3 Parametereinstellungen CASA IVOS I, Spermaanalsecomputer (Version 12.0 IVOS, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, USA) für Messungen ohne bzw. mit Fluoreszenzfärbung

Tabelle 29: CASA Messparameter für Spermien ohne Fluoreszenzfärbung und mit Fluoreszenzfärbung

Analysis Setup	Bulle, nativ	Bulle, Hoechst
Apply Sort	0	0
Frames Aquired	60	60
Frame Rate	60 Hz	60 Hz
Minimum Contrast	40	40
Minimum Cell Size	5 Pixels	5 Pixels
Minimum Static Contrast	15	30
Straightness (STR), Threshold	25 %	20,0 %
Vap Cutoff	5,0 µm/s	5,0 µm/s
Prog. Min VAP	10 µm/s	10 µm/s
VSL Cutoff	5 µm/s	5 µm/s
Cell Size	5 Pixels	5 Pixels
Cell Intensity	70	120
Static Head Size	0,26 to 7,88	0,26 to 7,10
Static Head Intensity	0,14 to 1,99	0,20 to 2,01
Static Elongation	10 to 98	15 to 100
Slow Cells Motile	NO	YES
Magnification	8,75	6,99
Video Frequency	60	60
Bright Field	No	No
LED Illumination Intensity	2188	2153
IDENT Illumination Intensity	2598	4095
Temperature, Set	37°C	37°C
Chamber depth	10 µm	10 µm
Chamber position	14,5 mm	14,5 mm
Chamber position B	15,5 mm	15,5 mm
Chamber position C	16,5 mm	16,5 mm
Chamber position D	17,5 mm	17,5 mm
Chamber type	Makler	Makler
Field Selection Mode	Auto	Auto
IDENT Fluorescent Option	OFF	FULL
Integrating Time	1 Frames	1 Frames

9.4 Wertungsprotokoll der morphologischen Veränderungen der Spermien

Tabelle 30: Untersuchungsprotokoll der morphologischen Veränderungen boviner Spermien nach (KRAUSE, 1966)

Veränderungsort	Veränderungsart	Zustandsform
Kopfveränderung	Kappenveränderungen	-Abgelöst -In Ablösung -Geschwollen -Deformiert -Persistierendes Akrosomgranulum
	Kopfveränderungen	-Deformiert -Paraxialer Schwanzansatz
Schwanzveränderung	Halsveränderungen	-Halsbruch -Plasmatropfen
	Verbindungsstückveränderungen	-Deformiert -Gebrochen -Plasmatropfen
	Haupt- und Endstückveränderungen	-Plasmatropfen -Schleifenform -Aufgerollt -Um den Kopf gerollt -Abgeknickt
Missbildungen	Doppel- und Mehrfachmissbildungen	Missbildungen

10 Eidesstattliche Erklärung

1. Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit weder in gleicher noch ähnlicher Form bereits anderen Prüfungsbehörden vorgelegen hat.

Weiter erkläre ich, dass ich mich an keiner anderen Hochschule um einen Doktorgrad beworben habe.

Göttingen, den 20. Mai 2018

.....
(Unterschrift)

2. Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass diese Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Göttingen, den 20. Mai 2018

.....
(Unterschrift)