

Untersuchungen zur Optimierung der Kryokonservierung
caniner Spermien unter besonderer Berücksichtigung
verschiedener Verdüner

Nicole Miß



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie
und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

**Untersuchungen zur Optimierung der Kryokonservierung caniner Spermien
unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Verdüner**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Nicole Miß

Tierärztin aus Hilden (Nordrhein-Westfalen)

Gießen 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend
Prof. Dr. A. Moritz

Tag der Disputation: 11.06.2012

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis.....	I
1 Einleitung und Fragestellung	1
2 Literatur	2
2.1 Bedeutung und Einsatz der Besamung in der Hundezucht	2
2.2 Bedeutung der computerassistierten Spermaanalyse	3
2.3 Beurteilung der Viabilität mittels SYBR14 und Propidiumjodid	4
2.4 Flüssig- versus Kryokonservierung	5
2.5 Prinzip der Kryokonservierung	6
2.6 Kryokonservierung von Rüdensperma	8
2.6.1 Verdünnung von Ejakulaten zur Kryokonservierung	8
2.6.2 Bestandteile von Verdünnern zur Kryokonservierung	9
2.7 Verdünner zur Kryokonservierung von caninem Sperma	14
2.7.1 Tris-Verdünner	14
2.7.2 Andersen-Verdünner.....	40
2.7.3 Uppsala-Verdünner-System 1 und 2.....	40
2.7.4 Magermilch-Verdünner	42
2.7.5 Laktose-Verdünner	46
2.7.6 Kokosnusswasser-Verdünner	46
2.7.7 Kommerzielle Verdünner-Systeme	47
3 Material und Methoden.....	51
3.1 Probanden.....	51
3.2 Ejakulatgewinnung	51

3.3	Sperma-Untersuchung	51
3.3.1	Makroskopische und chemisch-physikalische Untersuchung	53
3.3.2	Mikroskopische Untersuchung	53
3.3.3	SpermVision® Untersuchungen.....	55
3.4	Aufbereitung mit den verschiedenen Verdünner-Systemen	62
3.5	Kryokonservierung und Auftauen	65
3.6	Untersuchung des Tiefgefrierspermas	66
3.7	Statistische Auswertung	66
4	Ergebnisse	70
4.1	Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate	70
4.1.1	Ergebnisse der makroskopischen und chemisch-physikalischen Untersuchung.....	70
4.1.2	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung	70
4.1.3	Ergebnisse der SpermVision® Untersuchungen.....	71
4.1.4	Zusammenhang zwischen subjektiver und mittels SpermVision® gemessener Motilität.....	71
4.1.5	Zusammenhang zwischen dem Anteil lebender Spermien und Viabilität.....	72
4.2	Untersuchungsergebnisse nach vollständiger Aufarbeitung, vor Kryokonservierung	72
4.3	Ergebnisse nach Kryokonservierung.....	74
4.3.1	Einfriereffekt.....	74
4.3.2	Auftauergebnisse der Gesamt- und Progressivmotilität	75
4.3.3	Zusammenhang zwischen subjektiver und mittels SpermVision® gemessener Motilität nach dem Auftauen	81

4.3.4	Zusammenhang zwischen subjektiver und mittels SpermVision® gemessener Motilität nach Pseudoreplikation.....	83
4.3.5	Zusätzliche Motilitätsparameter des SpermVision®.....	83
4.3.6	Viabilität	89
4.3.7	Lebend-Tot Anteil und Pathomorphologie.....	91
4.3.8	Korrelation des Anteile lebender Spermien im EosinG Ausstrich und der mittels SpermVision® ermittelte Viabilität nach dem Auftauen	92
4.4	Sonderfall: Blutbeimengungen in allen Spermaproben	92
5	Diskussion.....	103
5.1	Diskussion der Fragestellung	103
5.2	Diskussion der Methodik	103
5.3	Diskussion der Messergebnisse.....	115
5.3.1	Motilitätsergebnisse nach Verdünnung der Proben vor und nach Kryokonservierung.....	115
5.3.2	Ergebnisse der morphologischen Beurteilung der Spermien nach Kryokonservierung.....	119
5.3.3	Ergebnisse bezüglich der Viabilität und des Anteils lebender Spermien....	120
5.3.4	Ergebnisse nach Zusatz von Auftaumedium.....	121
5.3.5	Diskussion des Sonderfalls.....	122
6	Schlussbetrachtung.....	125
7	Offene Fragestellungen	127
8	Zusammenfassung.....	128
9	Summary	130
10	Anhang	132

10.1	Rezepte.....	132
10.2	Herstellung der Verdünner	133
10.3	Färbeverfahren.....	134
10.4	Ergebnistabellen.....	136
11	Literaturverzeichnis	144
12	Danksagung	168

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALH	Amplitude of lateral head displacement, Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung der Spermien (μm)
ANOVA	Analysis of Variance, Varianzanalyse
AOC	Average Orientation Change of the head (in degrees), durchschnittliche Ausrichtungs-/Orientierungsänderung des Spermienkopfes (angegeben in Grad)
ATP	Adenosintriphosphat
BCF	Beat Cross Frequency, Frequenz der Kopfbewegung (pro Sekunde)
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BSP	Bovine-Seminalplasma Proteine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CASA	computer assisted sperm analysis, Computer-Assistierte Sperma-Analyse
CP	Canipro™ Freeze A&B Verdünner (Minitüb, Tiefenbach)
CPA	Verdünnermedium A des Canipro™ Freeze A&B Verdünners
CPB	Verdünnermedium B des Canipro™ Freeze A&B Verdünners
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DAP	Distance Average Path, Durchschnittliche Distanz (μm)
DCL	Distance Curved Line, Kurvilineare Distanz (μm)
div.	diverses
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonuklein Säure)
DSH	Deutscher Schäferhund
DSL	Distance Straight Line, Geradlinige Distanz (μm)
Ej	Ejakulat
Endkonz.	Endkonzentration
etc.	et cetera
et al.	et al., et alii (Maskulinum), et aliae (Femininum), et alia (Neutrum), „und andere“

Ex.	Experiment
Fa.	Firma
FITC-PNA	Fluorescein-Isothiocyanat konjugiertes Pisum sativum Agglutinat
G	Gravitationskonstante, $G = 6,67384(80) \cdot 10^{-11} \text{ m}^3/\text{kg} \cdot \text{s}^2$
ggf.	gegebenenfalls
GM	Gesamtmotilität (%)
Gold.-Ret.	Golden Retriever
Hd	Hund
HEPES	Heminatrium-Salz-N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure, Heminatrium Salz
HOST	Hypoosmotischer-Schwelltest
Hz	Hertz (Einheit)
k.A.	keine Angabe
Kap.	Kapitel
KB	Künstliche Besamung
Konz.	Konzentration
LDL	Low Density Lipoprotein
LIN	Linearity, Linearität, (VSL/VCL)
M	Molar
Max.	Maximum
MES	2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure
µm	Mikrometer
Min.	Minimum
Mio.	Millionen
Mischej.	Mischejakulat
ml	Milliliter
Mrd.	Milliarden
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Probenzahl
n.s.	nicht signifikant
p	p-Wert
PI	Propidiumjodid
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)

pKa	Maß für die Stärke einer Säure, Säurekonstante
PM	Progressive Motilität (%)
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (Synonym: Natriumlaurylsulfat; engl. Sodiumdodecylsulfat)
Sek.	Sekunden
Std.	Stunde
STR	Straightness, Geradlinigkeit, (VSL/VAP)
Subj.	Subjektive Schätzung
t0	Meßzeitpunkt: direkt nach dem Auftauen
t10	Meßzeitpunkt: 10 Minuten nach dem Auftauen
t30	Meßzeitpunkt: 30 Minuten nach dem Auftauen
t60	Meßzeitpunkt: 60 Minuten nach dem Auftauen
Tab.	Tabelle
TE	Tris-Eidotter-Verdünner (selbst hergestellt)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TES	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfon-Säure
TEST	TES-Tris-Verdünner
TG	Tiefgefrierung
Tricine	N-tris(hydroxymethyl)methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)methylamin
U/Minute	Umdrehungen pro Minute
Up	Uppsala Equex System 2 Verdünner (nach Linde-Forsberg, 2001)
Up1	Verdünnermedium 1 des Uppsala Equex System 2 (nach Linde-Forsberg, 2001)
Up2	Verdünnermedium 2 des Uppsala Equex System 2 (nach Linde-Forsberg, 2001)
UpA	Auftaumedium des Uppsala Equex System 2 (nach Linde-Forsberg, 2001)
v/v	Volume/Volume, Volumenanteil oder Volumenbruch
VAP	Velocity Average Path, mittlere Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sekunde}$)
VCL	Velocity Curve Linear, kurvilineare Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sekunde}$)

Vol.	Volumen
VSL	Velocity Straight Line, lineare Geschwindigkeit ($\mu\text{m}/\text{Sekunde}$)
Wo.	Woche(n)
WOB	Wobble, (VAP/VCL)

1 Einleitung und Fragestellung

Die Kryokonservierung von Rüdensperma gewinnt durch den zunehmenden Einsatz der Besamung stetig an Bedeutung. Durch die damit verbundene nahezu unbegrenzte Haltbarkeit der Spermien bietet sie im Vergleich zur Flüssigkonservierung eine Reihe von Vorteilen. Beispielsweise wird der Erhalt genetischen Materials wertvoller Zuchttiere oder auch der internationale Handel bzw. Einsatz von Vatertieren ermöglicht. Die Trächtigkeitsraten nach Besamung mit Tiefgefriersperma sind jedoch verglichen mit den Ergebnissen nach Verwendung von Frischsperma oder nach dem natürlichen Deckakt deutlich reduziert. Ein Grund hierfür ist die massive Belastung der Samenzellen durch den Kryokonservierungsprozess. Um die Bedingungen für die Spermien zu optimieren, existieren für die Kryokonservierung von caninem Sperma eine Vielzahl kommerzieller und nicht-kommerzieller Verdünner-Systeme. Am häufigsten finden bislang die selbst hergestellten Verdünner mit Tris-Eidotter (TE) und das Uppsala Equex System 2 (Up) Anwendung. Zudem sind neuartige kommerzielle Verdünner, wie CaniPRO™ Freeze A&B (CP), verfügbar.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Klärung der Frage, welche der drei oben genannten Verdünner (TE, Up, CP) am besten zur Kryokonservierung von caninem Sperma geeignet ist. Ebenfalls wurde untersucht, ob der Zusatz eines Auftaumediums einen positiven Einfluss auf die Spermaqualität hat.

2 Literatur

2.1 Bedeutung und Einsatz der Besamung in der Hundezucht

Der Italiener Spallanzani beobachtete bereits 1776, dass eine Temperaturniedrigung die metabolische Aktivität von Spermien reversibel reduziert und so eine Lagerung möglich macht. Es dauerte jedoch nahezu 200 Jahre bis Rowson 1954 die erste erfolgreiche Kryokonservierung von Rüdensperma beschrieb (England, 1993).

Die Besamung stellt heute eines der ältesten und weltweit bedeutendsten biotechnologischen Verfahren dar (Hoffmann, 2003a). Sie entwickelte sich trotz der Erfolge von Spallanzani beim Hund im Vergleich zu anderen Tierarten jedoch nur sehr zögerlich (England, 1993; Busch und Waberski, 2007). Die weltweit ersten Hundewelpen nach einer Besamung mit kryokonserviertem Sperma wurden 1969 in den USA geboren (Seager, 1969). Seither wurden weltweit viele Welpen durch den Einsatz gefrorener Spermien geboren (Farstad, 2000).

Der Einsatz der Besamung insbesondere mit Nutzung von Tiefgefriersperma bietet zahlreiche Vorteile: Bildung und Nutzung eines Genpools, Vermeidung von Transportstress der Tiere, Umgehung von Quarantänerestricttionen, Einsatz bei Antipathie der Hündin oder des Rüden sowie Unerfahrenheit des Rüden. Auch die Sicherung von genetischem Material von z. B. gefährdeten Rassen, Wildcaniden, wertvollen Vatern sowie Arbeitshunden oder vor medizinischer Behandlung männlicher Tiere (z. B. Chemotherapie, Kastration) spielt eine Rolle. Ein weiterer Vorteil liegt in der Aufteilung eines Ejakulates in mehrere Besamungsdosen, um möglichst viele Hündinnen inseminieren zu können. Ebenfalls ein wichtiger Aspekt ist die Möglichkeit, Samenportionen vor ihrer Verwendung auf ihre Qualität und Tauglichkeit zu überprüfen. Ferner wird das Risiko der Übertragung von infektiösen Krankheiten durch die Vermeidung eines Kontakts zwischen den Tieren und durch eine Aufarbeitung der Samenproben reduziert (Morton und Bruce, 1989; Wildt, 1992; England, 1993; Lindforsberg und Forsberg, 1993; England und Ponzio, 1996; Berchtold, 1997; Peña et al., 2006; Zindl et al., 2006; Busch und Waberski, 2007; Lévy und Frontbonne, 2007; England und Millar, 2008). Dies spielt beim Hund im Vergleich zu den anderen Tierarten eine untergeordnete Rolle.

Mittlerweile bieten sowohl Züchtervereinigungen, als auch private Gesellschaften und Universitäten Samenbanken zur Kryokonservierung von Hundesperma an (Farstad, 1996; Peña et al., 2006). Somit wird weltweit Hundezüchtern die Kryokonservierung von

Samen sowie die Nutzung des kryokonservierten Spermas ermöglicht, was zu einer Internationalisierung der Zucht geführt hat (Busch und Waberski, 2007; Thomassen und Farstad, 2009) und die Nachfrage nach reproduktionsbiologischen Techniken wachsen lässt (Peña et al., 2006). Einige Zuchtverbände, wie z. B. der Deutsche Schäferhundzuchtverband (SV), sprechen sich jedoch gegen eine Nutzung der Besamung aus (Pesch et al., 2007).

2.2 Bedeutung der computerassistierten Spermaanlyse

Ein geeigneter Test zur Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit von Hundespermien ist die Bewertung der Konzeptionsraten. Da diese Methode sehr zeit- und kostenaufwendig ist, kommt im Allgemeinen die konventionelle Spermauntersuchung ergänzt durch neuartige Methoden (CASA) zur in vitro-Bewertung der Funktionsfähigkeit zum Einsatz (Rijsselaere et al., 2005). Die computerassistierte Spermaanlyse (CASA) wurde vor 20 Jahren erstmals von Dott und Foster (1979) beschrieben und wird heute in verschiedenen human- und veterinärmedizinischen andrologischen Zentren eingesetzt (Verstegen et al., 2002). Im Vergleich zur computergestützten Analyse ist die lichtmikroskopische Methode subjektiv, variabel und verlangt Erfahrung des Untersuchers in der Beurteilung von Ejakulaten. Große Unterschiede zwischen Laboren entstehen auch durch die relativ geringen Spermienzahlen, die mit herkömmlichen Methoden im Vergleich zur CASA bei einer Probe analysiert werden. Berichte von starken Variationen in der Bewertung von Motilitäts- und Morphologieparametern bei gleichen Ejakulaten, die von verschiedenen Untersuchern beurteilt wurden, implizieren die Notwendigkeit objektiverer und standardisierter Methoden für den Klinikseinsatz und die Forschung (Rijsselaere et al., 2005). Ebenfalls sind computergestützte Analysen vorteilhaft zur gleichzeitigen und objektiven Bewertung verschiedener Motilitätscharakteristika sowie zur Erfassung kleinster Veränderungen derselben, was mittels konventioneller Samenanalyse nicht möglich ist (Rijsselaere et al., 2005).

Das SpermVision®-System kann im Vergleich zu anderen CASA-Systemen neben der objektiven Beurteilung von Motilitätsparametern auch die Zellmembranintegrität nach Färbung mit SYBR14 und Propidiumjodid (PI) im integrierten Fluoreszenzmikroskop erfassen (Schäfer-Somi und Aurich, 2007).

2.3 Beurteilung der Viabilität mittels SYBR14 und Propidiumjodid

SYBR-PI stellt eine häufig eingesetzte Färbemethode zur Untersuchung der Viabilität und Zellmembranintegrität dar. SYBR14 penetriert aufgrund seines Acetylrestes leicht die intakte Spermienmembran und bindet an die nukleäre DNA. Im Anschluss kommt es in lebenden Zellen durch intrazelluläre Esterasen zu einer Deacylierung (Peña et al., 2006), was eine starke Fluoreszenz bedingt (Rijsselaere et al., 2005). Nichtmembranpermeable grüne Fluorophore verbleiben bei intakter Membran intrazellulär (Rijsselaere et al., 2005). Auch nichtbewegliche offensichtlich tote Spermien werden mit SYBR14 gefärbt und können fluoreszieren, jedoch ist die Farbeintensität weitaus geringer als bei lebenden Spermien. Der Mechanismus, mit welchem SYBR14 lebende Spermien intensiver färbt als tote, ist unbekannt; möglicherweise spielen biophysikalische Phänomene eine Rolle (Garner und Johnson, 1995).

PI ist nicht in der Lage, in die intakte Zelle zu penetrieren, und färbt nur den Spermienkern, wenn Bruchstellen in der Plasmamembran vorhanden sind (Peña et al., 2006). Nach dem Zelltod verlieren die Spermatozoen ihre Fähigkeit, dem Influx von PI-Fluoreszenz zu widerstehen, wodurch die Färbung von SYBR14 ersetzt oder gedämpft wird (Rijsselaere et al., 2005).

Beide Farbstoffe haben den gleichen Anregungs- (488 nm), aber unterschiedliche Emissionsbereiche. SYBR14 emittiert grüne Wellenlängen (515 nm), PI hingegen rote (610 nm) (Peña et al., 2006). Bei Doppelfärbung mit SYBR14/PI zeigen lebensfähige und intakte Spermien eine deutliche grüne Fluoreszenz (SYBR14), wohingegen geschädigte bzw. tote Spermien durch PI rot gefärbt erscheinen (Rijsselaere et al., 2005). Bei offensichtlich sterbenden Spermien mit beträchtlichen Membranschäden, kann auch eine gleichzeitige grüne und rote Fluoreszenz auftreten, welche eine PI-Färbung erlaubt und SYBR14 verdrängt oder dämpft (Peña et al., 2006). Die Umwandlung von grün nach rot findet innerhalb einer Minute statt und beginnt am hinteren Anteil des Spermienkopfes bis nach vorne. Diese Veränderungen können mikroskopisch beobachtet werden, wenn die Spermien immotil werden und sterben. Es entstehen dabei drei hauptsächliche Populationen: lebende SYBR14 gefärbte, tote PI gefärbte und sterbende rot und grün fluoreszierende Spermien (Garner und Johnson, 1995).

Die zwei bedeutenden Vorteile von SYBR14/PI gegenüber enzym-basierenden Färbungen sind: die unkritische Färbezeit und nahezu nicht existente

Hintergrundfärbungen (Garner und Johnson, 1995). Außerdem färben sich nur Spermien, was eine Differenzierung von anderen Partikeln im Medium erlaubt und demnach ein vorheriges Zentrifugieren überflüssig macht. Dies ist auch deshalb wichtig, da ein Zentrifugieren zu weiteren Schäden, insbesondere nach Kryokonservierung, führt (Peña et al., 2006).

2.4 Flüssig- versus Kryokonservierung

Bei Hunden kommt sowohl die Flüssig- als auch die Kryokonservierung von Sperma zum Einsatz (Hoffmann, 2003a; Pesch et al., 2007).

Die Flüssigkonservierung ist eine Haltbarmachung von Sperma für einen begrenzten Zeitraum (Günzel-Apel, 2007). Dazu wird der gewonnenen Spermaprobe ein Verdünner zugesetzt und diese bei 4°C gelagert (Peña et al., 2006). Die Flüssigkonservierung ist vergleichsweise preiswert und einfach durchzuführen. Die Kühlung der Samenportionen ist weniger aufwendig als die Kryokonservierung (Peña et al., 2006) und der Transport in einer einfachen Kühlbox mit Kühl-Akkus möglich (Günzel-Apel, 2007). In Kombination mit Progesterontests im Rahmen einer genauen Deckzeitpunktbestimmung lassen sich hohe Trächtigkeitsraten und Welpenzahlen erreichen (Peña et al., 2006). Nachteilig sind ein enges Timing hinsichtlich des Zeitpunktes der Samenentnahme beim Rüden und der Besamung der Hündin (Günzel-Apel, 2007) und eine nur begrenzte Lagerungsfähigkeit von flüssigkonserviertem Sperma, die einen schnellen Transport und eine schnelle Verwendung erforderlich machen (England und Ponzio, 1996). Nach Günzel-Apel (2007) ist eine Aufbewahrungsdauer von etwa 72 Stunden möglich, üblicherweise wird das Sperma jedoch innerhalb von 2 Tagen nach der Entnahme auf die vorgesehene Hündin übertragen (Bouchard et al., 1990; England und Ponzio, 1996; Peña et al., 2006). Nach Bouchard et al. (1990) und Peña et al. (2006) ist eine Aufrechterhaltung der Motilität und Vorwärtsbeweglichkeit für maximal 5 bis 7 Tage möglich, wobei nach $118,7 \pm 25,9$ Stunden die Qualität von flüssig- und kryokonserviertem Samen vergleichbar und somit ab einem gewissen Zeitpunkt die Kryo- der Flüssigkonservierung überlegen ist (England und Ponzio, 1996).

Bei der Kryokonservierung wird das gewonnene Ejakulat mit einem Verdünner aufbereitet und im Anschluss an eine Equilibrierungsphase bei -196°C in flüssigem Stickstoff gefroren und gelagert (Peña et al., 2006). Die Dauer der Lagerungsfähigkeit wird nach der Kryokonservierung nur durch die in der Umwelt vorhandene ionisierende

Strahlung begrenzt und beträgt nach physikalischen Berechnungen ca. 3.000 bis 10.000 Jahre (Hoffmann, 2003a). Durch die Möglichkeit einer unbegrenzten Lagerung des Ejakulates (England und Ponzio, 1996) ist eine zeitlich und örtlich flexible Verwendung (Günzel-Apel, 2007) sowie ein bedarfsorientiertes Auftauen möglich (England und Ponzio, 1996). Die zahlreichen weiteren Vorteile wurden bereits unter 2.3 genannt. Ein entscheidender Nachteil der Kryokonservierung ist die nach dem Auftauen verkürzte Lebensspanne der Spermien (Badinand et al., 1993; England, 1993; Tsutsui et al., 2000a) und eine schnell abnehmende Motilität (Ivanova-Kicheva et al., 1995; England und Ponzio, 1996; Rota et al., 1997; Burgess et al., 2001). Neben Veränderungen an der Plasmamembran sind zudem vermehrt akrosomale Schädigungen nachweisbar (Oettlé, 1986; Tsutsui et al., 2000a; Burgess et al., 2001), die direkt aus dem Kryokonservierungs- und Auftauprozeß resultieren (Burgess et al., 2001) und die geringeren Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen begründen (Linde-Forsberg und Forsberg, 1989, 1993). Von Nachteil ist ebenfalls der Material- und Kostenaufwand (spezielle Container, flüssiger Stickstoff) für Kryokonservierung und Versand, wenngleich sogenannte „Dry Shipper“, deren Container-Innenauskleidung flüssigen Stickstoff absorbiert und kontinuierlich als Dampf in den Containerinnenraum abgibt, zumindest nicht als Gefahrgut deklariert werden müssen (Günzel-Apel, 2007).

2.5 Prinzip der Kryokonservierung

Bei der Kryokonservierung werden die Zellen mit flüssigem Stickstoff bis auf eine Temperatur von -196°C heruntergekühlt (Hoffmann, 2003a). Durch die auftretenden Temperaturunterschiede kommt es dabei zu einer Reduzierung der metabolischen Aktivität sowie einem verminderten ATP-Verbrauch (Hammerstedt et al., 1990), bis keine Stoffwechselleistungen der Spermien mehr stattfinden und der Zustand der Anabiose eintritt (Hoffmann, 2003a).

Im Rahmen der Kryokonservierung kommt es sowohl während des Einfrierens als auch beim Auftauen zu einer Schädigung der Spermien infolge einer Umstrukturierung von Membranlipiden, Reduzierung der Membranfluidität, Veränderung der Membranintegrität und einer Zunahme der Membranpermeabilität (Hammerstedt et al., 1990; Alhaider und Watson, 2009). Ein Teil der Veränderungen ist vermutlich durch Störungen der Volumenregulation bedingt (Petrunkina et al., 2005), zudem kommt es zu Veränderungen im Bereich des Akrosoms, was sich als vermehrte Bläschenbildung der

akrosomalen Membran und als Verlust akrosomaler Bestandteile darstellt (Rodriguez-Martinez et al., 1993; Nair et al., 1998). Beschrieben sind auch ein verstärktes Ablösen der Plasmamembran, ein Verlust an elektronendichtem Material und Veränderungen des Chromatins (Rodriguez-Martinez et al., 1993; Nair et al., 1998).

Im Rahmen der Kryokonservierung findet zunächst eine Temperaturerniedrigung von Körpertemperatur auf 0°C statt, was den sogenannten Kälteschock bedingt. Das Abkühlen und Gefrieren verändert vermutlich die Lipidstruktur der Spermienmembran, man spricht dabei von einem endogenen Remodelling (Weitze, 2001). Durch den Zusatz von einem entsprechenden Verdüner konnten diese Veränderungen empirisch soweit auf ein Minimum reduziert werden, dass ein Kühlen und späteres Einfrieren von Samenzellen bei den meisten Spezies erfolgreich durchführbar ist (Weitze, 2001).

Gefrierschäden entstehen mit dem Beginn des Gefrierprozesses, d. h. mit der Auskristallisation von Wasser in Form von Eis bis zum Erreichen des eutektischen Punktes. Dieser ist definiert als diejenige Temperatur, bei der eine Lösung aus zwei oder mehreren Substanzen ohne Änderung ihrer Zusammensetzung in einen anderen Aggregatzustand übergehen kann (Hoffmann, 2003a).

Beim Einfrierprozess wird die Spermienmembran hauptsächlich durch die folgenden zwei Effekte geschädigt: den „Lösungseffekt“ bei einer zu langsamen Gefriertrate bzw. eine intrazelluläre Eiskristallbildung bei einer zu schnellen Gefriertrate (Weitze, 2001; Hoffmann, 2003a). Das umgebende Medium und der Intrazellularraum bleiben bis zu einer Temperatur von -5°C in flüssigem Zustand. Sinkt die Temperatur weiter, kommt es zur Bildung von extrazellulären Eiskristallen (Mazur, 1984), wodurch die noch nicht gefrorene extrazelluläre Flüssigkeit hyperton wird. Die Zellmembran verhindert ein Ausbreiten der Eiskristalle in den intrazellulären Raum. Durch die vorhandene hypertone extrazelluläre Flüssigkeit bildet sich ein osmotischer Gradient an der Zellmembran aus, der zu einem Wasserausstrom aus der Zelle führt. Ob die Zelle das Einfrieren überlebt, hängt somit im Wesentlichen von der Permeabilität der Plasmamembran ab. Bei ausreichend langsamer Kühlungsrate und permeabler Membran kommt es zu einer fortschreitenden Dehydrierung der Zelle, wodurch eine intrazelluläre Eiskristallbildung verhindert wird. Nur so bleibt die Zelle nach dem Auftauen lebensfähig (Mazur, 1963, 1965).

Wird die Lösung jedoch zu hyperton, kommt es zu einer Veränderung des pH-Wertes. Ob die Schädigung der Zelle primär oder sekundär durch die Zellschrumpfung bedingt

ist, wird kontrovers diskutiert (Van den Berg und Soliman, 1969; Mazur, 1984; England, 1993; Weitze, 2001).

Wird zu schnell gekühlt oder ist die Membran nicht permeabel, so erfolgt die Dehydratation zu langsam und es kommt zu einer intrazellulären Eiskristallbildung (Mazur, 1965). Dies wiederum führt zu Schäden an der Zellmembran mit Verlust der Semipermeabilität und in Folge gegebenenfalls zum Zelltod (Eilts, 2005). Farrant et al. (1977) zeigten, dass es nicht zwingend zum Tod der Zelle kommen muss. Ein Überleben der Zelle hängt demnach von der gebildeten Menge und Größe der Eiskristalle ab. Intrazellulär gebildete Eiskristalle sind thermodynamisch sehr instabil und haben einen niedrigeren Schmelzpunkt als größere Eiskristalle, so dass sich bei einer Temperaturerhöhung während des Auftauprozesses Ansammlungen bilden können. Dabei entstehen größere Eiskristalle, was als Phänomen der „Rekristallisation“ bezeichnet wird. Es wird besonders bei langsamen Auftauraten von zuvor schnell gefrorenen Zellen beobachtet und verursacht massive Zellschäden (Mazur, 1984). Folglich ist bei intrazellulärer Eiskristallbildung ein schnelles Auftauen nötig (England, 1993). Die Auftaurate muss der Gefrierate angepasst werden, um Schäden, die durch Rekristallisation, Salz- und Wassertransporte auftreten können, auf ein Minimum zu reduzieren (Hammerstedt et al., 1990).

Ein erfolgreiches Gefrieren und Auftauen ist somit von der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichtes, dem pH-Wert und der Ionen-Stärke sowie von der Bereitstellung von Energie und einer Vorbeugung vor Gefrierschäden abhängig (England, 1993).

2.6 Kryokonservierung von Rüdensperma

2.6.1 Verdünnung von Ejakulaten zur Kryokonservierung

Verdünner dienen primär der Stabilisierung der Zellmembran (Eilts, 2005) und der Substitution von Nähr- sowie Schutzstoffen (Weitze, 2001).

Die bei Hunden verwendeten Verdünner sind häufig eine Modifikation der bei Rindern eingesetzten Basisverdünner (England, 1993). England (1993) hob hervor, dass besonderes Augenmerk auf die Verdünner und Ihre Inhaltsstoffe zu richten sei, um die Ergebnisse der Kryokonservierung von Rüdensperma zu optimieren.

Gerade in den frühen Arbeiten wurden überwiegend einphasige Verdüner eingesetzt, während heute vermehrt zweiphasige Verdüner-Systeme, die im zweiten Verdünnungsschritt eine höhere Glycerinkonzentration verwenden als im ersten, Anwendung finden. Die Zugabe des zweiten Verdüners erfolgt dabei erst kurz vor dem Gefrieren, so dass die hohe Glycerinkonzentration zu keiner nachteiligen Beeinflussung während der Equilibrierung führt (Rota et al., 1997; Peña und Linde-Forsberg, 2000a).

2.6.2 Bestandteile von Verdünnern zur Kryokonservierung

2.6.2.1 Puffer

Puffersubstanzen können in geringen Konzentrationen zur Einstellung eines definierten pH-Wertes verwendet werden oder als Hauptkomponente, um ausreichend Pufferkapazität zu schaffen und die Tonizität aufrecht zu erhalten (Weitze, 2001). Je mehr Pufferkomponenten in einem Verdüner enthalten sind, desto effektiver kann die Entstehung von Wasserstoff-Ionen reduziert werden (Crusco dos Santos et al., 1999), die durch die metabolische Aktivität der Spermienzellen entstehen und einen Abfall des pH-Wertes bedingen (England, 1993).

Die spermienreiche Fraktion von Hunden weist im Durchschnitt einen pH-Wert von $6,27 \pm 0,3$ auf (England, 1993). Im Rahmen der Verdünnung werden pH-Werte von 6,5 angestrebt, da eine Erhöhung des pH-Werts auf mehr als 7 die Stoffwechselaktivität der Spermien steigert (Hoffmann, 2003a). Ein pH-Wert Abfall unter 5,2 führt neben einer deutlichen Minderung der Motilität (Hoffmann, 2003a) zu einer Reduzierung der Lebensdauer (England, 1993) sowie zu einer Schädigung der Spermienmembranintegrität, welche die Befruchtungsfähigkeit beeinträchtigt (Crusco dos Santos et al., 1999).

Frühe Studien verwendeten zur Kryokonservierung von Rüdensperma einen Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer, obwohl dieser nicht völlig unschädlich für Spermien ist. Seager (1969) beschrieb einen 11 %igen Laktose-Verdüner, dessen Modifizierungen weit verbreitet genutzt wurden (England, 1993). Die Verwendung von Tris-hydroxymethyl-methylamin (Tris) und anderen organischen Puffern, wie N-Tris-hydroxymethyl-methyl-2-aminoethansulfonsäure (Tes), 2-N-Morpholino-ethansulfonsäure (Mes), Heminatrium-Salz-N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Heminatrium-Salz-N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (Hepes) und N-tris-hydroxymethyl-

methylglycin (Tricine) eröffneten neue Möglichkeiten. Tris-HCl, Tris-Zitronensäure, Tes-Tris sind oder waren wichtige Kombinationen (Weitze, 2001).

Foote (1964) verwendete einen Tris-Citrat-Eidotter-Verdünner in seinen Untersuchungen, dessen Modifizierungen auch heute noch genutzt werden (England, 1993). Diese Verdünner beinhalten in der Regel alle Eidotter, welcher ebenfalls eine puffernde Wirkung besitzt (England, 1993). Bei der Gefrierung von caninem Sperma zeigte der Tris-Citrat Puffer im Vergleich zum Bes-Laktose-Verdünner einen höheren Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien (Thomas et al., 1993). Ein Nachteil des Tris-Puffers ist jedoch seine nur sehr geringe Pufferkapazität in einem pH Bereich von 7 (England, 1993; Weitze, 2001). Andere Puffer scheinen aufgrund günstigerer pK_a geeigneter zu sein. Untersuchungen von Smith (1984) und Smith & Graham (1984) zeigten bei der Verwendung von PIPES-Puffer höhere Motilitäten nach dem Auftauen im Vergleich zu Bes-, Tes-, Tris-Puffern. Jedoch waren die erzielten Trächtigkeitsraten mit dem PIPES-Puffer sehr gering (England, 1993). Auch Milch kann als Pufferzusatz verwendet werden (Rota et al., 2001; Weitze, 2001).

2.6.2.2 Zuckerkomponenten

Die in den Verdünnern enthaltenen Zuckerkomponenten erfüllen verschiedene Funktionen. Sie sind ein exogener Energielieferant, eine osmotisch wirksame Komponente und wirken als Kryoprotektivum. Die gebräuchlichen Verdünner enthalten Laktose, Glukose oder Fruktose. Spermien verwenden Glukose, Fruktose und Mannose in ihrer Glykolyse und können Arabinose oxidieren. Andere Zucker, z. B. Galaktose, können zwar leicht in die Zelle penetrieren, werden jedoch nur langsam verstoffwechselt (England, 1993), tragen aber so zur Osmolarität des Mediums bei. Da diese Fähigkeit temperaturabhängig sein kann, variiert die Temperatur des Zusatzes in Abhängigkeit vom Zucker (Weitze, 2001). Zucker mit einem hohen Molekulargewicht, wie Laktose und Raffinose, besitzen nur eine geringe Permeabilität (England, 1993; Weitze, 2001) und werden meist den Kryoprotektiva zugerechnet (England, 1993). Vermutlich resultiert die Schutzfunktion von Trehalose und Sucrose aus einer Wasserstoffbindung zwischen der Hydroxy-Gruppe des Zuckermoleküls und der polaren Phospholipid-Gruppe im Kopfbereich des Spermiums (Woelders et al., 1997).

2.6.2.3 Kryoprotektiva

Das am häufigsten verwendete Kryoprotektivum ist Glycerin (England, 1993; Farstad, 1996; Günzel-Apel, 2007). Alternative Kryoprotektiva, die bereits bei caninem Sperma untersucht wurden, sind Ethylenglykol (Soares et al., 2002; Martins-Bessa et al., 2006; Oliveira et al., 2006; Rota et al., 2006), Trehalose (Yildiz et al., 2000; Yamashiro et al., 2007) sowie Low Density Lipoprotein (LDL) aus Eidotter (Commin et al., 2000; Bencharif et al., 2008; Varela Junior et al., 2009). Auch Tris (Silva et al., 2002), DMSO alleine oder in Kombination mit Glycerin (England, 1993) und Prolin besitzen kryoprotektive Eigenschaften. Prolin minimiert vermutlich die intraakrosomale Eisbildung und fördert die Stabilisierung der Akrosomenmembran (Peña et al., 1998b).

Kryoprotektiva können in zwei Gruppen eingeteilt werden (Hammerstedt et al., 1990; England, 1993; Martins-Bessa et al., 2006; Lopes et al., 2009a):

-Penetrierende Kryoprotektiva: Glycerin, DMSO, Methanol, Ethylenglykol, Methylformamid, Dimethylformamid

-Nicht penetrierende Kryoprotektiva: verschiedene Zucker (Laktose, Trehalose), Proteine, Polyvinyl-Pyrrolidone

Beide Gruppen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, die Zelle zu penetrieren und im Zytoplasma oder in der Membran anwesend zu sein (Hammerstedt et al., 1990).

Sowohl penetrierende als auch nicht penetrierende Kryoprotektiva führen zu einem osmotisch bedingten Wasserverlust und einer Dehydratation (Hammerstedt et al., 1990; England, 1993). Wenn das penetrierende Kryoprotektivum in die Zelle eingedrungen ist, kommt es zu einem langsamen Rückfluss des Wassers bis das ursprüngliche Volumen wieder erreicht ist (Hammerstedt et al., 1990).

Bezüglich der Auswirkungen von Kryoprotektiva auf die Samenzellen sind mehrere Effekte zu beschreiben: Glycerin setzt den Gefrierpunkt herab (Weitze und Petrunkina, 2007) und reduziert den Gehalt an ausgefällten Salzen bei jeder Temperatur, indem es vermehrt Wasser am Gefrieren hindert. Als Konsequenz treten weniger pH-Wert-Veränderungen durch Ausfällungen in der Puffer-Salz-Lösung auf (Van den Berg und Soliman, 1969). Zellschäden werden dabei durch eine Reduzierung der Hyperosmolarität des umgebenden Mediums vermieden (Weitze und Petrunkina, 2007). Glycerin, aber auch verschiedene Zucker bewirken, dass die Viskosität des Mediums erhöht, eine eutektische Kristallisation verhindert und die glasbildende Tendenz verstärkt wird. Durch die Verhinderung der eutektischen Kristallisation (Erstarren der

ungefrorenen Fraktion beim Erreichen einer bestimmten „eutektischen“ Temperatur) werden irreversible Zellschäden vermieden. Des Weiteren beeinflusst Glycerin die Dehydrierung durch Veränderung der hydraulischen Permeabilität der Plasmamembran, wodurch die Wassertransportgeschwindigkeit beeinflusst wird (Weitze und Petrunkina, 2007).

Die optimale Konzentration an Kryoprotektiva hängt von der Gefriertrate ab, d. h. geringere Konzentrationen erfordern eine schnellere Einfriertrate. Des Weiteren ist die optimale Glycerinkonzentration vom Verdünner, der Gefriermethode und der Spezies abhängig. Beim Hund werden in Abhängigkeit vom Puffer und von der Verdünnerzusammensetzung Glycerinkonzentrationen zwischen 4 und 11 % (v/v) verwendet. So wurden hohe Motilitäten nach dem Auftauen mit 3 bis 4 % Glycerin in einem Tris-Eidotter-Verdünner erzielt, wogegen sich bei einem Eidotter-PIPES-Verdünner Konzentrationen von 9 % Glycerin als optimal erwiesen (England, 1993). Da Glycerin toxische Eigenschaften besitzt, ist die Endkonzentration von entscheidender Bedeutung. Die optimale Konzentration ist daher ein Kompromiss zwischen toxischem und protektivem Effekt. Hohe Glycerinkonzentrationen können außerdem die Befruchtungsfähigkeit der Spermienzellen beeinflussen (England, 1993). Nach Farstad (1996) schützen bei einem schnellen Gefriervorgang Konzentrationen zwischen 2 und 4 % (v/v) in der finalen Verdünnung die Samenzellen und gewährleisten somit ein Minimum an toxischen Schädigungen.

Zudem ist zu berücksichtigen, dass die Spermienmembran bei niedrigen Temperaturen nahezu impermeabel, bei höheren Temperaturen (z. B. 38°C) jedoch permeabel für Glycerin ist, wobei nach wenigen Minuten bereits das Equilibrium erreicht ist (Weitze und Petrunkina, 2007).

2.6.2.4 Eidotter

Eidotter ist häufig in Verdünnern enthalten (England, 1993) und wird meist ebenfalls als Kryoprotektivum verwendet (Farstad, 1996). Die komplexe biologische Zusammensetzung ergibt sich aus verschiedensten Bestandteilen wie Proteinen, Vitaminen, Phospholipiden, Glukose, antibakteriellen Bestandteilen und Antioxidantien. Jedoch bergen Hühnereier die Gefahr einer Krankheitsübertragung, wie beispielsweise aviäre Influenza oder diverse Bakterien (Farstad, 2009).

Die verwendete Konzentration ist abhängig von der Spezies und liegt zwischen 3 und 25 % (w/v) (England, 1993). Bei Hunden werden meist Verdünner mit 20 % Eidotter-Anteil verwendet (Farstad und Andersen Berg, 1989; Olar et al., 1989; England, 1993; Ström et al., 1997; Peña et al., 1998a; Rota et al., 1998, 2001). Aufgrund der puffernden Wirkung des Eidotters hängt die eingesetzte Konzentration auch von den anderen im Verdünnermedium enthaltenen Puffersubstanzen ab (Farstad, 1996).

Die Effektivität von Eidotter als Kryoprotektivum wird durch das enthaltene Low Density Lipoprotein (LDL) (Graham und Foote, 1987; England, 1993; Commin et al., 2000; Bergeron et al., 2004; Weitze und Petrunkina, 2007) und insbesondere Lecithin (Phosphatidylcholin) bestimmt (Quinn et al., 1980; Farstad, 1996; Anton et al., 2003). LDL interagiert mit der Plasmamembranoberfläche (Quinn et al., 1980; Graham und Foote, 1987; England, 1993; Bergeron et al., 2004; Weitze und Petrunkina, 2007), ohne dass es zu permanenten Modifizierungen kommt (England, 1993; Farstad, 2009). Beim Bullen kommt es zudem zu einer Komplexbildung zwischen LDL und Bovinen-Seminalplasma Proteinen (BSP); durch die Komplexbildung wird eine Spermienmembran-Destabilisierung durch Lipidefflux von Cholesterin und Phospholipiden verhindert (Manjunath et al., 2002; Bergeron et al., 2004) (Abb. 1). Da eine universelle Verbreitung von BSP-ähnlichen Proteinen im Reproduktionstrakt verschiedener Säugetiere festgestellt wurde (Leblond et al., 1993), erscheint der postulierte Wirkmechanismus auf andere Spezies übertragbar.

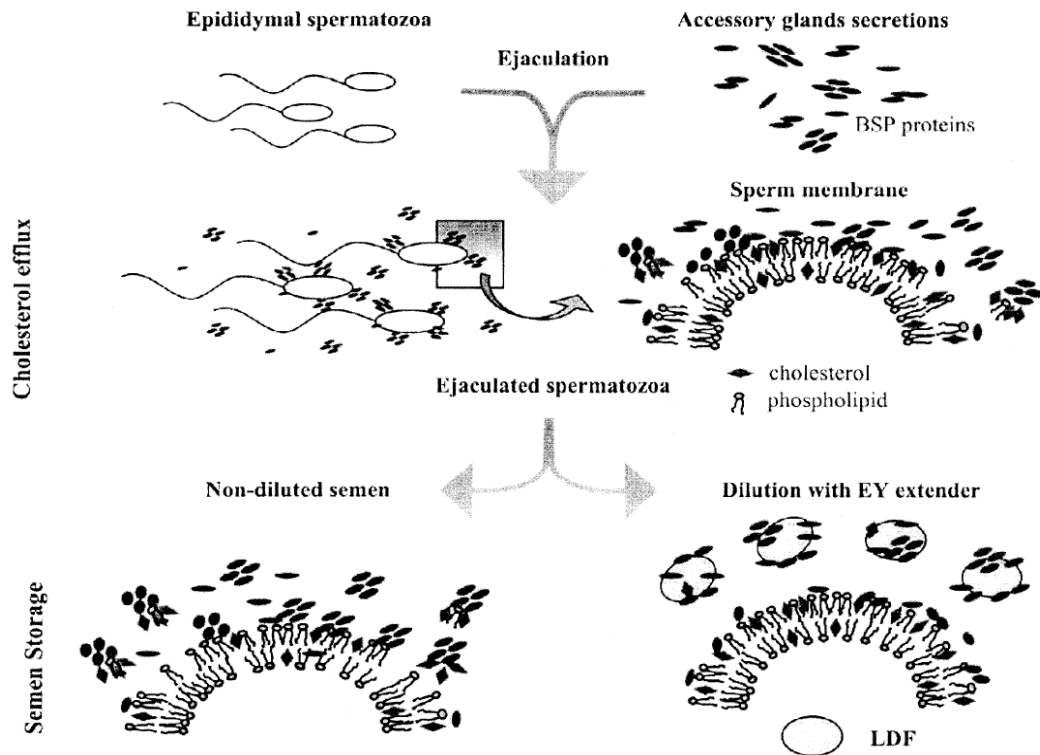


Abb. 1: Postulierter Wirkmechanismus von Eidotter (EY) durch eine Komplexbildung zwischen LDL (LDF) und Bovinen-Seminalplasma Proteinen (BSP) (Manjunath et al., 2002).

2.7 Verdüner zur Kryokonservierung von caninem Sperma

Dieses Kapitel dient der Übersicht über einzelne Verdüner, die beim Rüden bislang eingesetzt wurden.

2.7.1 Tris-Verdüner

Tris basierende Verdüner werden besonders häufig zur Kryokonservierung von caninem Sperma verwendet (England, 1993; Weitze, 2001). Hierbei handelt es sich insbesondere um einphasige Tris-Fruktose-Citrat- und Tris-Glukose-Citrat-Verdüner, die teilweise Eidotter enthalten und vielfältig modifiziert wurden. Entsprechend groß ist die Anzahl an Publikationen. Ein Vergleich der Versuchsergebnisse ist aufgrund von Variationen in der Zusammensetzung und verschiedener Untersuchungsparameter nur schwer möglich.

2.7.1.1 Modifikationen

2.7.1.1.1 Kryoprotektiva

2.7.1.1.1.1 Glycerin

Der Zusatz von Glycerin in Konzentrationsbereichen zwischen 0 und 14 % wurde bereits in verschiedenen Tris-basierenden Verdünnern untersucht. Dabei wurde bezüglich einer optimalen Glycerinkonzentration eine Abhängigkeit von der verwendeten Tris-Verdünner-Zusammensetzung festgestellt (Foote, 1964; Olar et al., 1989; Hay et al., 1997; Rota et al., 1998; Silva et al., 2002; Rota und Mollo, 2005; Alves et al., 2008).

In einem Tris-Citrat-Glukose-Eidotter-Verdünner von Olar et al. (1989) erwiesen sich Konzentrationen von 3 und 4 % als besonders geeignet, um die beste Motilität direkt nach dem Auftauen zu erzielen. Foote (1964) verwendete ebenfalls einen Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdünner und erhielt mit Glycerinkonzentration zwischen 8 und 11 % bessere Motilitäten. In Tris-Eidotter-Verdünnern konnten mit 8 % verglichen zu 6 % Glycerin die höchsten Progressivmotilitäten (PM) ermittelt werden (Alves et al., 2008).

Im Gegensatz zu Rota und Mollo (2005), die in einem 0,5 % Equex STM-Paste enthaltenden Tris-Eidotter-Verdünner mit 3 oder 5 % Glycerin keine Unterschiede (hinsichtlich CASA Motilität und Spermienmembranfunktion) feststellten, wurde von Rota et al. (1998) in einem 0,5 % Equex STM-Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdünner mit 5 % Glycerin verglichen mit einem 3 %igen Zusatz ein signifikant höherer Anteil an motilen und membranintakten Spermien direkt nach dem Auftauen festgestellt. Die Glycerinkonzentration (3 bzw. 5 %) zeigte während einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 38°C keinen Effekt auf die Motilität, jedoch war bei 5 % Glycerinanteil eine signifikant höhere Abnahme der Membranintegrität feststellbar (Rota et al., 1998) (Tab. 1).

Untersuchungen mit einem Citrat-Glukose-Eidotter-Verdünner ohne und mit 4 % Glycerinzusatz zeigten mit 4 % Glycerin keine Veränderungen des akrosomalen Status und der subjektiven Motilität. In einem homologen Zona-Penetrations-Assay wurde jedoch eine Abnahme der gebundenen Spermien pro Eizelle nachgewiesen (Hay et al., 1997) (Tab. 1). Konzentrationen zwischen 6 und 8 % Glycerin waren in einem Natrium-Citrat-basierenden Puffer geeigneter (Foote, 1964).

Für die Verbesserung der Auftauergebnisse erwiesen sich Zusätze von 6 % Glycerin und 20 % Eidotter (gegenüber je 0 %) in Tris-Fruktose-Citrat-Verdünnern als vorteilhaft

(Silva et al., 2002) (Tab. 1). Vergleichende Untersuchungen von Peña et al. (1998b) mit verschiedenen Glycerinkonzentrationen (2, 4, 6, 8 %) in einem Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünner zeigten bei 8 %iger Glycerinkonzentration die besseren Ergebnisse.

Tab. 1: Zusammenfassende Darstellung von Untersuchungen zur Auswirkung eines Glycerin-Zusatzes in Tris-basierenden Verdünnern zur Kryokonservierung von caninem Sperma

Verdüner	Anzahl/ Rasse/ Ejakulate	Parameter	Ergebnisse	Literatur
Citrat-Glukose-Eidotter-Verdüner				
Ex. 1: unterschiedliche Konz. von Glycerin, Glycin, Bikarbonat-Phosphat Puffer einzeln und in Kombination (je 4, 6, 8 %) (Lagerung in flüssigem CO ₂ bei -79°C)	Ex. 1: k. A. Beagle 8 Ej.	- PM	Ex. 1: höhere Glycerinanteile besser geeignet, Ersatz von Glycin durch Bikarbonat-Phosphat Puffer ist vorteilhaft Ex. 2: optimale Glycerinkonz.: Na-Citrat Puffer zwischen 6 - 8 %, Tris-Puffer zwischen 8 - 11 % sowie beste Ergebnisse mit 0,2 M Tris-Eidotter-Glukose-Verdüner und 11 % Glycerin	Foote, 1964
Ex. 2: verschiedene Na-Citrat-Konz. (1,45 %, 2,17 %, 2,9 %) in Kombination mit verschiedenen Glycerinkonz. (6, 8, 10 %) und unterschiedliche Tris-Konz. (0,15, 0,2, 0,25 M) in Kombination mit verschiedenen Glycerinkonz. (8, 11, 14 %) (Lagerung in flüssigem Stickstoff bei -195°C)	Ex. 2: k. A. Beagle 9 Ej.			
Verdüner mit und ohne 4 % Glycerinzusatz	k.A. div. Rassen 43 Ej.	- Motilität (Subj.) - Morphologie - akrosomaler Status - Viabilität - homologer Zona Penetrations-Assay	Zusatz von Glycerin führt zu einer Abnahme der gebundenen Spermien je Eizelle, bewirkt jedoch keine Veränderung von akrosomalem Status und Motilität	Hay et al., 1997
Tris-Citrat-Glukose-Eidotter-Verdüner				
Ex. 1: Vergleich von Tris-Citrat-Glukose-Eidotter- und Laktose-Eidotter-Verdüner mit Glycerin (0, 1, 2, 3, 4, 5 %) und DMSO (0, 2, 4 %)	Ex. 1: 8 Mischlinge 8 Ej.	Ex. 1 und 2: PM/ Motilität (Subj., nach 0, 1 Std., 37°C) Ex. 3: Motilität (nach 0, 0,5 Std., 37°C)	- höchste Motilität nach dem Auftauen und besserer Erhalt der Motilität im Tris-Eidotter-Verdüner mit Glycerinkonz. zw. 2 - 4 % - maximale Motilität nach dem Auftauen bei Verwendung von Tris-Eidotter mit 3 oder 4 % Glycerin - nicht von Vorteil war ein Zusatz von DMSO allein oder in Kombination mit Glycerin zu beiden Verdünnern	Olar et al., 1989
Ex. 2: Tris-Eidotter und Laktose-Eidotter-Verdüner mit verschiedenen Glycerinkonz. (0, 1, 2, 3, 4, 5 %)	Ex. 2: 9 Mischlinge			
Ex. 3: Vergleich verschiedener Gefrier- und Auftauraten in einem Tris-Eidotter-Verdüner mit 3 % Glycerin*				

<p>*<u>Gefrierrate</u> 37°C zu 5°C über 1, 2, 3 Std. und 3 Gefrierzeiten von 5 °C zu -100°C untersucht: <u>schnell</u> (~-75°C/Minute), <u>mittel</u> (-5 °C/Minute von 5 °C bis 15°C und -20°C/Minute von -15 °C bis -100°C), <u>langsam</u> (-2°C/Minute von 5 °C bis 15°C und -10°C/Minute von -15 °C bis -100°C), 3 <u>Auftauraten</u>: <u>schnell</u> (75°C in 12 Sek), <u>mittel</u> (35°C in 30 Sek.), <u>langsam</u> (1°C in 2 Minute)</p>	<p>Ex. 3: 10 Mischlinge 10 Ej. 9 Mischlinge 9 Ej.</p>	<p>+ Fertilitätstest: intravaginaler KB von 24 Hd: 12 Hd Frisch- und 12 Kryosperma (Tris-Eidotter-3% Glycerin, 2 Std./5°C gekühlt, aufgetaut: 35°C/30 Sek.)</p>	<p>- kein Einfluss der Kühlrate auf die Motilität vor dem Gefrieren - beste Auftausergebnisse nach dem Auftauen bei mittleren Kühlraten - Auftaurate von 75°C/Minute am besten geeignet - kein Zusammenhang zwischen Kühl- und Auftaurate bezüglich der Motilität - 25 % tragend nach Kryosperma KB, 50 % nach Frischsperma KB</p>	<p>Rota et al., 1998</p>
<p>3 % oder 5 % Glycerin in einem Verdünnung mit 0,5 % Equex STM-Paste sowie Vergleich von zwei Abkühl- (geringer: 10°C Min -1 von -6 bis -40°C, schneller: 50°C -1 von -6 bis -40°C) und zwei Auftauraten (38°C/1Minute, 70°C/8 Sek).</p>	<p>4 div. Rassen 20 Ej.</p>	<p>- Motilität (Subj.) - Membranintegrität (nach 0, 1, 2, 3, 5 Std., bei 38°C)</p>	<p>- direkt nach dem Auftauen signifikant (p < 0,001) höhere Motilität und Membranintegrität mit 5 % Glycerinanteil - die Glycerinkonz. hatte keinen Effekt auf die Motilitätsabnahme während der Inkubationszeit, jedoch bei 5 % Glycerin während der Inkubationszeit signifikant höhere Abnahmen der Membranintegrität - die Einfrierate hatte keinen Einfluss auf die Lebensdauer, schnelle Auftauraten sind besser geeignet</p>	<p>Rota et al., 1998</p>
<p>Tris-Eidotter-Verdünnung</p>				
<p>Vergleich 3 % oder 5 % Glycerin, ein- und zweistufige Verdünnung mit 0,5 % Equex STM-Paste, gefrieren über flüssigem Stickstoff oder mit einem 'Biological Freezer'</p>	<p>5 k.A. Rassen 15 Ej.</p>	<p>- Motilität (Subj. nach 0, 1, 2, 3, 4 Std., CASA nach 0, 2 Std. bei 38°C) - Membranfunktion</p>	<p>- keine Unterschiede in Motilität (CASA) und Spermienmembranfunktion festgestellt - schnelle Motilitätsabnahme bei Verwendung eines 'Biological Freezer'</p>	<p>Rota und Mollo, 2005</p>
<p>Vergleich von Glycerin (2 - 12 %) und DMSO (0,5 - 3 %) sowie kombinierten Zusätzen aus DMSO (Endkonz. 0,33 - 1,33 %) und Glycerin (Endkonz. 4 - 10 %) mit verschiedenen Anpassungszeiten und -temperaturen</p>	<p>6 Beagle 163 Ej.</p>	<p>- Motilität/PM</p>	<p>- Glycerin besser geeignet als DMSO - beste Ergebnisse bei einer Kombination aus DMSO (0,33 - 0,99 %) und Glycerin (4 - 8 %) sowie einer Abkühlung auf 5°C innerhalb von 50 Minuten</p>	<p>Rohloff et al., 1978</p>

Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdüner

Ex. 1: Verdüner mit 2, 4, 6, 8 % Glycerin Ex. 2: 8 % Glycerin bei 37°C oder 4°C zugegeben (1, 2 Std. gekühltes Sperma)	pro Versuch 13 div. Rassen 91 Ej. (7 Mischej., je 13 Hd)	- PM (Subj.) - Lebend-Tot- Anteil - akrosomale Integrität (nach 0, 0,5, 1, 2, 4 Std., 39°C)	Ex. 1: 8 % Glycerin am besten Ex. 2: Keine Unterschiede beim Zeitpunkt der Glycerinzugabe	Peña et al., 1998a
Verdüner ohne Zusatz, mit 20 % Eidotter, mit 6 % Glycerin, mit 20 % Eidotter und 6 % Glycerin	12 div. Rassen 12 Ej.	- Motilität - Viabilität - Morphologie	beste Ergebnisse bei gemeinsamer Verwendung von Eidotter und Glycerin	Silva et al., 2002

Abkürzungen: CASA = Computer-Assistierte Sperma-Analyse, div. = diverses, DMSO = Dimethylsulfoxid, Ej. = Ejakulate, Ex. = Experiment, Hd = Hunde, k. A. = keine Angabe, KB = Künstliche Besamung, Konz. = Konzentration, M = Molar, Mischej. = Mischejakulat, p = p-Wert, PM = Progressive Motilität (%), Sek. = Sekunde(n), Std. = Stunden, Subj. = Subjektiv

2.7.1.1.2 Dimethylsulfoxid

Die Auswirkung eines Zusatzes von Dimethylsulfoxid (DMSO) in Konzentrationen zwischen 0,33 % und 4 % wurde bereits in Tris-Eidotter-, aber auch einem Laktose-Eidotter-Verdüner untersucht.

In vergleichenden Untersuchungen bezüglich der Gefrierschutzwirkung von Glycerin und DMSO wurden verschiedene Glycerinkonzentrationen (2 - 12 %), DMSO Konzentrationen (0,5 - 3 %) als auch kombinierte Zusätze aus DMSO (Endkonz. 0,33 - 1,33 %) und Glycerin (Endkonz. 4 - 10 %) mit diversen Anpassungszeiten in einem Tris-Eidotter-Verdüner verwendet. Dabei zeigte sich, dass Glycerin als Gefrierschutzsubstanz besser geeignet ist als DMSO. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Kombination aus DMSO (Endkonz. 0,33 - 0,99 %) und Glycerin (4 - 8 %) erreicht (Abkühlung auf 5°C innerhalb von 50 Minuten) (Rohloff et al., 1978) (Tab. 1). Im Gegensatz dazu wurden in einer Studie von Olar et al. (1989) (Tab. 1), die sowohl einen Tris-Eidotter- als auch einen Laktose-Eidotter-Verdüner verwendeten, durch alleinige Zugabe von DMSO beziehungsweise in Kombination mit Glycerin keine Vorteile erzielt. Die von Olar et al. (1989) verwendete DMSO-Konzentration (2 % und 4 %) lag über der nach Rohloff et al. (1978) nicht zu überschreitenden Konzentration von 1 % DMSO, da in ihren Untersuchungen eine Kombination aus niedriger DMSO-Konzentration (Endkonz. 0,33 - 0,99 %) zusammen mit Glycerin (4 - 8 %) besonders erfolgreich war. Die Ergebnisse von Rohloff et al. (1978) lassen eine Wechselbeziehung zwischen DMSO und Glycerin vermuten. Eine Endkonzentration von maximal 8 % Glycerin und 1 % DMSO sollte dabei nicht überschritten werden. In beiden Studien wurde ausschließlich die Motilität als Beurteilungskriterium herangezogen.

Bei einem Vergleich von fünf verschiedenen Verdünnern zeigten Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdüner ohne und mit 1 % DMSO-Zusatz bessere Ergebnisse, als die getesteten Glukose- und Fruktose-Verdüner, die kein DMSO enthielten (Ceylan und Serin, 2006) (Tab. 3).

2.7.1.1.3 Ethylenglykol, Methylformamid und Dimethylformamid

Die Effekte eines Ethylenglykol-Zusatzes wurden bereits in verschiedenen Tris-basierenden Verdünnern, aber auch in einem Laktose-Glukose-EDTA-Eidotter-Verdüner mit Equex STM-Paste untersucht. Die getesteten Verdüner enthielten

zwischen 4 und 8 % Ethylenglykol (Martins-Bessa et al, 2006; Oliveira et al., 2006; Rota et al., 2006; Alves et al., 2008) bzw. zwischen 0,25 und 1 M (Soares et al. 2002).

Dimethylformamid wurde in Konzentrationen zwischen 3 und 6 % und Methylformamid in einer Konzentration von 3 % als alternative Kryoprotektiva zur Tiefgefrierkonservierung von Rüdensperma untersucht (Oliveira et al., 2006; Futino et al., 2010; Lopes et al., 2009a).

Die Verwendung von Ethylenglykol anstelle von Glycerin sowie Ethylenglykol und Glycerin führte in Tris-Eidotter- (Alves et al., 2008) und Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünnern zu keiner signifikanten Verbesserung der Spermaqualität (Soares et al., 2002; Martins-Bessa et al., 2006) (Tab. 2). Untersuchungen von Martins-Bessa et al. (2006) an verschiedenen Tris-Eidotter-basierten Verdünnern (Tab. 2) zeigten im getesteten Uppsala-System 2 die besten Auftauergebnisse, gefolgt vom Tris-Eidotter-Verdüner mit 5 % Ethylenglycol und Equex STM-Paste. Der untersuchte Norwegische-Verdüner und 4 % Ethylenglycol-Verdüner lieferten ähnliche Ergebnisse. Rota et al. (2006) konnten einen kurzzeitigen positiven Effekt von Ethylenglykol in einem Equex STM-Paste enthaltenden Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdüner nachweisen (Tab. 2). Vergleicht man einen 5 % Ethylenglykol enthaltenden Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter- Verdüner mit einem Laktose-Glukose-EDTA-Eidotter-Verdüner mit Equex STM-Paste und 5 % Ethylenglykol beziehungsweise 5 % Dimethylformamid, so zeigten sich bessere kryoprotektive Eigenschaften im Verdüner mit Laktose und Dimethylformamid (Oliveira et al., 2006) (Tab. 2). Mit 6 % Dimethylformamid-Zusatz, im Vergleich zu 6 % Glycerin in einem Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdüner konnte die Motilität jedoch nicht adäquat aufrechterhalten werden (Lopes et al., 2009a). Ein direkter Vergleich von Methylformamid, Dimethylformamid und Glycerin (je 3 %) in einem Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdüner zeigte nach dem Auftauen hingegen vergleichbare Ergebnisse zwischen Methylformamid und Glycerin. Daher scheint Methylformamid als Alternative zu Glycerin geeigneter zu sein (Futino et al., 2010) (Tab. 2). Des Weiteren scheint Dimethylformamid in Tris-basierten Verdünnern im Gegensatz zu Laktose enthaltenden Verdünnern (Oliveira et al., 2006) weder in Konzentrationen von 3 (Futino et al., 2010) noch 6 % (Lopes et al., 2009a) eine geeignete Alternative zu Glycerin darzustellen.

Tab. 2: Zusammenfassende Darstellung von Untersuchungen zur Auswirkung eines Zusatzes von Methylformamid, Dimethylformamid und Ethylenglykol in Tris-basierenden Verdünnern zur Kryokonservierung von caninem Sperma

Verdüner	Anzahl/ Rasse/ Ejakulate	Parameter	Ergebnisse	Literatur
Tris-Eidotter-Verdüner				
Vergleich verschiedene Konz. von Glycerin (6, 8 %) und Ethylenglykol (5 %)	5 k. A. 18 Ej. (6 Mischej.)	- PM - Thermoresistenztest (4 Std. bei 39°C)	- 8 % Glycerin zeigte die besten Ergebnisse	Alves et al., 2008
Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdüner				
Vergleich von Ethylenglykol (0,25, 0,5, 1 M) (Kontrollgruppe mit 0,8 M Glycerin)	4 4 DSH k. A.	- Motilität - Viabilität - Morphologie (vor TG, nach Auftauen)	- keine Unterschiede in Motilität und Morphologie zwischen den Gruppen feststellbar - geringere Viabilität bei 1 M Ethylenglykol	Soares et al., 2002
Vergleich verschiedener Verdüner mit: - 4 % oder 8 % Ethylenglykol - 4 % Ethylenglykol und 4 % Glycerin - 5 % Ethylenglykol und 0,5 % Equex - Uppsala-System 2 (5 % Glycerin, 0,5 % Equex STM-Paste) - Norwegischer-Verdüner (Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdüner mit 8 % Glycerin)	13 div. Rassen 15 Ej. (5 Mischej. zu je 3 Ej.)	- Motilität (Subj., CASA) - Langlebigkeit (alle 30 Minuten bis Motilität nahe 0) - Plasmamembran- und Akrosomenmembran-Integrität (Flow-Cytometrie) - Lebend-Tot- Anteil	- keine signifikanten Verbesserungen durch Ethylenglykol - beste Auftauergebnisse zeigte der Uppsala 2-Verdüner	Martins-Bessa et al., 2006
Vergleich verschiedener Verdüner: - Tris-Citrat-Fruktose-Eidotter-5 % Ethylenglykol - Laktose-Glukose-EDTA-Eidotter-5 % Ethylenglykol mit 0,5 % Equex STM-Paste	5 div. Rassen 15 Ej.	- PM - Viabilität (nach 0, 30, 60, 90, 120 Minuten) - strukturelle und	- direkt nach dem Auftauen keine wesentlichen Unterschiede bei den untersuchten Verdünnern - bessere kryoprotektive Eigenschaften der	Oliveira et al., 2006

<p>- Laktose-Glukose-EDTA-Eidotter-5 % Dimethylformamid mit 0,5 % Equex STM-Paste</p>	<p>Vergleich von Methylformamid, Dimethylformamid und Glycerin (je 3 %)</p>	<p>5 4 Labradore, 1 Springerspaniel 25 Ej. (Ej von 3 Hd bilden Mischej., 5 mal abgesamt)</p>	<p>Nach dem Auftauen: - Morphologie - Membranintegrität während eines Thermoresistenztests: - PM/Motilität (Subj.) - Viabilität</p>	<p>Verdüner die Laktose und Dimethylformamid enthielten - nach dem Auftauen vergleichbare Ergebnisse bei Glycerin und Methylformamid - Dimethylformamid weniger geeignet</p>	<p>Futino et al., 2010</p>
<p>Vergleich von Dimethylformamid und Glycerin (je 6 %)</p>	<p>5 3 Amerikan Pit-Bull-Terrier, 1 Bull-Terrier, 1 Mischling 15 Ej.</p>	<p>- PM (Subj.) - CASA Motilität (Sperm Class Analyser) - Membranintegrität - Anteil lebender Spermien (Nach dem Auftauen)</p>	<p>- Dimethylformamid ist keine Alternative zu Glycerin - keine adäquate Aufrechterhaltung der Motilität</p>	<p>Lopes et al., 2009a</p>	
<p>Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdüner</p>					
<p>Vergleich von Ethylenglykol und Glycerin (je 5 %) (Verdüner enthält 0,5 % Equex STM-Paste)</p>	<p>5 k.A. 10 Ej.</p>	<p>- Motilität (Subj., CASA CEROS12.1M Analyser, Hamilton-Thorne) - Plasmamembranintegrität - Langlebigkeit (nach 0, 1, 2, 3, 4 Std.)</p>	<p>- nur kurzzeitiger positiver Effekt von Ethylenglykol feststellbar</p>	<p>Rota et al., 2006</p>	

Abkürzungen: CASA = Computer-Assistierte Sperma-Analyse, div. = diverses, Ej. = Ejakulate, Hd = Hunde, k. A. = keine Angabe, Konz. = Konzentration, M = Molar, Mischej. = Mischejakulat, p = p-Wert, PM = Progressive Motilität (%), Sek. = Sekunde(n), Std. = Stunden, Subj. = Subjektiv

2.7.1.1.4 Zuckerzusätze

In Tris-basierenden Verdünnern zur Kryokonservierung von caninem Sperma wurden folgende Zuckerkomponenten untersucht (Yildiz et al., 2000; Ceylan und Serin, 2006; Yamashiro et al., 2007):

- Monosaccharide: Fruktose, Galaktose, Glukose, Xylose
- Disaccharide: Laktose, Trehalose, Maltose, Sucrose
- Trisaccharide: Raffinose

Die Effekte diverser Zucker (Fruktose, Galaktose, Glukose, Xylose, Laktose, Trehalose, Maltose, Sucrose, Raffinose zu je 70 mM) wurden vergleichend in einem Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünner untersucht. Nach dem Auftauen wurden die subjektive Motilität, der Anteil lebender Spermien und die akrosomalen Veränderungen beurteilt. Disaccharide, außer Laktose, reduzierten den Anteil toter Spermien nach dem Auftauen. Monosaccharide hingegen, vor allem Fruktose und Xylose, verbesserten die Motilität. Bei den Zuckern Trehalose, Xylose und Fruktose konnte eine signifikante Erhöhung des Anteils an aktiven Spermien festgestellt werden (Yildiz et al., 2000) (Tab. 3). Auch Ceylan und Serin (2006) stellten positive Effekte vor allem bei der Verwendung von Fruktose enthaltenden Tris-Verdünnern auf die Motilität, Viabilität und akrosomaler Integrität fest (verglichen zu Glukose- und Fruktose-Verdünnern) (Tab. 3).

Hingegen zeigten sich bei einer Gegenüberstellung von einem Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-, einem Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter- sowie einem Laktose-Eidotter-Verdünner in zwei unterschiedlichen Konfektionierungsmethoden (Aluminiumtube und Pelletmethode) beurteilt anhand der subjektiven PM, Überlebenszeit (Anteil der PM, alle 60 Minuten, insgesamt 300 Minuten, Inkubation bei 37°C) und der Morphologie (nach dem Auftauen) im Laktose-Verdünner in einer Aluminiumtube die besten Motilitäten, der höchste Anteil intakter Akrosomen und die zweitbesten Überlebensraten (256 Minuten). Im Tris-Glukose-Verdünner in einer Aluminiumtube wurden die zweithöchsten Motilitäten und die höchste Überlebensrate festgestellt (Ivanova-Kicheva et al., 1997). Im Gegensatz dazu erhielten Thomas et al. (1993) mit einem Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdünner in Pelletform höhere subjektive Motilitäten verglichen zu einem Tris-Bes-Laktose-Glukose-Eidotter-Verdünner (in Pellets mit 100 µl oder Straws mit 0,5 und 2,5 ml).

Yamashiro et al. (2007) und Yildiz et al. (2000) stellten beide statistisch signifikante positive Effekte durch die Verwendung von Trehalose fest (Tab. 3). Yamashiro et al.

(2007) untersuchten einen Tris-Glukose-Citrat-Eidotter und einen Trehalose-Eidotter-Verdüner, die beide Natriumdodecylsulfat (SDS) und Bovines Serum Albumin enthielten. Im Sperma-Motilitäts-Index nach Comizzoli et al. (2001) [$\text{SMI} = \% \text{ motile Spermien} + (\text{PM} \times 20) / 2$] zeigten sich mit dem Trehalose-Eidotter-Verdüner die besten Ergebnisse. Auch im Thermoresistenztest, bei der die Überlebensfähigkeit der Spermien bei 37 - 38°C untersucht wurde, war der Trehalose-Tris-Eidotter-Verdüner überlegen. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die akrosomale Integrität festgestellt.

Tab. 3: Zusammenfassende Darstellung von Untersuchungen zur Auswirkung eines Zusatzes von Zuckern in Tris-basierenden Verdünnern zur Kryokonservierung von caninem Sperma

Verdüner	Anzahl/ Rasse/ Ejakulate	Parameter	Ergebnisse	Literatur
Tris-Citrat-Fruktose-Eidotter-Verdüner Vergleich verschiedener Zuckerzusätze (je 70 mM): - Monosaccharide: Fruktose, Galaktose, Glukose, Xylose - Disaccharide: Laktose, Trehalose, Maltose, Sucrose - Trisaccharid: Raffinose	5 Mischlinge 3 - 4 Ej. je Hd	- Motilität (Subj.) - Lebend-Tot- Anteil - akrosomale Veränderungen	- Disaccharide, außer Laktose, reduzieren den Anteil toter Spermien - Monosaccharide, v.a. Fruktose und Xylose, verbessern die Motilität - Trehalose, Xylose und Fruktose erhöhen signifikant den Anteil aktiver Spermien	Yildiz et al., 2000
Vergleich verschiedener Konzentrationen und Verdüner A: Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdüner B: Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdüner C: Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdüner D: Fruktose-NaCitrat-Eidotter-Verdüner E: Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-DMSO-Verdüner	6 div. Rassen 72 Ej.	- Motilität - Viabilität - akrosomale Integrität (nach Verdünnung, nach 0, 1, 3 Std. bei 38°C)	nach dem Auftauen zeigten Tris-Fruktose-Verdüner (A, E) bessere Ergebnisse als Glukose- (B, C) und Fruktose-Verdüner (D)	Ceylan und Serin, 2006
Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdüner Vergleich von Tris-Citrat-Glukose-Eidotter- und Tris-Trehalose-Eidotter-Verdüner (beide mit 0,04 % SDS und bovinem Serum Albumin, Endkonz. 1,5 %) sowie einer Samenentnahme durch eine künstliche Vagina und manuelle Massage, es wurde in Pellet's gefroren	2 Pudel 6 Ej.	- Sperma-Motilitäts- Index nach Comizzoli et al. (2001) - akrosomale Integrität (TRT)	- Trehalose-Eidotter-Verdüner im Thermoresistenztest besser - Sperma-Motilität-Index am höchsten bei der künstlichen Vagina in Kombination mit einem Trehalose-Eidotter-Verdüner	Yamashiro et al., 2007

Abkürzungen: div. Rassen = diverse Rassen, DMSO = Dimethylsulfoxid, Ej. = Ejakulate, Hd = Hunde, Mischej. = Mischejakulat, SDS = Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfat), Std. = Stunden, Subj. = Subjektiv, TRT = Thermoresistenztest

2.7.1.1.5 Natriumdodecylsulfat als Verdünnerzusatz

Natriumdodecylsulfat ist ein Synonym für Natriumlaurylsulfat (engl. Sodiumdodecylsulfat, SDS), ein anionisches Tensid, welches als Detergens Verwendung findet. SDS enthaltende Verdünnerzusätze sind Equex STM-Paste (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), Equex-Pasta (Minitüb, Tiefenbach) (Peña et al., 2003a), Orvus WA®-Paste (Thomas et al., 1992) und Orvus ES-Paste (Hori et al., 2006).

2.7.1.1.5.1 Equex STM-Paste

Equex STM-Paste ist ein häufig verwendetes Detergens in Tris-basierenden Verdünnermedien; in der Regel wird eine Endkonzentration von 0,5 % eingesetzt (Rota et al., 1997, 1998; Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Peña et al., 2003a, b; Petrunkina et al., 2005; Rota und Mollo, 2005; Martins-Bessa et al., 2006; Michael et al., 2007; Ponglowhapan und Chatdarong, 2008; Alhaider und Watson, 2009). Andere Autoren verwendeten Konzentrationen zwischen 1 und 2,5 % (Stornelli et al., 2006; Beccaglia et al., 2009).

In einer vergleichenden Untersuchung von 4 Ejakulaten ergaben sich bei der Konservierung bessere Ergebnisse nach Zusatz von 1,5 bzw. 2,5 % Equex STM-Paste als ohne (Tab. 4; Stornelli et al., 2006). Jedoch waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen feststellbar (Stornelli et al., 2006).

Equex STM-Paste verbessert die Langlebigkeit der Spermien, was vermutlich in Zusammenhang mit erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen bei einem Großteil der Spermienpopulationen steht (Peña et al., 2003a, b; Alhaider und Watson, 2009) (Tab. 4).

Die Verwendung von Equex STM-Paste führt ebenfalls zu einer Verbesserung der Motilität (Rota et al., 1997; Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Ponglowhapan und Chatdarong, 2008; Alhaider und Watson, 2009) (Tab. 4). Es wird jedoch kontrovers diskutiert, ob es bereits unmittelbar nach dem Auftauen (Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Ponglowhapan und Chatdarong, 2008; Alhaider und Watson, 2009) oder erst nach Inkubation zu einer verbesserten Motilität kommt (Rota et al., 1997; Peña et al., 2003b). Im Gegensatz zu anderen Autoren gelang es Petrunkina et al. (2005) nicht, positive Effekte auf die Motilität nachzuweisen.

Des Weiteren wurde ein protektiver Effekt auf die Volumenregulation der Spermienzelle und eine verbesserte Membranintegrität (Rota et al., 1997; Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Petrunkina et al., 2005) außer bei einer Verwendung von epididymalem Sperma beobachtet (Ponglowhapan und Chatdarong, 2008).

Als weiterer Vorteil der Equex STM-Paste sind eine geringere Akrosomdegeneration (Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Petrunkina et al., 2005; Ponglowhapan und Chatdarong, 2008) sowie ein geringerer Anteil an akrosomreagierten, toten Spermien zu erwähnen (Petrunkina et al., 2005). Equex STM-Paste schützt vor bzw. reduziert kapazitationsbedingte Veränderungen in aufgetauten Hundespermien (Peña und Linde-Forsberg, 2000a). Dabei ließen sich geringgradig höhere Trächtigkeitsraten und Wurfgrößen nach intrauteriner Besamung mit 1,5 % Equex STM Pasten-Zusatz erzielen (Stornelli et al., 2006). Interessanterweise scheint der positive Einfluss von Equex auf Tris-basierende Verdünner beschränkt zu sein, da sich der Zusatz zu einem Protein-Verdünner mit 0,04 % Sojabohnen-Lecithin negativ auswirkte (Beccaglia et al., 2009) (Tab. 4).

Zwischen den Hunden wurden individuelle Variationen im Ansprechen auf Equex STM-Paste festgestellt, was individuelle Variationen in Bezug auf die Gefriertauglichkeit erklären könnte (Alhaider und Watson, 2009).

Final zu bemerken ist, dass Equex STM-Paste in ihrer Zusammensetzung nicht mit Equex STM-Pasta (Minitüb) vergleichbar ist, detaillierte Informationen über die Zusammensetzung sind jedoch nicht verfügbar.

Tab. 4: Zusammenfassende Darstellung von Untersuchungen zur Auswirkung eines Zusatzes von Equex STM-Paste und Pasta in Tris-basierenden Verdünnern zur Kryokonservierung von caninem Sperma

Verdüner	Anzahl/ Rasse/ Ejakulate	Parameter	Ergebnisse	Literatur
Tris-Eidotter-Verdüner				
Zellvolumenregulation (unter hypo-, iso- und hyperosmotischen Bedingungen) und Membranintegrität mit bzw. ohne 0,5 % Equex STM-Paste im Verdüner	8 Beagle 16 Ej.	- Volummessungen (CASY1 Cell Counter) - Membranintegrität (Flow-Cytometrie) nach Inkubation in Ca-Medium - Motilität (CASA, Cell-Motion-Analyser, Minitüb)	- Equex STM-Paste schützt die volumenregulierenden Funktionen der Spermienzelle und verringert die Membrandestabilisierung und Akrosomdegeneration - keine signifikanten Effekte auf die Motilität direkt nach dem Auftauen	Petrunkina et al., 2005
Effekt von 0, 1,5, 2,5 % Equex STM-Paste auf Ultrastruktur und Fertilität	4 DSH 4 Ej.	- TEM - Motilität - lineare Geschwindigkeit - Lebend-Färbung - Plasmamembranintegrität - akrosomale Morphologie - 14 intrauterine KB (verschiedene Rassen) mit 0 oder 1,5 % Equex STM-Pasten Zusatz im Verdüner	- Aufbesserung der Spermienparameter durch Equex STM-Paste - keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konz., außer ggf. höherer Motilität bei 2,5 % aber weniger intakte Akrosomen - Trächtigkeitsrate und Wurfgröße ggf. höher (nicht signifikant) mit Equex Zusatz	Stornelli et al., 2006
Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdüner				
Effekte von Equex STM-Paste (0,5 %) auf die Qualität von aufgetautem epididymalem Sperma (Kontrollgruppe ohne Equex Zusatz)	13 div. Rassen k. A.	- Motilität (PM, Subj.) - Plasmamembran und akrosomale Integrität (nach Entnahme, Equilibrierung, 0, 2 Std. nach dem Auftauen, Thermoresistenztest)	- Equex schützt die akrosomale Integrität der Spermien vor kryokonservierungsbedingten Schäden und erhält die Motilität bei Inkubation - keine Effekte auf die Plasmamembranintegrität - keine Verbesserung der relativ geringen	Ponglowhapan und Chatdarong, 2008

				Gefrierkapazität von epididymalem Sperma auf ein Level von ejakuliertem Sperma mit Equex möglich	
Tris-Citrat-Glukose-Eidotter-Verdüner					
Verdüner mit oder ohne Equex STM-Paste (0,5 %) (Zweihasenverdünner)	7 div. Rassen 7 Ej.	- Motilität - Plasmamembranintegrität (nach dem Verdünnen, nach dem Auftauen und nach 1, 2, 3 Std. bei 38°C)		- keine signifikanten Motilitätsunterschiede direkt nach dem Auftauen, jedoch nach Inkubation mit Equex STM-Paste verbesserte Langlebigkeit - gesteigerte Plasmamembranintegrität mit Equex STM-Pasten Zusatz	Rota et al., 1997
- mit und ohne 0,5 % Equex STM-Paste im Verdüner, 1- oder 2-stufige Verdünnung - Verdüner ohne Equex STM-Paste mit 3 % oder 7 % Glycerin - 2 Gefriermethoden untersucht (horizontal in Styroporbox / vertikales Absenken in Stickstofftank) - 2 Auftauraten (70°C/8 Sek., 37°C/15 Sek.)	8 div. Rassen 10 Ej. (1 Mischej.)	- Motilität (Subj., CASA) (nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 Std.) - Membranintegrität - Akrosomaler Status (Flow-Cytometer) (nach 1, 3, 6 Std.) - Inkubation bei 38°C		- Equex verbessert die Kryokonservierbarkeit - mit Equex Zusatz: 2 stufige Verdünnung und Styroporbox sowie Auftauen bei 70°C besser - ohne Equex: kein Einfluss der Anzahl an Verdünnungsstufen und keine Unterschiede in der Glycerinkonz. bezüglich der beurteilten Parameter feststellbar	Peña und Linde-Forsberg, 2000a
Ex. 1: Vergleich Equex STM-Paste und Equex-Pasta (je 0,5 %, Minitüb, Tiefenbach, D) Ex. 2: direkt nach dem Auftauen Probenverdünnung (1 : 5) mit Glukose- oder Fruktose-Tris Puffer (Verdüner mit 0,5 % Equex STM-Paste) Ex. 3: Inkubation in caninem Kapazitationsmedium ohne oder mit Zusatz von 5 µg/ml Heparin (Verdüner mit 0,5 % Equex STM-Paste)	8 div. Rassen 16 Ej. (8 Ej. für Ex. 1 + 2, 8 Ej. für Ex. 3)	Ex. 1 und 2: - Motilität (nach 0, 1, 2, 3, 4, 5 Std. bei 38°C) - Plasmamembranintegrität und akrosomaler Status (Flow-Cytometrie) - intrazelluläre Ca ²⁺ Konz. (nach 1, 4, 7 Std. bei 38°C) Ex. 3: - Motilität (Subj., CASA Sperm Class Analyser, V 5.0, Microptic, Barcelona, Spanien)	Ex. 1: Equex STM-Paste verbessert die Spermien Langlebigkeit, diese steht in Zusammenhang mit erhöhten intrazellulären Ca ²⁺ Konzentrationen bei einem Großteil der Spermienpopulationen Ex. 2: - keine signifikanten Unterschiede in der Spermienlanglebigkeit feststellbar (Glukose ggr. mehr lebende Spermien mit intaktem Akrosom nach Inkubation) Ex. 3: - nach Inkubation unter Kapazitationsbedingungen zeigte sich eine	Peña et al., 2003a	

		<ul style="list-style-type: none"> - Viabilität - intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration - Plasmamembranintegrität - akrosomaler Status (TEM) (zu div. Zeiten, Max. nach 48 Std.) 	<p>anhaltende Spermienlanglebigkeit und die Möglichkeit zur Reduktion des intrazellulären Ca²⁺ Gehaltes</p> <ul style="list-style-type: none"> - Heparin zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Parameter 	
<p>Vergleich von Equex STM-Paste und Equex-Pasta (je 0,5 % (Minitüb, Tiefenbach, D), Kontrollgruppe ohne Equex Zusatz)</p>	<p>8 div. Rassen 8 Ej.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Motilität (Subj., CASA Sperm Class Analyser) (nach 0, 1, 2, 3, 4, 5 Std. bei 38°C) - Viabilität - Plasmamembranintegrität und akrosomaler Status (Flow-Cytometrie, TEM) - intrazelluläre Ca²⁺ Konz. (nach 1, 4, 7 Std. bei 38°C) 	<ul style="list-style-type: none"> - Equex STM-Paste verbessert die Spermienlanglebigkeit, diese steht in Zusammenhang mit erhöhten intrazellulären Ca²⁺ Konzentrationen bei einem Großteil der Spermienpopulationen - mit Equex-Pasta nur geringfügige Verbesserungen der Spermienparameter im Vergleich zur Kontrollgruppe 	Peña et al., 2003b
<p>Verdüner mit 1 % Equex (von Sigma chemical Company, St. Louis, USA) im Vergleich zu Protein-Verdüner ohne tierische Produkte (0,04 % Soybean Lecithin mit und ohne Equex Zusatz)</p>	<p>5 k. A. k. A..</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Motilität (Subj.) - Kapazitations-Status - Akrosomale Integrität - Zona pellucida Bindungskapazität (nach der Entnahme, vor TG, nach dem Auftauen) 	<ul style="list-style-type: none"> - Tris-Glukose-Eidotter-Verdüner mit 1 % Equex und Protein-Verdüner mit 0,04 % Soybean Lecithin ohne Equex erzielten vergleichbare Ergebnisse - nur der Zusatz von Equex zum Protein-Verdüner hatte negative Effekte auf die gemessenen Parameter 	Beccaglia et al., 2009

Abkürzungen: CASA = Computer-Assistierte Sperma-Analyse, div. Rassen = diverse Rassen, DSH = Deutscher Schäferhund, Ej. = Ejakulate, Ex. = Experiment, ggf. = gegebenenfalls, Hd = Hunde, k. A. = keine Angabe, KB = Künstliche Besamung, Mischej. = Mischejakulat, PM = Progressive Motilität (%), Sek. = Sekunde(n), Std. = Stunden, Subj. = Subjektiv, TEM = Transmissionselektronenmikroskopie

2.7.1.1.5.2 Diverse Natriumdodecylsulfathaltige Verdünnerzusätze

Der kommerzielle Verdünnerzusatz Orvus WA®-Paste (Procter und Gamble, Cincinnati, USA) enthält neben SDS noch Natriumsulfat, Laurylalkohol und Wasser. Außer SDS ist über die genauere Zusammensetzung der Orvus ES-Paste (Procter und Gamble, Cincinnati, USA und Nova Chemical Sales, Inc., MA, USA) nichts bekannt. Beide Pasten wurden in Konzentrationen zwischen 0 und 2 % in Tris-basierenden Verdünnern untersucht. Des Weiteren wurde SDS (Fa. Schwarz/Mann Biotech, Division of ICN Biomedicals, Inc., Cleveland, OH, USA) als Einzelkomponente in Konzentrationen zwischen 0 und 5 % und 0 - 4 mg/ml verwendet.

Bei einem Vergleich verschiedener SDS-Konzentrationen (0, 0,1, 0,25, 0,5 %) in einem Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünner wurden eine längere Lebensdauer und höhere Viabilität mit 0,25 % SDS festgestellt. Es wurden die Parameter Motilität, Viabilität, akrosomale Integrität (nach 0, 0,5, 1, 2, 4 Stunden), Lebensdauer (2 Stunden Intervalle bis die Motilität weniger als 10 % beträgt), subjektive PM und lebend-tot-Anteil untersucht. Eine schnellere Abnahme der Lebensdauer und der Viabilität wurde unabhängig von der SDS-Konzentration nach Inkubation bei 39°C verglichen mit 22°C festgestellt (Peña et al., 1998c).

Hori et al. (2006) verwendeten 0, 1, 2, 3, 4 mg/ml SDS sowie 0,75 % Orvus ES-Paste in einem Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünner. Die geeignetste SDS-Konzentration war hier 2 mg/ml, mit der sich vergleichbare Motilität, Viabilität und Anteil intakter Akrosomen bei lebenden Spermien zur untersuchten Orvus ES-Paste zeigten (Tab. 5). Auch Tsutsui et al. (2000a, b) stellten positive Effekte, wie verbesserte Motilität, Viabilität und einen Schutz des Akrosoms durch Zusatz von Orvus ES-Paste in einem Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünner fest (Tab. 5). Des Weiteren zeigten sich hohe Trächtigkeitsraten (90 %) nach intrauteriner Besamung bei Verwendung von 0,75 % Orvus ES-Paste in einem Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünner (Tsutsui et al., 2000c) (Tab. 5). In Tris-Glukose-Citrat- und Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdünnern konnte durch Zusatz von 1 % Orvus ES-Paste ebenfalls eine Verbesserung der Spermaqualität nach dem Auftauen erzielt werden (Nizanski et al., 1997, 2001) (Tab. 5).

Der Vergleich verschiedener Orvus WA-Pasten®-Konzentrationen (0, 0,25, 0,5, 1, 2 %) in einem Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdünner zeigte die höchste PM erst

während einer Inkubationszeit von insgesamt 18 Stunden bei 22°C. Als besonders vorteilhaft erwiesen sich dabei 1 %ige Zusätze (Thomas et al., 1992).

Tab. 5: Zusammenfassende Darstellung von Untersuchungen zur Auswirkung eines Zusatzes von Orvus ES-Paste in Tris-basierenden Verdünnern zur Kryokonservierung von caninem Sperma

Verdünnern	Anzahl/ Rasse/ Ejakulate	Parameter	Ergebnisse	Literatur
Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünnern				
Vergleich verschiedener Orvus ES-Pasten Konz. (0, 0,5, 0,75, 1, 2 %)	10 Beagle 18 Ej. (Ej. von 3 Hd Mischej., 6 Wiederholungen)	- Motilität - Viabilität (vor TG, nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 Std. bei 20°C)	- höhere Motilitäten mit 0,5 - 1 % Orvus ES-Paste im Verdünnern	Tsutsui et al., 2000a
0,75 % Orvus ES-Paste	5 Beagle 5 Ej.	- akrosomaler Status - Motilität - Viabilität (nach Entnahme und nach dem Auftauern)	- Orvus ES-Paste schützt das Akrosom - höhere Motilität und Viabilität	Tsutsui et al., 2000b
0,75 % Orvus ES-Paste	13 Beagle	- Motilität - Viabilität (nach dem Auftauen) - einmalige KB: 1. intrauterine KB nach Laparotomie 2. intravaginal KB mit und ohne Orvus ES-Paste	- keine Trächtigkeit ohne Orvus ES- Paste - hohe Trächtigkeitsrate (90 %) mit intrauteriner Besamung und Orvus ES-Paste	Tsutsui et al., 2000c
0, 1, 2, 3, 4 mg/ml SDS verglichen mit 0,75 % Orvus ES-Paste	6 Beagle (6 Wiederholungen, Ej. von 2 - 3 Hd, Mischej.)	- Motilität - Viabilität - Spermienabnormalitäten (vor TG, nach 0, 1, 2, 4, 6 Std.) - Beurteilung des Akrosoms am lebenden Spermium bei 2 mg/ml SDS, Orvus ES-Paste (vor TG, nach Auftauen, nach 6 Std.)	- 2 mg/ml geeignetste SDS Konz. - keine signifikanten Unterschiede zwischen 2 mg/ml SDS und Orvus ES-Paste in Bezug auf Motilität, Viabilität und Anteil intakter Akrosomen bei lebenden Spermien	Hori et al., 2006

Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdüner				
Verdüner Vergleich mit und ohne Zusatz von 1 % Orvus ES-Paste sowie Vergleich von in Minitubes, Straws und in Pellets gefrorenen Proben	37 35 reinrassig, 2 Mischlinge 127 Ej. (42 Ej. von 14 Hd: Verdüner mit Orvus ES Paste in Pellets und Minitubes gefroren; 85 Ej. von 23 Hd: Verdüner mit und ohne Orvus ES Paste in Straws und Pellets gefroren)	- Motilität (Subj.) - Akrosomenmorphologie - Langlebigkeit (PM nach 60, 120, 180, 240, 300 Minuten bei 22°C) - Aspartat-Aminotransferase-Aktivität der extrazellulären Flüssigkeit	- Pellets besser geeignet als Minitubes - keine Unterschiede zwischen Pellets und Straws - mit Orvus ES-Pasten Zusatz höhere Lebensdauer unabhängig von der Methode	Nizanski et al., 2001
Tris-Glukose-Citrat-Verdüner				
mit und ohne 1 % Orvus ES-Pasten Zusatz, in Pellets gefroren	22 16 reinrassig, 6 Mischlinge 65 Ej.	- PM (nativ, nach Equilibrierung, nach Auftauen) - Langlebigkeit (5 Std. bei 22°C) - Anteil intakter Akrosomen	- Orvus ES-Paste enthaltende Proben zeigten bessere Ergebnisse - auch gute Ergebnisse mit der Pellet Methode möglich	Nizanski et al., 1997

Abkürzungen: Ej. = Ejakulate, Hd = Hunde, KB = künstliche Besamung, Konz. = Konzentration, Mischej. = Mischejakulat, PM = Progressive Motilität (%), SDS = Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfate), Std. = Stunde(n), Subj. = Subjektiv

2.7.1.1.6 Low Density Lipoproteine

Der Zusatz von LDL wurde bereits in Tris-Glukose- (Varela Junior et al., 2009) und Tris-Fruktose-Citrat-Verdünnern (Bencharif et al., 2008, 2010) untersucht. LDL werden als die entscheidenden kryoprotektiven Bestandteile des Eidotters angesehen. Der Zusatz von Konzentration zwischen 4 und 10 % ergab signifikant bessere Auftauergebnisse im Vergleich zu eidotterhaltigen Verdünnern (Bencharif et al., 2008, 2010; Varela Junior et al., 2009).

Hierbei erwies sich ein Zusatz von 6 % LDL in einem Tris-Fruktose-Citrat-Verdünnern als besonders förderlich; ein Einfluß auf die Fertilität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Bencharif et al., 2008) (Tab. 6). Bei weiterer Zugabe von Glutamin konnten bei hohen Konzentrationen (60 - 100 mmol) negative Auswirkungen, bei Konzentrationen von 20 mmol jedoch positive Effekte auf die Spermienmotilität und den Anteil intakter Spermien nach Kryokonservierung nachgewiesen werden (Bencharif et al., 2010) (Tab. 6).

Tab. 6: Zusammenfassende Darstellung von Untersuchungen zur Auswirkung eines Zusatzes von LDL in Tris-basierenden Verdünnern zur Kryokonservierung von caninem Sperma

Verdünnern	Anzahl/ Rasse/ Ejakulate	Parameter	Ergebnisse	Literatur
Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünnern				
Vergleich verschiedener LDL Konz. (4, 5, 8, 7, 10 %) (Kontrollmedium mit 20 % Eidotter)	Ex. 1: 10 5 Beagle, 5 Gold.-Ret. 20 Ej. Ex.2: 4 3 Beagle, 1 Gold.-Ret. 10 Ej.	Ex.1: Motilität (CASA, Hamilton-Thorne Sperm Analyser, nach dem Auftauen) Ex.2: beim 6 % LDL-Medium und Eidotter-Medium: akrosomale, flagellare Plasmamembran und DNA Integrität, zweimalige intrauterine KB von 6 Beaglen	- 6 % LDL zeigte die besten Ergebnisse, auch im Vergleich zum Eidotter-Medium - alle besamten Hündinnen wurden trächtig - LDL zeigten keine Auswirkungen auf die Fertilität bzw. Befruchtungsfähigkeit der Spermien	Bencharif et al., 2008

Ex. 1: Verdünner mit 6 % LDL und 60, 70, 80, 90 oder 100 mmol Glutamin und Verdünner mit 4, 5, 7, 8 % LDL und 80 mmol Glutamin Ex. 2: 6 % LDL mit 10, 20, 30, 40, 50 mmol Glutamin Ex. 3: 6 % LDL mit 0 und 20 mmol Glutamin (Kontrollgruppe mit 20 % Eidotter)	Ex. 1 und 2: 5 4 Beagle, 1 Gold.-Ret. 20 Ej. Ex. 3: 4 3 Beagle, 1 Gold.-Ret. 10 Ej.	Ex. 1, 2: - Motilität (CASA, Hamilton Thorn Cerros 12) Ex. 3: - Akrosomale, Plasmmembran und DNA Integrität (Nach dem Auftauen)	Ex. 1: bei 6 % LDL haben hohe Glutaminkonz. einen negativen Effekt auf die Motilität Ex. 2, 3: - beste Ergebnisse mit 6 % LDL und 20 mmol Glutamin - LDL-basierende Verdünner mit Glutaminzusatz erhöhen den Anteil motiler und intakter Spermien	Bencharif et al., 2010
Tris-Glukose-Verdünner				
Verdünner mit 20 % Eidotter oder 6, 8, 10 % LDL	6 4 Cockerspaniel 2 DSH	- Motilität (Subj.) - Membranintegrität (nach dem Auftauen)	- keine Unterschiede bei den verschiedenen LDL Konz. festgestellt - LDL-Zusatz grundsätzlich besser	Varela Junior et al., 2009

Abkürzungen: CASA = Computer-Assistierte Sperma-Analyse, DNA = Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonuklein Säure), DSH = Deutscher Schäferhund, Ej. = Ejakulate, Gold.-Ret. = Golden Retriever, Hd = Hunde, KB = Künstliche Besamung, Konz. = Konzentration, LDL = Low Density Lipoprotein, mmol = mini mol, Sek. = Sekunde(n), Subj. = Subjektiv, Wo. = Woche(n)

2.7.1.1.7 Antioxidantien

Spermien sind anfällig für Peroxidationsschäden, die durch ein Übermaß an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) entstehen (Farstad, 2009). Hierbei sind vor allem die Spermienmembran aufgrund des hohen Anteils ungesättigter Fettsäuren (Lopes et al., 2009b) und die DNA betroffen (Farstad, 2009). Um die Effekte der ROS zu minimieren, wurden bereits Vitamin C (Michael et al., 2007; Lopes et al., 2009b; Monteiro et al., 2009), Glutathion (Monteiro et al., 2009), Vitamin E, B16, N-Acetyl-L-Cystein, Taurin und Katalase (Michael et al., 2007) aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften zugesetzt.

In Tris-basierenden Verdünnern (Tris-Fruktose-Eidotter-Verdünner, Tris-Fruktose-Citrat-Eidottern-Verdünner, Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdünner) wurden Vitamin C-Konzentrationen zwischen 0 und 3 mM untersucht. Da nur bei oligozoospermen Rüden nach Zusatz von 1 mM eine verbesserte Membranintegrität, bei jedoch geringerer Motilität nachweisbar war, postulieren Lopes et al. (2009b), dass Vitamin C vor allem bei Hunden mit Fertilitätsproblemen die Spermien vor einer Lipidperoxidation schützt. Im Gegensatz dazu konnten Monteiro et al. (2009) nach Zugabe von 50 und 250 µM Vitamin C eine erhöhte Überlebenszeit, eine verbesserte Viabilität sowie bei 50 µM eine signifikant höhere Initialmotilität nachweisen. Höhere Konzentrationen (250 µM) zeigten hingegen einen negativen Effekt auf die Langlebigkeit, was toxische Auswirkungen vermuten lässt (Monteiro et al., 2009) (Tab. 7). In einem Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdünner mit Equex STM-Paste konnte nach Zugabe von 1,5 mM Vitamin C keine signifikante Reduktion der ROS beobachtet werden (Michael et al., 2007) (Tab. 7).

Ein weiteres untersuchtes Antioxidans ist Glutathion, welches vermutlich eine wichtige Rolle bei intrazellulären Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress spielt. In einem Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünner wurden verschiedene Konzentrationen (0, 1, 5 mM) getestet und dabei eine erhöhte Langlebigkeit sowie eine verbesserte Viabilität der Spermien in allen Proben mit Glutathionzusatz festgestellt. Hohe Glutathionkonzentrationen (5 mM) verbesserten die Ergebnisse des Thermoresistenztestes und den Spermienmembranstatus. Eine Konzentration von 5 mM Glutathion war dem Zusatz von Vitamin C (50, 250 µM) demnach überlegen (Monteiro et al., 2009).

Als weitere Antioxidantien wurde auch der Zusatz von N-Acetyl-L-Cystein, Taurin, Katalase, Vitamin E und B16 in einem Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdüner mit Equex STM-Paste untersucht. Wenngleich keine signifikante Abnahme der ROS ermittelt werden konnte, so führte der Zusatz von Katalase, gefolgt von Acetylcystein und Taurin, zu einer Verbesserung der Samenqualität, während B16 diese nachteilig beeinflusste (Michael et al., 2007) (Tab. 7).

Tab. 7: Zusammenfassende Darstellung von Untersuchungen zur Auswirkung eines Zusatzes von Antioxidantien in Tris-basierenden Verdünnern zur Kryokonservierung von caninem Sperma

Verdüner	Anzahl/ Rasse/ Ejakulate	Parameter	Ergebnisse	Literatur
Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdüner				
Vergleich verschiedener Konzentrationen: Ex. 1: Vitamin C 0, 50, 250 µM Ex. 2: Glutathion 0, 1, 5 mM	5 div. Rassen 20 Ej.	- Thermo-resistenztest/ Langlebigkeit (Motilität/PM alle 30 Minuten für 120 Minuten, bei 37°C) - Morphologie - Spermienmembranstatus (Viabilität, Membranintegrität)	Ex. 1 und 2: - 5 mM Glutathion am effektivsten - bei 50 µM Vitamin C initiale Motilität signifikant erhöht - hohe Vitamin C Konz. zeigten negative Effekte auf die Langlebigkeit	Monteiro et al., 2009
Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdüner				
Vergleich von Vitamin C (1,5 mM), N-Acetyl-L-Cystein (1,5 mM), Taurin (0,6 mM), Katalase (300 U/ml), Vitamin E (0,3 mM) und B16 (0,3 mM) (Kontrollgruppe ohne Antioxidantien) (Verdüner mit 1 % Equex STM-Paste)	5 div. Rassen 50 Ej. (5 Ej. bilden Mischej., 10 Mischej.)	- Motilität/PM - Viabilität - akrosomale Integrität - Spektrophotometrisch: Superoxidproduktion, Hydroxylradikale, Gesamtzahl ROS	- keine signifikante Reduzierung der ROS durch Antioxidantien - Katalase, gefolgt von Acetylcystein und Taurin, zeigten die ausgeprägtesten Effekte auf die Verbesserung der Samenqualität - B16 nachteilige Effekte auf alle Parameter	Michael et al., 2007

Tris-Fruktose-Eidotter-Verdünner				
Vergleich verschiedener Vitamin C Konz. (0, 1,0, 1,5, 3 mM) bei Hunden mit niedriger und normaler Spermiedichte	6 k. A. k. A. Ej. (je 3 Hd: niedriger und normaler Dichte)	- Motilität (CASA, HTM-IVOS12, Hamilton Thorne) - Membranintegrität	- bei Normospermie keine positiven Effekte feststellbar - bei Oligozoospermie bessere Membranintegrität mit 1,0 mM Vitamin C	Lopes et al., 2009b

Abkürzungen: CASA = Computer-Assistierte Sperma-Analyse, div. Rassen = diverse Rassen, Ej. = Ejakulate, Hd = Hunde, k. A. = keine Angabe, mM = mini Molar, μ M = mikro Molar, Mischej. = Mischejakulat, PM = Progressive Motilität (%), ROS = reactive oxygen spezies (reaktive Sauerstoff Spezies)

2.7.2 Andersen-Verdünner

Der Andersen-Verdünner enthält Trizma® Base, Citrat, Fruktose, Glycerin, Eidotter, destilliertes Wasser und die Antibiotika Streptomycinsulfat sowie Benzylpenicillin. Vor der Verdünnerzugabe muss die Probe zentrifugiert und der Überstand verworfen werden (Alhaider und Watson, 2009).

2.7.2.1 Modifikationen

Es gibt bereits Untersuchungsergebnisse zu den Auswirkungen eines Zusatzes von Equex STM-Paste im Andersen-Verdünner (Alhaider und Watson, 2006, 2009). Des Weiteren wurde ein Vergleich der Auftauergebnisse nach Kryokonservierung mit Andersen- und CLONE-Verdünner durchgeführt (Ström et al., 1997; Peña et al., 1999).

2.7.3 Uppsala-Verdünner-System 1 und 2

Bei den Uppsala-Verdünner-Systemen handelt es sich um zweiphasige Verdünner, die im zweiten Verdünnermedium Equex STM-Paste sowie einen höheren Glycerinanteil enthalten. Das Uppsala-System 1 enthält Glukose als Zuckerkomponente, wohingegen das System 2 Fruktose enthält (Linde-Forsberg, 2001). Zur Optimierung der Auftauergebnisse ist der Einsatz eines Auftaumediums beschrieben. Das Uppsala-System ist wohl der bestuntersuchtteste Verdünner, zahlreiche Untersuchungen mit Zusatz von Aminosäuren, Antioxidantien, Antikaspasen und alternativen Kryoprotektiva

wurden zur Verbesserung der Auftauergebnisse durchgeführt. Ebenso wurde das Uppsala-System mit verschiedenen Verdünnern, wie einem Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünner mit 0,5 % Equex STM-Paste (Hermansson und Linde Forsberg, 2006) und einem Gill-Verdünner (Tris-Fruktose-Citrat-Eidotter-Verdünner) (Schäfer-Somi et al., 2006), verglichen.

2.7.3.1 Modifikationen

Bezüglich der Gefriertauglichkeit wurden bereits Glycerinendkonzentrationen zwischen 5 % und 10 % im Uppsala-System 2 untersucht und in diesem Zusammenhang mit anderen Verdünner-Systemen verglichen (zweiphasiger Tris-Eidotter-Verdünner, Gill-Verdünner). In einem Vergleich von zweiphasigem Tris-Eidotter-Verdünner und Uppsala-System 2, welche beide 0,5 % Equex STM-Paste und eine Glycerinendkonzentration von 5 % enthielten (Tris-Eidotter-Verdünner nur in Phase 2: 10 % Glycerin, Uppsala-System 2 Phase1: 3 %, Phase 2: 7 % Glycerin), zeigten die Spermien im Uppsala-System 2 eine signifikant längere Lebensdauer. Es konnten keine Auswirkungen des Verdünners auf die subjektiv und im CASA ermittelte Motilität und Viabilität nach Kühlung bei 4°C für 24 oder 48 Stunden vor der Tiefgefrierung festgestellt werden (Hermansson und Linde Forsberg, 2006).

Ebenfalls wurden am Uppsala-System 2 und Gill-Verdünner die Einflüsse einer Samenzentrifugation (700*g/5 Minuten) und des Gefrierens in einer Styroporbox (4 cm über flüssigem Stickstoff für 10 Minuten) oder einem computergestützten Einfrierautomaten IceCube 1810 (Sy-Lab, Purkersdorf, A, bis -80°C bei 17°C/Minute, bis -130°C bei 7°C/Minute danach in flüssigen Stickstoff) untersucht (Schäfer-Somi et al., 2006). Unterschiede zwischen den Verdünnern bestanden im Gehalt an Glycerin (Gill-Verdünner: 8,8 %, Uppsala-System 2 Medium 1: 3 %, Medium 2: 7 %) und der im Uppsala-Verdünner zugesetzten Equex STM-Paste (0,5 %). Die besten Auftauergebnisse hinsichtlich Motilität und Membranintegrität zeigte dabei das Uppsala-System 2 nach einer Zentrifugation und dem Gefrieren in einem IceCube (Schäfer-Somi et al., 2006).

Bei der Verwendung von Antioxidantien und dem Uppsala Systems 2 konnte durch Vitamin C Zugabe (0, 6,8, 13, 27 mmol/l, Endkonzentration: 1,7 - 6,7 mmol/l) keine Verbesserung der Qualität sowie kein Schutz vor oxidativem Stress festgestellt werden.

Der Vitamin C-Zusatz führte sogar zu einer signifikanten Abnahme der Motilität (Eulenberger et al., 2009).

2.7.4 Magermilch-Verdünner

Magermilch-Verdünner enthalten als Hauptkomponente Magermilch bzw. Magermilchpulver. Je nach Literaturquelle sind unterschiedliche Anteile an Glukose oder Fruktose, Wasser, Tris, Citrat, Eidotter und diverse andere Zusatzstoffe enthalten (Crusco dos Santos et al., 1999; Rota et al., 2001; Abe et al., 2008). Magermilch-Verdünner kommen als Alternative zu Eidotter in Frage, um besonders nach Ausbruch einer Geflügelinfluenza die Übertragung von Krankheiten durch Verwendung von Eidotter zu verhindern und um Export- sowie Importverbote für Eidotter-basierende Verdünner einiger Ländern zu umgehen (Abe et al., 2008).

2.7.4.1 Modifikationen

Martin (1963) veröffentlichte erste Untersuchungen über die Eignung von Milchhaltsstoffen in Verdünnern zur Kryokonservierung von Hundesamen. Seither wurden Untersuchungen zu verschiedenen Magermilchanteilen in Tris-Verdünnern (Rota et al., 2001), zu Auswirkungen eines Glycerinzusatzes in Glucose-basierenden Magermilch-Verdünnern (Abe et al., 2008) und auch Vergleiche zwischen Magermilch-Verdünnern und anderen Verdünner-Systemen veröffentlicht (Crusco dos Santos et al., 1999).

Bei einem Vergleich von Magermilch, Ringer-Fruktose-Phosphat- und Citrat-Fruktose-Phosphat-Verdünnern zeigte sich der 9 %ige Magermilch-Verdünner überlegen. Ebenfalls wurden verschiedene Magermilchpulver-Anteile (4,5 %, 6,75 %, 9 %) in unterschiedlichen Verdünnungsraten (10, 50, 250-fach) verglichen. Es zeigten sich für einen Magermilchpulver-Anteil von 6,75 % und 9 % die besten Ergebnisse. Eine 10-fache Verdünnung erwies sich dabei als vorteilhaft. Des Weiteren wurden verschiedene Konzentrationen von Magermilchpulver (6, 9, 12 %) mit 7,5 % und 10 % Glycerinanteil untersucht. Ein 10 %iger Glycerinanteil sowie 12 %iger Magermilchanteil erbrachten hierbei die besten Ergebnisse. Weitere Versuche wurden mit 12 %igem Milchpulver in Kombination mit Ringer-Phosphat, gepufferter Fruktose-Lösung oder ohne einen Zusatz, mit verschiedenen Equilibrierungszeiten (0 bzw. 5 Std.) bei 5°C und einer Glycerinzugabe bei 5°C oder 30°C durchgeführt. Die schlechtesten Ergebnisse waren dabei mit dem Milchpulver-Ringerphosphat-Verdünner zu beobachten. Die

geringsten Motilitäten ergaben sich bei einer Glycerinzugabe bei 30°C und dem Gefrieren ohne Equilibrierungsperiode (Martin, 1963) (Tab. 8).

In den Versuchen von Rota et al. (2001) wurde ein Tris-Glukose-Citrat-Eidotter-Verdünner mit 5 % Glycerin und 0,25 % SDS durch Magermilch (0 %, 50 %, 100 %) ersetzt. Nach 120 Minuten Inkubationszeit bei 37°C und einem 100 %igen Magermilchanteil als Pufferersatz, wurden dabei signifikant höhere Viabilitäten im Gegensatz zu einem nur partiellen Ersatz des Puffers festgestellt (Rota et al., 2001) (Tab. 8).

Vergleichbare Ergebnisse bezüglich Motilität und Lebensfähigkeit mit einem Tris-basierenden Verdünner und einem Glucose-basierenden Magermilch-Verdünner (ohne Eidotter, ohne bzw. mit 14 % Glycerin) erzielten Abe et al. (2008) (Tab. 8). Ein 14 %iger Glycerinzusatz erwies sich dabei als vorteilhaft (Abe et al., 2008).

Tab. 8: Zusammenfassende Darstellung von Untersuchungen zur Auswirkung eines Zusatzes von Milch bzw. Milchpulver enthaltenden Verdünnern zur Kryokonservierung von caninem Sperma

Verdüner	Anzahl/ Rasse/ Ejakulate	Parameter	Ergebnisse	Literatur
<p>Ex. 1: Vergleich von Magermilch 9 %, Ringer-Fruktose-Phosphat-, Citrat-Fruktose-Phosphat- Verdünnern in unterschiedlichen Verdünnungsraten (5, 10, 20-fach) sowie vor oder nach dem Einfrieren zentrifugiert und mit unterschiedlichen Equilibrierungszeiten (0, 4 Std.)</p> <p>Ex. 2: Vergleich verschiedener Magermilchpulver Anteile (4,5 %, 6,75 %, 9 %) in verschiedenen Verdünnungsraten (10, 50, 250 -fach)</p> <p>Ex. 3: verschiedene Konz. von Magermilchpulver (6, 9, 12 %) mit 7,5 und 10 % Glycerinanteil</p> <p>Ex. 4: 12 % Milchpulver in Kombination mit Ringer-Phosphat, gepufferter Fruktose Lösung oder ohne Zusatz mit verschiedenen Equilibrierungszeiten (0, 5 Std.) bei 5°C und einer Glycerinzugabe bei 5°C oder 30°C</p>	<p>Ex. 1: 3 3 Ej.</p> <p>Ex. 2 - 4: je 4 Ej. von verschiedenen Hd</p>	<p>Ex. 1 - 4: Motilität (Subj.)</p> <p>Ex. 3: Samen nach dem Auftauen in Ringer-Fruktose-Phosphat Lösung 1 Std. bei 37°C inkubiert</p>	<p>Ex. 1: - 9 %iger Magermilch-Verdüner besser</p> <p>- nach einer 10 oder 20-fachen Verdünnungsrate keine Qualitätsabnahmen im Magermilch-Verdüner zu erkennen im Gegensatz zum Ringer-Verdüner</p> <p>- keine Effekte durch Zentrifugieren vor oder nach dem Einfrieren sowie Equilibrierung von 0 oder 4 Std. beobachtet</p> <p>Ex. 2: - Magermilchpulver Anteile von 6,75 % und 9 % zeigten bessere Ergebnisse als bei Verwendung von 4,5 %</p> <p>- eine 10-fache Verdünnungsrate erwies sich als vorteilhaft</p> <p>Ex. 3: - ein 10 %iger Glycerinanteil sowie 12 %iger Magermilchanteil waren am besten geeignet</p> <p>Ex. 4: - die schlechtesten Ergebnisse waren mit dem Milchpulver-Ringerphosphat-Verdüner zu beobachten</p> <p>- die geringsten Motilitäten gab es bei einer Glycerinzugabe bei 30°C und dem Einfrieren ohne Equilibrierungsperiode</p>	<p>Martin, 1963</p>
<p>Tris-Glukose-Citat-Verdüner mit 20 % Eidotter, 5 % Glycerin, 0,25 % SDS ersetzt durch 0, 50, 100 % Magermilch</p>	<p>6 div. Rassen 6 Ej.</p>	<p>- Motilität (Subj., CASA, Hamilton Thorne Motility Analyser)</p>	<p>- nach 120 Minuten Inkubationszeit bei 37°C zeigten sich bei 100 % Magermilch als Puffersatz signifikant höhere Viabilitäten als bei einem nur partiellen Ersatz des Puffers</p> <p>- vergleichbare Ergebnisse bei Motilität und Lebensfähigkeit mit Tris-</p>	<p>Rota et al., 2001</p>

		<ul style="list-style-type: none"> - Viabilität - Akrosomen-morphologie 	<p>basierenden Verdünnern und Magermilch-Verdünnern</p>	
<p>Zweiphasiger Glucose-basierender Magermilch-Verdünnern (ohne Eidotter) mit oder ohne 14 % Glycerin im 2. Verdünnernmedium, nach 1 oder 3 Std. bei 4°C zugegeben (Kontrollgruppe: Tris-Citrat-Glucose-Verdünnern mit Eidotter)</p>	<p>5 Labrador-Retriever k. A.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Motilität (CASA, HTM-Ceros-S, Hamilton Thorne Research, Danver, USA) - transcervicale KB von 2 Labrador-Retrievern mit in Magermilch-Verdünnern konserviertem Sperma (Zugabe von 2. Verdünnernmedium mit Glycerin nach 3 Std.) 	<ul style="list-style-type: none"> - Verdünnern mit Glycerin besser (nicht signifikant) - geringgradig mehr motile Spermien bei Zugabe nach 3 Std. (nicht signifikant) <p>KB: 6 Welpen von 2 Hündinnen</p>	<p>Abe et al., 2008</p>

Abkürzungen: CASA = Computer-Assistierte Sperma-Analyse, Ej. = Ejakulate, Ex. = Experiment, Hd = Hunde, k. A. = keine Angabe, KB = Künstliche Besamung, Konz. = Konzentration, Std. = Stunden, Subj. = Subjektiv

2.7.5 Laktose-Verdünner

Laktose-Verdünner beinhalten als Hauptkomponente das Disaccharid Laktose. Laktose-haltige Verdünner wurden bereits in Zusammenhang mit anderen Verdünnern (Olar et al., 1989; Thomas et al., 1993; Ivanova-Kicheva et al., 1997; Crusco dos Santos et al., 1999), unterschiedlichen Konfektionierungsmethoden (Thomas et al., 1993; Ivanova-Kicheva et al., 1997) und verschiedenen Zuckerzusätzen untersucht (Yildiz et al., 2000).

2.7.5.1 Modifikationen

Tris-Eidotter-Verdünner mit Glycerinkonzentrationen zwischen 2 bis 4 % erwiesen sich im Vergleich zu Laktose-Eidotter-Verdünnern als geeigneter für Rüdensperma (Olar et al., 1989) (Tab. 1).

Weitere Laktose-Verdünner-Modifikationen sind bereits im Kapitel der Tris-Verdünner abgehandelt worden.

2.7.6 Kokosnusswasser-Verdünner

Kokosnusswasser-Verdünner können neben Kokosnusswasser bzw. ACP-106® (pulverförmiges Kokosnusswasser) unterschiedliche Glycerinkonzentrationen sowie Citrat und Eidotter enthalten (Cardoso et al., 2003, 2007; De Cássia Soares Cardoso et al., 2006).

2.7.6.1 Modifikationen

In einem Kokosnusswasser-Citrat-Eidotter-Verdünner wurden verschiedene Glycerinkonzentrationen (4, 6, 8 %) verglichen. Dazu wurden 12 Ejakulate von 6 Rüden bezüglich ihrer Motilität, Viabilität und Morphologie nach dem Auftauen untersucht. Zwischen den einzelnen Glycerinkonzentrationen konnten keine Unterschiede bezüglich Motilität und Viabilität, jedoch bei 6 % Glycerinzugabe geringgradig mehr morphologisch veränderte Samenzellen nachgewiesen werden (Cardoso et al., 2003).

Ebenfalls wurde ein Eidotter (20 %) und Glycerin (6 %) enthaltender ACP-106®-Verdünner (pulverförmiges Kokosnusswasser, ACP Biotechnologia®, Fortaleza-Ceará, Brasilien) untersucht. Anhand der Motilität (subjektiv, CASA), Plasmamembranintegrität, Spermienmorphologie, akrosomaler Status und eines

Spermien-Oozyten-Interaktions-Assays konnte nachgewiesen werden, dass ACP-106® eine positive Auswirkung auf die Erhaltung der in vitro-Fertilität von caninem Tiefgefriersperma hat (Cardoso et al., 2007).

2.7.7 Kommerzielle Verdünner-Systeme

Veröffentlichungen zur Verwendung beim Hund liegen zu nachfolgenden kommerziellen Verdünner-Systemen bzw. Verdünnern mit kommerziell erhältlichen Komponenten vor:

Andromed (Nöthling et al., 2007)

Biladyl (Nöthling et al., 2007)

Biociphos W482 (Silva und Verstegen, 1995)

CanFreeze (Layne et al., 2008)

CaniPro (Layne et al., 2008)

CLONE-Verdünner (Ström et al., 1997; Peña et al., 1999)

IMV Universal-Verdünner (Dobrinski et al., 1993)

Laciphos (Silva und Verstegen, 1995; Tosun und Uysal, 2007)

MP50-Verdünner (Chirinéa et al., 2006)

TEST-Verdünner (Battista et al., 1988)

Triladyl (Dobrinski et al., 1993; Szász et al., 2000)

Ein Großteil der Veröffentlichungen vergleicht kommerzielle und nicht kommerzielle Verdünner bezüglich ihrer Gefriertauglichkeit bei der Kryokonservierung von Rüdensperma. Nähere Erläuterungen befinden sich dazu in den nachfolgenden Kapiteln.

2.7.7.1 Tes/Tris, Laciphos- und Biociphos-Verdünner

Silva und Verstegen (1995) verglichen die kommerziellen Verdünner Biociphos W482 und Laciphos 478 mit einem Tes/Tris-Verdünner. Die besten Samenqualitäten nach dem Auftauen bezüglich Motilität und Anteil lebender Spermien erzielten die Autoren mit dem Laciphos 478 und Tes/Tris-Verdünner. Nach einer zweimaligen intrauterinen laparoskopischen Besamung von 15 Beaglehündinnen zeigten sich trotz schlechterer Spermaqualitäten nach dem Auftauen mit Biociphos W482 bessere

Trächtigkeitsraten (100 %). Laciphos 478 und Tes/Tris erreichten nur eine Trächtigkeitsrate von 60 %.

Tosun und Uysal (2007) erreichten mit dem Laciphos-Verdüner schlechtere Ergebnisse als mit den verglichenen Tris-Verdünnern. Um die Membranintegrität und Motilität zu schützen, erwies sich der Zusatz von bovinem Serum Albumin zum getesteten Tris-Verdüner als vorteilhafter.

Bei Untersuchungen mit sich in ihren Puffersubstanzen-, Zuckerkomponenten- sowie Glycerinanteilen-unterscheidenden Tris, TEST, PIEPES und Laktose-Verdünnern, die in Straws oder Pellets gefroren wurden, ergaben in Straws gefrorene Tris- und TEST-Verdüner die besten Ergebnisse. In Pelletform gefrorene Proben des Laktose-Verdüners schnitten besser als die des PIEPES-Verdüners ab (Battista et al., 1988). Bueno et al. (2001) erzielten dagegen mit einem Tris-Citrat-Verdüner bessere Ergebnisse in Bezug auf die Spermaqualität als mit dem Tes/Tris-Verdüner. Die Autoren beurteilten jedoch im Vergleich zu Battista et al. (1988) noch die Plasmamembran und akrosomale Integrität.

2.7.7.2 Triladyl-Verdüner

Dobrinski et al. (1993) führten vergleichende Untersuchungen mit kommerziellen Triladyl-, IMV Universal-Verdünnern und zwei nicht kommerziellen Verdünnern (Pipes, Tris-Fruktose-Zitronensäure-Eidotter-Verdüner¹) durch, wobei es sich stets um einphasige Eidotter-enthaltende Verdüner handelte. In Kombination mit den verschiedenen Verdünnern wurden dabei unterschiedliche Gefrierarten² untersucht (langsame, mittlere und schnelle Gefrierart). Bei den getesteten Verdünnern wurden bezüglich der PM keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Bei langsamen Gefrierarten erwiesen sich alle 4 Verdüner als geeignet (Dobrinski et al., 1993).

Auch Szász et al. (2000) verwendeten den kommerziellen Triladyl-Verdüner für Rindersamen (Minitüb, Tiefenbach). Sie verglichen diesen mit zwei selbst hergestellten Hundesamenverdünnern, dem norwegischen (= Tris-Citrat-Fruktose-Eidotter) und dem niederländischen (= Tris-Citrat-Glukose-Fruktose-NaCl-NaHCO₃-

¹ Pipes: Piperazin-KOH für pH-Dextrose-NaCitrat-Eidotter-Glycerin-Linco-Spectin

IMV: IMV Gefrierpuffer und Eidotter

Triladyl: Triladyl (Minitüb, Tiefenbach, D), dest. Wasser, Eidotter, Linco-Spectin

² Gefrierarten: Langsam 20 cm über flüssigem Stickstoff/30 Minuten, Mittel 12 cm/20 Minuten, Schnell 4 cm/10 Minuten

Eidotter) Verdünner bei unterschiedlichen Gefrierregimen³ und Auftauraten. Jeder Verdünner wurde dazu mit einem konventionellen Rinder- und zwei Hunde-Gefrierregimen tiefgefroren. Dabei zeigten die Gefrieraten einen größeren Einfluss auf die Samenqualität, subjektive Motilität und akrosomale Integrität, nach dem Auftauen als die verwendeten Verdünner. Die meisten akrosomalen Veränderungen entstanden mit dem Rindergefrierregime. Beurteilt anhand der Trächtigkeitsrate nach chirurgischer KB waren der Triladyl-Verdünner und das norwegische Gefrierregime am besten, wobei die durchschnittliche Wurfgröße bei 2,8 Welpen lag.

2.7.7.3 CLONE-Verdünner

Der CLONE-Verdünner (Cryogenetic Laboratories of New England, Inc.) ist ein kommerzieller zweiphasiger Verdünner, dem ein Auftaumedium zugesetzt werden kann (Ström et al., 1997; Peña et al., 1999).

Er wurde mit dem einphasigen Andersen-Verdünner (Tris-Fruktose-Citrat-Verdünner mit 6,4 % Glycerin und 20 % Eidotter) bezüglich folgender Beurteilungskriterien verglichen: subjektive Motilität bzw. PM, Membranintegrität und akrosomaler Status (Ström et al., 1997; Peña et al., 1999). Während Ström et al. (1997) mit dem CLONE-Verdünner nach dem Auftauen bessere Motilitäten nachwies, konnte dies von Peña et al. (1999) nicht bestätigt werden. In beiden Studien (Ström et al., 1997; Peña et al., 1999) zeigte die Andersen-Methode nach der Inkubation bei 37°C eine höhere Motilität. Während Ström et al. (1997) keine Unterschiede zwischen den Methoden in Bezug auf akrosomalen Status und Plasmamembranintegrität feststellten, erhielten Peña et al. (1999) mit der Andersen-Methode nach dem Auftauen einen höheren Anteil an intakten Akrosomen und konnten erst nach 3 Stunden zwischen beiden Methoden keinen signifikanten Unterschied mehr feststellen.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse beider Studien stellen individuelle Abweichungen der Hunde, aber vor allem die unterschiedliche Verwendung eines Auftaumediums dar. Während Peña et al. (1999) bei beiden Verdünnern ein Auftaumedium in Form eines Tris-Puffers (Tris-Fruktose-Citrat-

³ **Rd:** +4-+10°C 4°C/Minute, +10 - -140°C 40°C/Minute, **Norwegisches-Hd.:** +5-+7°C/Minute 2°C/Minute, +7- -100°C 50°C/Minute, -100- -180°C 25°C/Minute, **Niederländisches-Hd.:** +5-+8°C 5°C/Minute, +8- -80°C 35°C/Minute, -80- -140°C 30°C/Minute

Verdünner) nutzte, verwendeten Ström et al. (1997) nur im CLONE-Verdünner ein Auftaumedium.

3 Material und Methoden

3.1 Probanden

Bei der Studie wurden Ejakulate von elf Rüden der Rassen Bull-Mastiff (n = 4), Bernhardiner (n = 4), Mastin de los Pirineos (n = 1), Rottweiler (n = 1) und Bernersennenhund (n = 1) im Alter zwischen zwei und neun Jahren verwendet ($4,3 \pm 2,3$ Jahre). Alle Hunde stammten aus Privathaushalten und wurden als Liebhaber- oder Zuchttiere gehalten. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren alle Rüden in einem guten Gesundheits- und Pflegezustand. Sie zeigten ein ungestörtes Allgemeinbefinden und wiesen weder Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Sexualfunktion noch eine Erkrankung der Geschlechtsorgane auf.

3.2 Ejakulatgewinnung

In den Monaten Juli und August 2009 wurde von 11 Rüden an jeweils drei Terminen, mit einem Abstand von mindestens zwei Tagen, ein Ejakulat (n = 33) gewonnen. Die Ejakulatgewinnung fand mit einer Ausnahme (Ejakulatgewinnung auf der klinikseigenen Wiese) in einem separaten Behandlungsraum statt.

Zur sexuellen Stimulation der Rüden wurde eine läufige oder eine mit Lockstoff präparierte Hündin (p-Methyl-Benzoesäure in alkoholischer Lösung, Fa. Sigma, Seelze) verwendet. Das Ejakulat wurde wie bei Hoffmann (2003b) und Pesch et al. (2007) beschrieben durch manuelle Stimulation (Massage) und Fixation des Penis gewonnen. Dabei wurde das Ejakulat fraktioniert aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen, Vorsekret, spermienreiche Fraktion und Prostatasekret, wurden in sterilen graduierten Tulpengläsern für Bullensperma (Fa. Minitüb, Tiefenbach) aufgefangen, die in einem Wasserbad (Fa. Memmert GmbH und Co. KG, Schwachbach) auf ca. 37°C vorgewärmt wurden.

3.3 Sperma-Untersuchung

Bei der Untersuchung der Ejakulate wurden neben den klassischen Ejakulatparametern nach Hoffmann (2003c) und Pesch et al. (2007) noch weitere Parameter mit Hilfe eines SpermVision®-Systemes (Fa. Minitüb, Tiefenbach) erfasst. Eine grafische Übersicht des Versuchsablaufs ist in Abbildung 2 dargestellt.

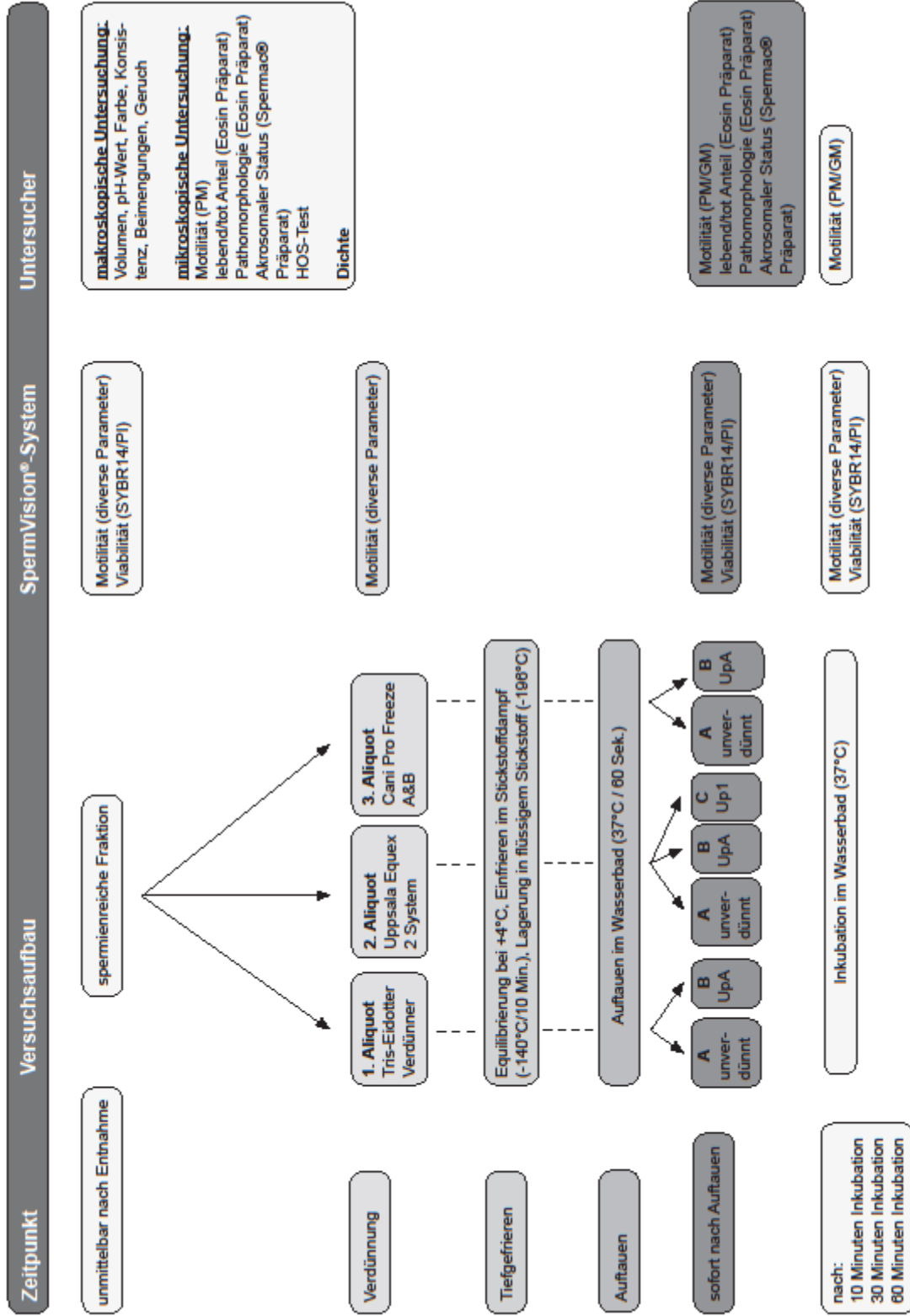


Abb. 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

3.3.1 Makroskopische und chemisch-physikalische Untersuchung

Die Qualität des gewonnenen Ejakulates wurde direkt im Anschluss an die Gewinnung beurteilt. Die einzelnen Ejakulatfraktionen wurden makroskopisch auf Volumen, Farbe, Geruch, Konsistenz und Beimengungen untersucht. Das Volumen (ml) aller drei Ejakulatfraktionen wurde durch Ablesung an der Graduierungsgravur der tulpenförmigen Samenauffanggläser für Bullensperma ermittelt. Ebenfalls wurde eine pH-Wert Ermittlung mittels Merck Indikatorpapier (Fa. Merck, Darmstadt), mit einem Messbereich zwischen pH 5,4 und 7, durchgeführt. Die Dichte der spermienreichen Fraktion wurde photometrisch mit einem SpermaCue®-Gerät (Millionen/ml) (Fa. Minitüb, Tiefenbach) bestimmt.

3.3.2 Mikroskopische Untersuchung

In der lichtmikroskopischen Samenuntersuchung wurde der Anteil progressiv motiler Spermien (PM, %), das Lebend-Tot-Verhältnis, die Pathomorphologie, die Spermienmembranintegrität und der Anteil an Kopfkappenveränderungen beurteilt. Die dazu verwendeten Objektträger (76 x 26 mm, Fa. Knittel Glasbearbeitung, Braunschweig) und Deckgläschen (18 x 18 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim) wurden unter Verwendung eines Heiztisches (HT200, Fa. Hund, Wetzlar) auf 38°C vorgewärmt.

Zur Beurteilung der PM wurde ein Tropfen Sperma (5 - 10 µl) auf einen Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops mit Phasenkontrast (H500 mit Heiztisch, Hund, Wetzlar) bei 400-facher Vergrößerung. Der prozentuale Anteil an Spermien, die das Gesichtsfeld zu mindestens $\frac{2}{3}$ geradlinig durchquerten, wurde in mehreren Gesichtsfeldern im Zentrum des Tropfens geschätzt.

Zur Beurteilung des Lebend-Tot-Verhältnisses und des prozentualen Anteils an morphologisch veränderten Spermien wurde ein EosinG (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbter Ausstrich angefertigt. Auf einem Objektträger wurde dazu ein kleiner Tropfen Sperma und ein etwa doppelt so großer Eosin-Tropfen vermischt, ausgestrichen und luftgetrocknet (Kap. 10.1.2.1). Die Plasmamembranen toter Spermien sind für den Farbstoff Eosin permeabel, weshalb die zum Zeitpunkt der Färbung toten Spermien durch ihre Rotfärbung zu identifizieren sind und lebende Spermien farblos bleiben (Hoffmann, 2003c). Zur Bestimmung des Lebend-Tot-

Verhältnisses wurden 200 Spermatozoen unter einem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt. Zur Beurteilung der Pathomorphologie wurden 200 Spermien bei 400-facher Vergrößerung anhand der nachfolgenden Tabelle (Tab. 9) beurteilt.

Tab. 9: Einteilung pathologischer Spermienformen nach Hoffmann (2003d)

Kategorie 1: In der Regel primäre Veränderungen	Kategorie 2: In der Regel sekundäre/tertiäre Veränderungen	Kategorie 3: Plasmatropfen
1. Kappenveränderungen (abgelöst, schief, sonstiges) 2. Kopfveränderungen (schmal, lanzenförmig, Zwergköpfe, Riesenköpfe, sonstiges wie Doppelköpfe) 3. Halsveränderungen (abaxialer, paraaxialer, retroaxialer Schwanzansatz, sonstiges wie Halsbruch) 4. Schwanzveränderungen (schleifenförmig, aufgerollt, um den Kopf gerollt, abgeknickt, sonstiges wie z. B. Doppelschwanz, Auffransung des Mittelstückes)	1. lose Köpfe 2. Krümmlinge 3. sonstiges	1. Hals 2. Mittelstück 3. Endstück

Zur Beurteilung des Akrosoms wurde ein Spermac® gefärbter Ausstrich (Fa. Stefan Gück, Zellkulturbedarf GmbH, Berlin) verwendet. Eine detaillierte Beschreibung des Färbeverfahrens befindet sich im Anhang (Kap. 10.3.1). Bei dieser Färbung stellen sich die einzelnen Spermienanteile farblich unterschiedlich dar: Akrosom, Mittelstück, Haupt- und Endstück färben sich grün, während der Kern rot und die Äquatorialregion blass-grün erscheinen. Die Auswertung von 200 Spermien auf akrosomale Veränderungen erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion (Fa. Leika, Wetzlar); hierbei wurde beurteilt, ob das Akrosom vorhanden (Grünfärbung im akrosomalen Bereich) oder abgelöst (keine Grünfärbung) war.

Zur Beurteilung der Spermienmembranintegrität eignet sich der Hypoosmotische-Schwelltest (HOST) (Kumi-Diaka, 1993; Riesenbeck et al., 2001; Rijsselaere et al., 2005). Unter hypoosmotischen Bedingungen kommt es bei Säugetierspermatozoen im Gegensatz zu anderen Säugetierzellen nicht zum Platzen, sondern der Wassereinstrom führt zu einer Ausdehnung der Spermienmembran und infolgedessen

zu einem Aufrollen des Schwanzes (Riesenbeck et al., 2001). Unabhängig vom Grad der Aufrollung wird dies als „curled tail“ bezeichnet, nicht aufgerollte Schwänze werden als „not curled“ bezeichnet (Hoffmann, 2003c). Das Vorliegen von „not curled“, aber auch von Stadium 5 aufgerollten Spermiegeißeln spricht für eine Schädigung der Membran (Riesenbeck et al., 2001) (Abb. 3).

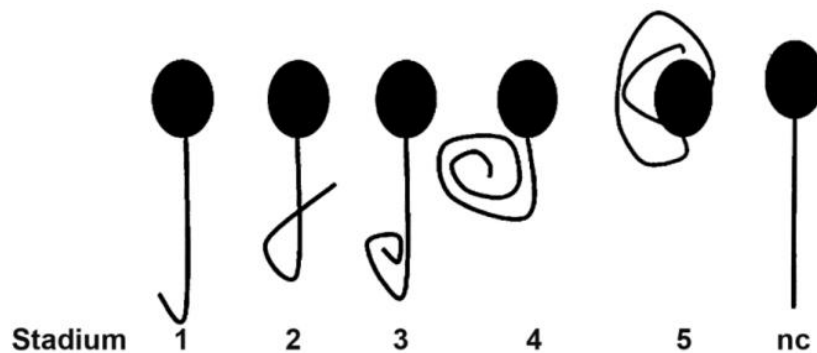


Abb. 3: Schematische Darstellung der Geißelveränderungen von Rüdenspermien beim hypoosmotischen-Schwelltest (HOS-Test) (Hoffmann, 2003c)

Spermien mit Schwanzveränderungen im Stadium 1 - 4: intakte Zellmembran; Spermien mit Schwanzveränderungen im Stadium 5 und not curled (nc): defekte Plasmamembran

Zur Beurteilung der Spermienmembranintegrität wurden 10 µl Sperma zu 100 µl einer hypoosmotischen Lösung gegeben (Kap. 10.1.2.2) und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde ein Deckglaspräparat hergestellt und dieses unter einem Mikroskop mit Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung beurteilt. Es wurden 200 Spermien untersucht und der Anteil an „curled“ (Stadium 1 bis 4) sowie „not curled“ (nc) bestimmt. Als vorläufiger Referenzbereich des HOS-Testes gelten 80 - 96 % aufgerollte Schwänze für Ejakulate geschlechtsgesunder und fertiler Rüden (Riesenbeck et al., 2001).

3.3.3 SpermVision® Untersuchungen

Neben der subjektiven Spermauntersuchung wurden ergänzend computerassistierte spermatologische Analyseverfahren mittels SpermVision® (Fa. Minitüb, Tiefenbach) durchgeführt.

3.3.3.1 Computerassistierte Motilitätsanalyse

Für die computerassistierte Motilitätsanalyse wurde das System SpermVision® verwendet. Es besteht aus den folgenden Komponenten:

- Hochgeschwindigkeitsdigitalkamera (schwarz/weiß) mit 60 Bildern/Sekunde, Belichtungszeit bis zu 1/20.000 pro Sekunde
- PC mit Pentium® 4 Prozessor (2,26 GHz, 1 GB Dualkanal RDRAM, 40 GB Festplatte, 19 Zoll Flachbildschirm)
- Mikroskop Olympus BX41 (Okular 10 x, Olympus BX41, Fa. Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) mit Heiztisch (38 °C)
- Negativ-Hoch-Kontrast Objektiv (UPlanFINH 20x/0,5 Ph1, Fa. Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan)

Das Mikroskopbild wurde auf dem Computerbildschirm visualisiert und mit Hilfe des Programmes „SpermVision® Software Version 3.5.6.2“ (Fa. Minitüb, Tiefenbach) ausgewertet. Dabei wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Einstellungen für die Motilitätsanalyse verwendet.

Tab. 10: Einstellungen für die Motilitätsanalyse des SpermVision®

Level 1 Klassifikation	Level 2 Klassifikation (untersucht wurden die vorwärtsbeweglichen Zellen)
nicht bewegliche Spermien: AOC < 9,5	hyperaktive Spermien: VCL > 118 und ALH > 6,5 und LIN < 0,5
ortsbewegliche Spermien: DSL < 6	lineare Spermien: STR > 0,9 und LIN > 0,5
vorwärtsbewegliche Spermien: Jede Zelle, die nicht als nicht beweglich und ortsbeweglich eingestuft wurde	nicht lineare Spermien: STR ≤ 0,9 und LIN ≤ 0,5
	kurvenbewegliche Spermien: DAP/Radius ≥ 3 und LIN < 0,5
Spermienerkennung: von 20 bis 60 µm ²	
Anzahl gezählter Spermien: 5000 Spermien oder 15 Felder (vor TG) 4000 Spermien oder 8 Felder (nach TG)	
Pixel zu µm Verhältnis: 168 zu 100	

Abkürzungen: ALH = Amplitude of lateral head displacement (Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung der Spermien, µm), AOC = Average Orientation Change of the head (durchschnittliche Ausrichtungs-/Orientierungsänderung des Spermienkopfes, angegeben in Grad), DAP = Distance Average Path (Durchschnittliche Distanz, µm), DSL = Distance Straight Line (Geradlinige Distanz, µm), LIN = Linearity (Linearität), STR = Straightness (Geradlinigkeit), TG = Tiefgefrierung, VCL = Velocity Curve Linear (kurvilineare Geschwindigkeit, µm/Sekunde)

Die Untersuchungen wurden vor dem Tiefgefrieren und zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Auftauen durchgeführt.

Zur Erreichung einer homogenen Verteilung der Spermien im Reagenzglas wurde dieses vorher kurz geschwenkt. Die Leja-Kammer (20 µm Sample, ca. 2 µl, Fa. Leja Products B.V., Nieuw-Vennep, Niederlande) wurde mit 2 µl Sperma befüllt und nach Einsaugen der Probe in den kapillaren Spalt der Messkammer mittels SpermVision® analysiert. Die Messungen wurden bei einer Analysetemperatur von 38°C durchgeführt. Die im SpermVision® aufgrund zu hoher Dichte nicht messbaren Proben wurden verdünnt. Dazu wurden die Nativejakulate mit steriler 0,9 % Natriumchloridlösung (Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen) im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 und bereits mit dem Uppsala-System aufgearbeitete Proben mit dem Verdünnermedium 1 des entsprechenden Systems (Up1) im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 verdünnt.

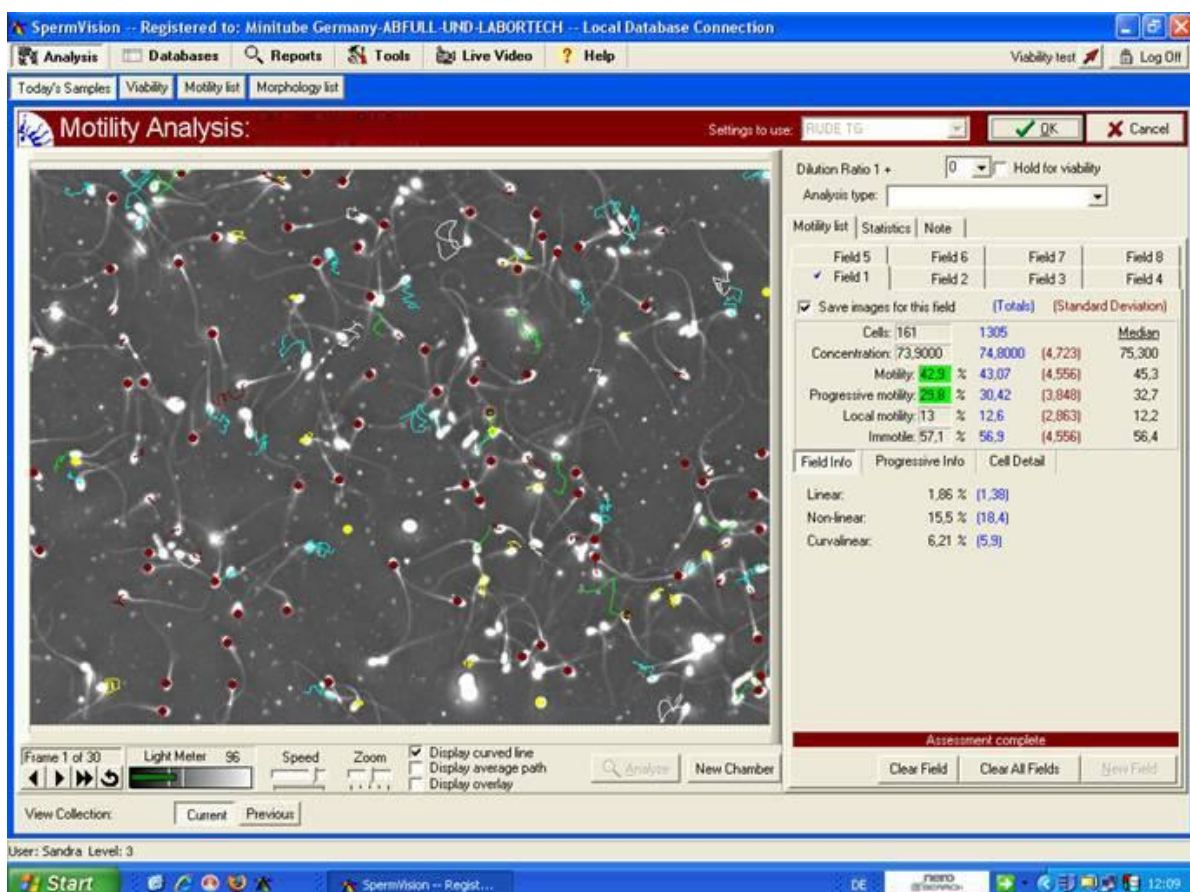


Abb. 4: Farbliche Differenzierung der verschiedenen Spermienklassifikationen gemäß SpermVision® Software (Version 3.5.6.2)

Zur Darstellung der einzelnen Spermienklassifikationen wurden im Anschluss an die Analyse die Spermienköpfe mittels Overlay farblich unterschiedlich markiert (Abb. 4). Zur näheren Charakterisierung der Spermienbewegungen wurden die in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 11) aufgeführten Motilitätsparameter verwendet.

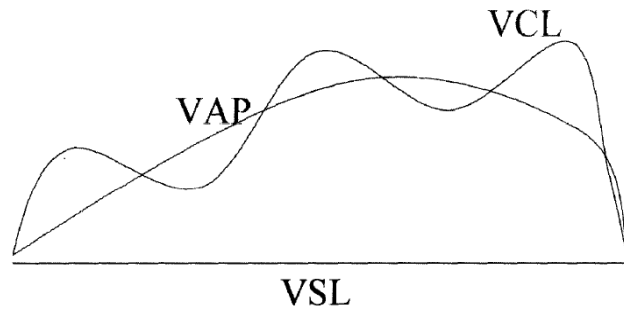


Abb. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen Geschwindigkeitsparameter nach Versteegen et al. (2002)

Abkürzungen: VAP = Velocity Average Path (mittlere Geschwindigkeit, $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$), VCL = Velocity Curve Linear (kurvilineare Geschwindigkeit, $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$), VSL = Velocity Straight Line (lineare Geschwindigkeit, $\mu\text{m}/\text{Sekunde}$)

Tab. 11: Verwendete Motilitätsparameter in der Computer-Assistierten Sperma-Analyse

Abkürzung	Übersetzung	Interpretation (Schäffer-Somi et al., 2006)	Einheit
Motile	Motilität	Anteil motiler Spermien	%
Progressive	Anteil progressiv motiler Spermien	Anteil linear motiler Spermien an der Gesamtzahl motiler Spermien	%
DCL (Distance Curved Line)	Kurvlineare Distanz	eigentlich zurückgelegte Strecke während der Messung	µm
DAP (Distance Average Path)	Durchschnittliche Distanz	berechnete Entfernung entlang einer geglätteten Linie als Bezugspunkt	µm
DSL (Distance Straight Line)	Geradlinige Distanz	zurückgelegte Entfernung zwischen Anfangs- und Endpunkt der Messung	µm
VCL (Velocity Curve Linear)	Kurvlineare Geschwindigkeit	unmittelbar aufgezeichnete fortwährende Vorwärtsbewegung entlang der gesamten Bewegungsbahn des Spermiums pro Zeiteinheit (Abb. 5)	µm/Sek.
VAP (Velocity Average Path)	Mittlere Geschwindigkeit	durchschnittlich zurückgelegte Strecke pro Zeiteinheit (Abb. 5)	µm/Sek.
VSL (Velocity Straight Line)	Lineare Geschwindigkeit	entlang einer geraden Strecke zwischen Start- und Endpunkt zurückgelegte Bahn pro Zeiteinheit (Abb. 5)	µm/Sek.
LIN (Linearity)	Linearität	Anteil der geradlinigen Entfernung in der Summe der Entfernungen während der Zeit der Messung Berechnung: (VSL/VCL)	
STR (Straightness)	Geradlinigkeit	Linearität der durchschnittlichen Bewegungsbahn Berechnung: (VSL/VAP)	
WOB (Wobble)		Auslenkung der kurvlinearen Bewegung an der durchschnittlichen Bewegung Berechnung: (VAP/VCL)	
BCF (Beat Cross Frequency)	Frequenz der Kopfbewegung	Anzahl lateraler Kopfbewegungen pro durchschnittliche Wegstrecke	Hertz
ALH (Amplitude of Lateral Head Displacement)	Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung der Spermien	durchschnittliche Amplitude der Kopfauslenkung	µm

3.3.3.2 Viabilitätsbeurteilung mittels SYBR14 und Propidiumjodid

Zur Viabilitätsbeurteilung wurde das Fluoreszenzmikroskop des SpermVision®-Systems mit einem Phasenkontrastobjektiv verwendet:

- Mikroskop Olympus BX41 (Okular10x, Fa. Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan)
- Objektiv mit negativem Phasenkontrast (UPlanFINH 20x/0,5 Ph1, Fa. Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan)
- Quecksilber-Hochdruckbrenner mit Quecksilberdampf Lampe (100W)
- Filtermodul für Breitband-Blauanregung (115-230V/ 50-60 Hz)

Die Proben wurden bei 200-facher Vergrößerung beurteilt. Die in der Tabelle 12 aufgeführten Einstellungen wurden zur Beurteilung der Viabilität mittels SYBR14/PI verwendet.

Tab. 12: Einstellungen zur Viabilitätsbeurteilung

Parameter	Einstellung	
Field of view depth (Untersuchte Eindringtiefe, Tiefe der verwendeten Kammer)	20 µm	
Pixel to µm ratio (Pixel zu µm Verhältnis)	108 zu 100	
Cell identification (Spermienerkennung)	vor Tiefgefrierung grüne Fläche: 15 bis 800 µm ² rot Fläche: 15 bis 800 µm ²	nach Tiefgefrierung grüne Fläche: 20 bis 600 µm ² rot Fläche: 10 bis 800 µm ²
Maximum area of a single cell (Max. Fläche der einzelnen Zelle)	grün: 140 µm ² rot: 160 µm ²	grün: 150 µm ² rot: 200 µm ²
Assessment Requirements (Bewertung von)	4000 Zellen oder 30 Feldern	

Zur Viabilitätsbeurteilung wurde der LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (L-7011) (Minitüb, Tiefenbach; Hersteller: Fa. Molecular Probes Inc., Eugene, USA) mit SYBR14 und Propidiumjodid angesetzt (Kap. 10.1.2.3).

Die Viabilitätsbeurteilung wurde sowohl an Frischsperma- als auch an aufgetauten Tiefgefrierspermaproben durchgeführt. Dazu wurden 2,5 µl SYBR14/PI Kit mit 10 µl Spermaprobe in einem braungefärbten Eppendorfgefäß vermischt und für 10 - 15

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden in einem abgedunkelten Raum 2,5 µl der Probe in die Leja-Kammer pipetiert und nach manueller Einstellung die Messstellen mittels Fluoreszenz untersucht. Die Messungen erfolgten immer mittig in der Kammer beginnend.

Bei einer kombinierten Verwendung von SYBR14 und PI entsteht bei intakter Membran eine grüne Fluoreszenz und bei kompletter Membranschädigung eine rote Fluoreszenz (Abb.6). Eine gleichzeitige grüne und rote Fluoreszenz ist bei Spermien mit beträchtlichen Membranschäden möglich (Peña et al., 2006). Die Differenzierung von roten und grünen Spermien erfolgt automatisch durch das SpermVision®-System. Der Anteil rot bzw. grün fluoreszierender Spermien wird in Prozent angegeben.

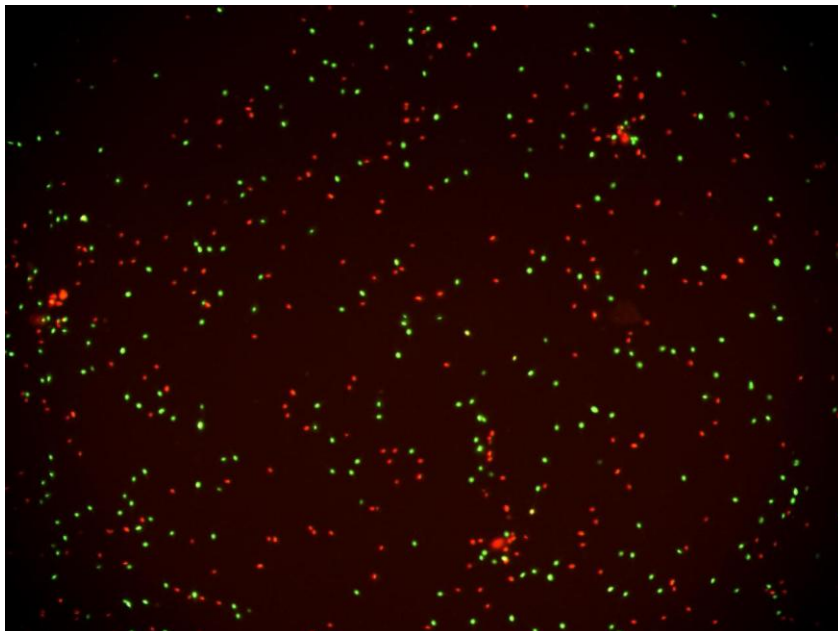


Abb. 6: Rot und grün fluoreszierende Spermien nach einer SYBR14/PI Färbung im Fluoreszenzmikroskop des SpermVision®

3.4 Aufbereitung mit den verschiedenen Verdünnern-Systemen

Voraussetzung für die Aufarbeitung der spermienreichen Fraktion mit den verschiedenen Verdünnern-Systemen war die Einhaltung der Mindestanforderungen (Tab. 13). Aufgrund abweichender Parameter und Blutbeimengungen in allen Ejakulaten wurde ein Rüde als Sonderfall behandelt und separat aufgeführt.

Tab. 13: Mindestanforderungen an die verwendeten Nativejakulate zur weiteren Aufarbeitung im Rahmen der vorliegenden Untersuchung

Parameter	Mindestanforderung an Nativejakulate für die Besamung modifiziert nach Hoffmann (2003a)
Volumen	0,5 - 2 ml
pH-Wert	6,2 - 7,2
Gesamtpermienzahl	>300 - >1000 Mio. abhängig von der Größe der Rüden
geschätzte Progressivmotilität	> 70 %
Pathomorphologie	< 20 %
Hypoosmotischer-Schwelltest	4 - 20 % „not curled“
EosinG-Färbung	Max. 20 % pathomorphologische Veränderungen, davon Max. 5 % Kopf- und 10 % Kopfkappenveränderungen

Die spermienreiche Fraktion wurde in drei gleich große Volumenanteile aliquotiert (0,3 bis 2 ml). Die Aufarbeitung mit den drei Verdünnern-Systemen TE, Up und CP erfolgte parallel. Eine Anleitung zur Herstellung des TE-, Up-, und CP-Verdünners mit den entsprechenden Inhaltsstoffen befindet sich im Anhang (Kap. 10.2). Eine vergleichende Übersicht der einzelnen Aufarbeitungsschritte ist der nachfolgenden Tabelle (Tab. 14) zu entnehmen.

Tab. 14: Vergleichende Darstellung der einzelnen Aufarbeitungsschritte der Verdüner-Systeme

TE-Verdüner	Uppsala Verdüner-System 2	Canipro™ Freeze A&B
	Zentrifugieren (700 G bzw. 2000 U, 6 Minuten) und Überstand verwerfen	
Volumen des Aliquot ermitteln	Volumen des gewonnenen Pellet ermitteln	Volumen des Aliquot ermitteln
zur Aufarbeitung der Probe mit TE-Verdüner wird die dreifache Menge (in Vol.) des Aliquot benötigt Aliquot : TE-Verdüner → 1 : 3 zunächst wird das Aliquot nur mit 50 % des TE-Verdüners versetzt Arbeitstemperatur: 37°C	zur Aufarbeitung des Pellet wird die doppelte Menge Up1 (in Vol.) zugegeben Pellet : Up1 → 1 : 2 Arbeitstemperatur: Raumtemperatur	zur Aufarbeitung des Aliquot wird die gleiche Menge CPA (in Vol.) zugegeben Aliquot : CPA → 1 : 1 Arbeitstemperatur: Raumtemperatur
	60 Minuten bei 4°C	2 Std. bei 4°C
Glycerin* wird zu den restlichen 50 % TE-Verdüner hinzugefügt, mit vorverdünnter Probe mischen Arbeitstemperatur: 37°C (*Glycerin (ml) = Gesamtvol. verdünntes Ejakulat* Faktor 0,0638)	Vorverdünnte Probe + Up2 → Up2 = doppeltes Up1 Vol. Arbeitstemperatur: 4°C	der vorverdünnten Probe wird CPB zugesetzt (gleiches Vol. wie CPA) Arbeitstemperatur: 4°C (Zugabe langsam über 1 - 3 Minuten)
Midi-Pailletten befüllen (Raumtemperatur)	Midi-Pailletten befüllen (vorgekühlt bei 4°C)	Midi-Pailletten befüllen (vorgekühlt bei 4°C)
2 Std. bei 4°C		40 Minuten bei 4°C
Frieren in einer Styropor-Box für 10 Minuten		

Abkürzungen: CPA = Verdünnermedium A des Canipro™ Freeze A&B Verdünners, CPB = Verdünnermedium B des Canipro™ Freeze A&B Verdünners, G = Gravitationskonstante, Std. = Stunden, TE = Tris-Eidotter, U/Minute = Umdrehungen pro Minute, Up1 = Verdünnermedium 1 des Uppsala Equex System 2, Up2 = Verdünnermedium 2 des Uppsala Equex System 2, Vol. = Volumen

3.4.1 Tris-Eidotter Verdünner

Der selbst hergestellte TE-Verdünner besteht aus einem Vorverdünner sowie selbigem mit Glycerinzusatz (6,38 %).

Der zuvor tiefgefrorene TE-Verdünner wird auf einem Heiztisch HT 200 (Fa. Hund, Wetzlar) auf ca. 38°C erwärmt. Das Aliquot der spermienreichen Fraktion wird in einem zweistufigen Prozess im Verhältnis 1 + 3 mit TE-Verdünner versetzt: Zunächst werden 50 % des TE-Verdünners zum Sperma zugegeben. Im Anschluss wird der glycerinhaltige Verdünneranteil mit der vorverdünnten Spermaprobe vermischt, wobei sich der Glycerinanteil aus dem Gesamtvolumen (ml) des verdünnten Ejakulates multipliziert mit Faktor 0,0638 errechnet und zuvor mit den verbliebenen 50 % des TE-Verdünners gemischt wurde.

Die aufbereiteten Samenproben werden mit einer Pipetierhilfe (Fa. Witeg, Melsungen) in bei Raumtemperatur gelagerte, zuvor beschriftete Midi-Pailletten (Fa. Minitüb, Tiefenbach) aufgezogen. Um ein Platzen der Midi-Pailletten beim Tiefgefrieren bzw. Auftauen zu verhindern, muss beim Aufziehen eine Luftblase in die Mitte eingebracht werden. Die Pailletten werden anschließend mit farbigen Kugeln (Fa. Minitüb, Tiefenbach) verschlossen und im Anschluß für 2 Stunden bei 4°C in einer Styropor-Box im Kühlschrank auf einem Rack ohne gegenseitigen Kontakt equilibriert.

3.4.2 Uppsala Equex 2-System

Das entsprechende Aliquot der spermienreichen Fraktion wird für 6 Minuten bei ca. 700 G bzw. 2000 U zentrifugiert (Fa. Heraeus Christ GmbH, Osterode); je nach Abscheidungsgrad wurde dieser Vorgang in Einzelfällen nochmals wiederholt. Nach vorsichtigem Abpipettieren und Verwerfen des Überstandes findet die Aufarbeitung der Probe mit den zwei Komponenten (Up1 & 2) des Up-Systems statt (siehe Abkürzungsverzeichnis).

Das nach dem Zentrifugieren entstandene Spermienpellet wurde mit Up1 bei Raumtemperatur im Verhältnis 1:2 verdünnt und nachfolgend im Kühlschrank in einer Styropor-Box für 1 Stunde bei 4°C equilibriert.

Nach dieser Zeit wurde zu dem vorverdünnten Sperma die doppelte Menge des beim Up1 verwendeten Volumens von auf 4°C vorgekühltem Up2 zugegeben. Die fertig aufbereiteten Spermaproben werden dann, wie bereits beim TE-Verdünner beschrieben, in Midi-Pailletten abgefüllt und verschlossen. Um

Temperaturschwankungen zu vermeiden, wurden alle zuletzt genannten Schritte auf bei 4°C im Kühlschrank gelagerten Kühl-Akkus durchgeführt.

3.4.3 CaniPRO™ Freeze A&B

Der CP-Verdünner besteht aus den Komponenten A (CPA) und B (CPB). Als erstes wird dem Aliquot der spermienreichen Fraktion die auf Raumtemperatur vortemperierte Komponente CPA in gleichem Volumen zugegeben. Danach findet eine Equilibrierung bei 4°C für 2 Stunden in einer Styropor-Box im Kühlschrank statt. Entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise wurden auch hier die nachfolgenden Schritte auf Kühl-Akkus durchgeführt, um Temperaturschwankungen zu minimieren. Die auf 4°C gekühlte Komponente CPB wird mit dem gleichen Volumen wie Komponente CPA dazugegeben. Die Zugabe erfolgte langsam über eine Zeit von 1 bis 3 Minuten. Die fertig verdünnte Probe wurde anschließend in 4°C temperierte Midi-Pailletten aufgezogen und verschlossen. Danach erfolgte eine zweite Equilibrierungsperiode für 40 Minuten bei 4°C ebenfalls in einer Styropor-Box im Kühlschrank.

Zur Erfassung möglicher Motilitätsveränderungen der jeweiligen Verdünner-Systeme wurden nach vollständiger Aufarbeitung mit dem TE-, Up- und CP-Verdünner vor dem Tiefgefrieren Motilitätsmessungen im SpermVision®-System durchgeführt.

3.5 Kryokonservierung und Auftauen

Zum Tiefgefrieren der Spermaproben wurde eine Styropor-Box mit einem Paillettenhalter (in 10 cm Höhe) eingesetzt. Diese wurde mit flüssigem Stickstoff bis auf eine Höhe von 3 cm gefüllt, mit einem Deckel verschlossen und anschließend die equilibrierten Midi-Pailletten im Dampfraum (10 cm über dem flüssigen Stickstoff, entspricht ca. -140°C) für 10 Minuten adaptiert. Danach wurden die Pailletten mit einer vorgekühlten Pinzette einzeln in den flüssigen Stickstoff (-196°C) am Boden der Styropor-Box gelegt und darauffolgend aus diesem in einen Aufbewahrungs-Container (MVE xc 21/6 Container, Chart/MVE, MN, USA bzw. Medical Products Services, Braunfels) umgelagert.

Nach einer Lagerungsdauer von mindestens 17 Tagen ($44,42 \pm 11,32$ Tage) wurden die Pailletten aufgetaut. Das Auftauen erfolgte für 60 Sekunden in einem Wasserbad (Fa. Memmert, Schwachbach) bei 37 °C.

3.6 Untersuchung des Tiefgefrierspermas

Unabhängig vom Verdünner-System wurden die Proben nach dem Auftauen in 2 Teile zu je 200 µl aliquotiert. Dem 2. Aliquot wurde ein Auftaumedium (UpA, 200 µl, Rezept Anhang Kap. 10.1.1) zugesetzt. Die Up-Verdünnerproben (ohne UpA) wurden nochmals in zwei Aliquots zu je 100 µl geteilt. Eine der beiden Proben wurde mit 100 µl Up1 vermischt, das andere Aliquot unverdünnt verwendet. Die weitere Verdünnung mit Up1 war notwendig damit die Probe im SpermVision® gemessen werden konnte.

Alle Proben wurden nach dem Auftauen sowie zu definierten Zeiten einer vergleichenden spermatologischen Untersuchung unterzogen. Direkt nach dem Auftauen erfolgte die Bestimmung des Anteils lebender und toter Spermien sowie des Anteils morphologisch veränderter Spermien im EosinG Ausstrich, zudem wurde eine Beurteilung des Akrosoms nach dem Tiefgefrieren anhand eines Spermac® gefärbten Ausstriches durchgeführt. Weiterhin wurden direkt nach dem Auftauen, nach 10, 30 und 60 Minuten Inkubationszeit bei 37°C in einem Wasserbad die GM und PM geschätzt sowie mittels SpermVision® Motilität und Viabilität erfasst.

Sofern eine Messung der Up und mit UpA verdünnten Proben nicht möglich war, wurden diese nochmals verdünnt. Dazu wurden 10 µl der Probe mit 10 µl UpA vermischt.

3.7 Statistische Auswertung

Die drei verwendeten Verdünner-Systeme wurden bezüglich ihrer Eignung für die Kryokonservierung von caninem Sperma verglichen. Ebenfalls wurden die Effekte eines Auftaumediums (UpA) auf Motilität und Viabilität von kryokonserviertem Hundesperma untersucht. Des Weiteren diente die Arbeit dazu, Parameter der konventionellen Ejakulatanalyse mit denen der computergestützten Sperma-Analysen durch ein SpermVision®-System zu vergleichen.

Die Ejakulate eines Rüden wurden als Sonderfall behandelt, da alle drei Ejakulate rötliche Färbungen aufwiesen. Die Ergebnisse wurden in der statistischen Gesamtauswertung nicht mit berücksichtigt, jedoch am Ende des Ergebniskapitels vergleichend beschrieben. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte überwiegend durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hierzu wurde Microsoft® Excel 2007 und das Statistikprogramm BMDP (Release 8.1, 1993)

verwendet: BMDP/1D (Einfache Datenbeschreibung), BMDP/3D (T-Test), BMDP/6D (Scatterplots für bivariate Daten), BMDP/2V (Varianz- und Kovarianzanalyse) und BMDP/8V (Methoden- bzw. Mittelwertunterschiede in der Pseudoreplikation). Im Anschluss an eine Varianzanalyse wurde teilweise ein multipler Mittelwertvergleiche nach Student-Newman-Keuls durchgeführt. Da von jedem Rüden drei Untersuchungsergebnisse vorlagen, wurde jeweils ein Mittelwert zur weiteren Berechnung ermittelt.

Die einfache Datenbeschreibung erfolgte durch Darstellung von

- arithmetischem Mittelwert (\bar{x})
- Standardabweichung (SD)
- Variationskoeffizient (VK)
- Minimum und Maximum (Min., Max.)

Hierbei wurden zur Beurteilung morphologisch abweichender Spermienformen folgende Gruppen zusammengefasst: Kopf- und Kappenveränderungen, Schwanzveränderungen, lose Köpfe sowie Plasmotropfen. Aus der Summe aller Veränderungen wurde der Gesamtprozentsatz morphologisch veränderter Samenzellen als Beurteilungsparameter herangezogen. Werte, die nicht normalverteilt waren, wurden als modifizierter S-Bereich nach Arcus-Sinus Transformation (Nativproben: Kopf-, Kappenveränderungen, lose Köpfe, Plasmotropfen, CASA PM; Aufgetaute Proben: CASA PM von unverdünnten, mit UpA und Up1 versetzten Proben) dargestellt. Zum Nachweis von Mittelwertunterschieden der geschätzten und mittels SpermVision® gemessenen PM der Nativproben wurde ein t-Test für abhängige Stichproben durchgeführt.

Um Unterschiede durch den Verdünnerzusatz vor der Kryokonservierung darzustellen, wurde die Differenz der SpermVision® gemessenen Motilitätsparameter nach vollständiger Aufarbeitung vor der Tiefgefrierung und der Nativejakulate gebildet und eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich der drei zu untersuchenden Verdünner durchgeführt. Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen den drei Verdünnergruppen wurde im Anschluss an die Varianzanalyse ein paarweiser Vergleich aller Verdünnermittelwerte nach Student-Newman-Keuls vorgenommen.

Die durch den Kryokonservierungsprozess auftretenden Unterschiede der Motilitätsparameter wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse mit einer

Messwiederholung bezüglich der drei verschiedenen Verdüner und dem Untersuchungszeitpunkt (vor und direkt nach dem Auftauen) untersucht.

Nach dem Auftauen wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse für die geschätzte und gemessene GM und PM mit einer Messwiederholung bezüglich der Faktoren Zeit nach dem Auftauen (0, 10, 30, 60 Minuten), Untersuchungsmethode (Subjektiv/CASA), Verdüner (TE/Up/CP) und Auftauzusatz (ohne/mit UpA) durchgeführt. Um genauere Unterschiede zwischen den Verdünnern mit UpA Zusatz festzustellen, wurde eine zusätzliche Varianzanalyse mit Gegenüberstellung von jeweils zwei Verdünnern bezüglich der geschätzten und im CASA gemessenen GM und PM durchgeführt. In einer separaten Berechnung, die nur den Up-Verdüner beinhaltet, wurden die Effekte eines Zusatzes von Up1, UpA und unverdünnten Proben untersucht. Eine dreifaktorielle Varianzanalyse der im CASA ermittelten ergänzenden Motilitätsparameter (DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF) wurde mit einer Messwiederholung bezüglich der Faktoren Verdüner, Auftaumittel (ohne/mit UpA) und Zeitpunkt nach dem Auftauen gemacht. Auch hier wurde für den Up-Verdüner eine separate Untersuchung der Auswirkungen eines Zusatzes von Up1, UpA oder unverdünnten Proben angefertigt. Mit dem Ziel Unterschiede im Anteil lebender und morphologisch veränderter Spermien sowie dem akrosomalen Status zwischen den Verdünnern feststellen zu können, wurden diese Ergebnisse direkt nach dem Auftauen mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich der drei verschiedenen Verdüner untersucht. Zur Verdeutlichung der durch den Kryokonservierungsprozess und die Verdüneraufbereitung stattfindenden Unterschiede wurde die Differenz zu den nativ gemessenen Werten gebildet. Weiterhin wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse zur Beurteilung der Viabilität mit einer Messwiederholung bezüglich der Faktoren Verdüner, Verwendung des Auftaumittels UpA sowie des Untersuchungszeitpunktes nach dem Auftauen durchgeführt. Auch hier wurde zur besseren Darstellung die Differenz zu den nativ gemessenen Werten gebildet.

Eine Korrelationsanalyse diente der Darstellung statistischer Zusammenhänge zwischen subjektiver und objektiver (CASA) Ejakulatbeurteilung. Hierzu wurden alle zeitgleichen Variablenpaare der GM und PM, ebenso wie der Anteil lebender Spermien und die Viabilität vergleichend untersucht (n = 10). Zusätzlich wurde eine

Pseudoreplikation ($n = 30$) durchgeführt, die alle drei Untersuchungstermine getrennt voneinander als unabhängige Proben berücksichtigt.

Bei der Bewertung statistischer Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha \leq 0,05$ zugrunde gelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate

Im Folgenden bezieht sich die Bezeichnung „Ejakulat“ auf die spermienreiche Fraktion. Wie bereits im Kapitel Material und Methoden beschrieben wurde aus den Ergebnissen für alle untersuchten Parameter ein Mittelwert der drei Ejakulate jedes Rüden berechnet.

4.1.1 Ergebnisse der makroskopischen und chemisch-physikalischen Untersuchung

Das durchschnittliche Volumen der spermienreichen Fraktion lag bei $3,6 \pm 0,2$ ml (Min. 2,2 ml, Max. 6 ml).

Alle Ejakulate ($n = 30$) zeigten eine weiße Farbe. Die Konsistenz der Proben war zu 73,3 % ($n = 22$) milchig, 16,7 % ($n = 5$) molkig, 6,7 % ($n = 2$) wässrig und zu 3,3 % ($n = 1$) sahnig.

Bei allen untersuchten Ejakulaten lagen die pH-Werte innerhalb des Referenzbereiches zwischen 6,2 und 7,2 (Hoffmann, 2003a). Im Durchschnitt wurde ein pH-Wert von $6,5 \pm 0,2$ (Min. 6,3, Max. 6,7) mittels pH-Indikatorpapier gemessen.

Im SpermaCue wurde eine durchschnittliche Dichte der spermienreichen Fraktion von $265,7 \pm 68,9$ Mio./ml ermittelt (Min. 116 Mio./ml, Max. 338,7 Mio./ml). Diese wurde zur Berechnung der Spermiengesamtzahl verwendet. Die untersuchten Rüden hatten eine durchschnittliche Spermiengesamtzahl von $894,8 \pm 150,3$ Millionen (Min. 484,2 Mio., Max. 1199,5 Mio.).

4.1.2 Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung

Die PM lag im Mittel bei $80,0 \pm 4,8$ % (Min. 73,3 %, Max. 88,3 %). Mittels Eosin-Ausstrich wurde ein durchschnittlicher Anteil von $87,7 \pm 2,8$ % lebenden Spermien (Min. 83,8 %, Max. 92,3 %) und $11,7 \pm 4,6$ % (Min. 4,7 %, Max. 19,3 %) morphologisch veränderten Samenzellen nachgewiesen. Bei den morphologisch veränderten Spermien handelte es sich bei 0,1 % (+ 0,3; 0) (Min. <0,1 %, Max. 0,8 %) um Kopf- und Kappenveränderungen, bei $8,5 \pm 3,2$ % (Min. 4 %, Max. 13,7 %) um Geißelveränderungen, bei 1,4 % (+ 0,9; - 0,7) (Min. 0,7 %, Max. 3 %) um lose Köpfe und bei 0,5 % (+ 2,7; - 0,5) (Min. <0,1 %, Max. 11 %) um Plasmatropfen. Ein Verlust des Akrosoms wurde bei $1,5 \pm 0,9$ %

(Min. 0,7 %, Max. 3,2 %) der Spermienköpfe mittels Spermac®-Färbung nachgewiesen. Der hypoosmotische-Schwelltest zeigte bei $4,7 \pm 0,1$ % (Min. 2,3 %, Max. 9,3 %) der untersuchten Spermien eine nicht aufgerollte Geißel. Lichtmikroskopisch nachweisbare Beimengungen waren Rund- und Plattenepithelien.

4.1.3 Ergebnisse der SpermVision® Untersuchungen

4.1.3.1 Ergebnisse der computerassistierten Motilitätsanalyse

Mittels CASA wurde eine durchschnittliche GM von $78,2 \pm 7,9$ % (Min. 62,1 %, Max. 88,3 %) und eine PM von 70,6 % (+ 8,0; - 8,7) (Min. 54,5 %, Max. 81,1 %) gemessen.

Die Mittelwerte der CASA-spezifischen Motilitätsparameter waren wie folgt:

DCL: $54,0 \pm 5,3$ µm (Min. 42,4 µm, Max. 61,8 µm)

DSL: $20,5 \pm 2,4$ µm (Min. 16,5 µm, Max. 25,0 µm)

DAP: $28,0 \pm 2,8$ µm (Min. 24,1 µm, Max. 33,3 µm)

VAP: $64,3 \pm 7,1$ µm/Sek. (Min. 54 µm/Sek., Max. 76,3 µm/Sek.)

VCL: $123,3 \pm 13,0$ µm/Sek. (Min. 93,8 µm/Sek., Max. 143,3 µm/Sek.)

VSL: $47,1 \pm 5,7$ µm/Sek. (Min. 37,1 µm/Sek., Max. 57,8 µm/Sek.)

STR: $0,7 \pm < 0,1$ (Min. 0,7, Max. 0,8)

LIN: $0,4 \pm < 0,1$ (Min. 0,3, Max. 0,5)

WOB: $0,5 \pm < 0,1$ (Min. 0,5, Max. 0,6)

ALH: $5,2 \pm 0,9$ µm (Min. 3,6 µm, Max. 6,6 µm)

BCF: $23,9 \pm 1,6$ Herz (Min. 21,7 Herz, Max. 26,2 Herz)

4.1.3.2 Ergebnisse der Viabilitätsbeurteilung mittels SYBR14 und Propidiumjodid

Die Viabilität der Spermien in den Nativejakulaten betrug im Durchschnitt $85,9 \pm 5,7$ % (Min. 75,7 %, Max. 96,0 %).

4.1.4 Zusammenhang zwischen subjektiver und mittels SpermVision® gemessener Motilität

In einer Korrelationsanalyse, welche ein Maß für die Straffheit des linearen Zusammenhanges darstellt, ließen sich sowohl zu den drei verschiedenen

Absamungsterminen als auch in einer Pseudoreplikation keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen subjektiver und mittels CASA ermittelter PM verifizieren.

Anhand eines t-Test konnte ein signifikanter Mittelwertunterschied zwischen subjektiver und objektiver Methode belegt werden ($p < 0,01$). Die Mittelwerte der geschätzten PM lagen durchschnittlich 9,7 % über den mittels CASA ermittelten Werten. Betrachtet man jedoch die drei Absamungstermine gesondert, so waren im Gegensatz zu Termin 3 ($p < 0,01$, $14,8 \pm 13,5$) die Unterschiede bei Termin 1 und 2 nicht signifikant (t1: $p = 0,07$, $7,9 \pm 12,1$ %; t2: $p = 0,12$, $6,3 \pm 11,6$ %). Auch eine Pseudoreplikation bestätigte den Methodenunterschied ($p < 0,01$).

4.1.5 Zusammenhang zwischen dem Anteil lebender Spermien und der Viabilität

Für die untersuchten Nativproben konnte weder bei Einzelbetrachtung noch in einer Pseudoreplikation eine statistisch signifikante Korrelation der Spermien-Viabilität und des Anteils lebender Spermien nachgewiesen werden. Mittels CASA erfasste Viabilitäten lagen durchschnittlich 1,8 % unter dem mittels Eosin Ausstrich ausgezählten Lebend-Anteil. Die Unterschiede zwischen den beiden Untersuchungsmethoden waren im t-Test nicht signifikant.

4.2 Untersuchungsergebnisse nach vollständiger Aufarbeitung vor Kryokonservierung

Nach der vollständigen Aufarbeitung mit den einzelnen Verdünner-Systemen erfolgte eine erneute Untersuchung der Proben mittels SpermVision®. Zur Erfassung der Effekte, die durch das Verdünnen auftraten, und zur besseren Darstellung der Motilitäts-Unterschiede wurden die Differenzen der Mittelwerte zwischen den Nativejakulaten und den einzelnen Verdünnern gebildet (Tab. 15).

Nach Zugabe aller Verdünnerkomponenten zum Nativejakulat wurden signifikante Unterschiede zwischen den Verdünnern für die GM ($p = 0,01$) und PM ($p < 0,01$) ermittelt. Bezüglich der GM und PM wurden im CP-Verdünner die geringsten, im TE-Verdünner hingegen die stärksten Motilitätsabnahmen festgestellt. Im Student-Newman-Keuls Test zeigten sich dabei deutliche Unterschiede zwischen den drei untersuchten Verdünnern: GM und PM unterschieden sich zwischen TE und CP jeweils mit $p < 0,01$, zwischen Up und TE mit $p < 0,05$ (GM) bzw. $p < 0,01$ (PM) sowie zwischen Up und CP mit je $p < 0,05$.

Tab. 15: Durchschnittliche Abnahme der im SpermVision® ermittelten Motilität nach vollständiger Verdünnung der Aliquots im Vergleich zum Nativsperma, angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD)

Parameter	TE-Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	Up-Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	CP -Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	p-Werte
GM (%)	-26,9 ± 14,6a	-17,9 ± 16,4c	-9,8 ± 15,5b	p < 0,01
PM (%)	-31,5 ± 13,6a	-21,0 ± 15,0c	-12,0 ± 16,7b	p < 0,01
DAP (µm)	-4,3 ± 2,3a	-3,7 ± 3,6a	2,2 ± 4,4b	p < 0,01
DCL (µm)	-13,2 ± 5,6a	-13,7 ± 7,3a	-1,2 ± 7,1b	p < 0,01
DSL (µm)	-1,5 ± 1,7a	-1,7 ± 2,7a	3,0 ± 4,0b	p < 0,01
VAP (µm/Sek.)	-11,2 ± 6,2a	-7,7 ± 9,2a	5,2 ± 11,7b	p < 0,01
VCL (µm/Sek.)	-32,4 ± 14,2a	-29,7 ± 18,2a	-2,5 ± 19,6b	p < 0,01
VSL (µm/Sek.)	-4,4 ± 3,9a	-3,3 ± 6,5a	7,1 ± 9,7b	p < 0,01
ALH (µm)	-1,5 ± 1,1a	-0,6 ± 1,2b	-0,3 ± 1,4b	p < 0,01
STR	0,1 ± 0,1a	0,02 ± 0,1a	0,04 ± 0,1a	p = 0,09
LIN	0,1 ± 0,1a	0,1 ± 0,1a	0,1 ± 0,1a	p = 0,38
WOB	0,1 ± 0,0a	0,1 ± 0,1a	0,1 ± 0,04a	p = 0,34
BCF (Herz)	-1,1 ± 1,9a	-2,7 ± 2,9a	-1,5 ± 1,8a	p = 0,10

a, b: Daten mit verschiedenen Buchstaben in einer Zeile differieren signifikant (p < 0,01)

c: Daten mit verschiedenen Buchstaben in einer Zeile differieren signifikant (p < 0,05)

Die Streckenparameter DAP, DCL und DSL veränderten sich signifikant nach der vollständigen Aufarbeitung mit den drei Verdünner-Systemen (p < 0,01). Bezüglich der Streckenparameter war das CP-System den anderen Verdünnern überlegen. Bei den Parametern DSL und DAP wurden sogar höhere Werte als im unverdünnten Nativsperma gemessen. Die größten Abnahmen bezüglich des DAP Wertes wurden beim TE-Verdünner festgestellt. Bei den Motilitätsparametern DCL und DSL zeigte hingegen das Up-System die größten Abnahmen. Für die Geschwindigkeitsparameter VAP, VCL und VSL wurden ebenfalls statistisch signifikante Verdünnerdifferenzen ermittelt (p < 0,01). Auch hier erwies sich die Zugabe von CP als positiv, da es zu den geringsten Beeinträchtigungen kam, hinsichtlich der VAP und der VSL kam es sogar zu einer Erhöhung der Geschwindigkeit verglichen mit den Nativejakulaten. Die stärksten Abnahmen bezüglich VAP, VSL und VCL zeigte der TE-, gefolgt vom Up-Verdünner. Im Student-Newman-Keuls Test zeigten sich für die Streckenparameter (DAP, DCL, DSL) und Geschwindigkeitsparameter (VAP, VCL, VSL) signifikante Mittelwertunterschiede

zwischen CP- und Up- sowie zwischen CP- und TE-Verdüner ($p < 0,01$). Zwischen TE- und Up-Verdüner konnte jedoch für diese Parameter kein statistischer Unterschied festgestellt werden.

Bezüglich ALH wurden mit dem TE-Verdüner die stärksten und mit dem CP-Verdüner die geringsten Abnahmen festgestellt. Die Unterschiede zwischen den drei Verdünnern waren statistisch signifikant ($p < 0,01$). Im Student-Newman-Keuls Test wurden signifikante Mittelwertunterschiede ($p < 0,01$) zwischen dem TE- und Up-Verdüner sowie dem TE- und CP-Verdüner, jedoch nicht zwischen Up- und CP-Verdüner nachgewiesen.

Die Parameter STR, LIN und WOB zeigten bei allen drei Verdünnern nur geringe Unterschiede, welche sich statistisch nicht signifikant unterschieden.

4.3 Ergebnisse nach Kryokonservierung

4.3.1 Einfriereffekt

Vor dem Kryokonservierungsprozess wurden im CP-Verdüner die höchsten GM- und PM-Werte ermittelt (GM: $68,4 \pm 16,5$ %, PM: $58,7$ % (+ $18,5$; - $19,9$) (Abb. 8). Nach dem Auftauen zeigte jedoch der Up-Verdüner die höchste GM und PM (GM: $46,0 \pm 17,5$ %, PM: $34,2$ % (+ $17,5$; - $15,5$). Die während des Kryokonservierungsprozesses festgestellten Motilitätsabnahmen waren statistisch signifikant ($p < 0,01$). Die geringsten Verluste der GM (GM vor TG: $60,3 \pm 15,3$ %, GM nach TG: $46,0 \pm 17,5$ %) und PM (PM vor TG: $49,3$ % + $14,8$; - $14,8$, PM nach TG: $34,2$ % + $17,5$; - $15,5$) konnten demzufolge im Up-Verdüner-System beobachtet werden. Die größten Unterschiede zwischen vor und nach der Tiefgefrierung waren im CP-Verdüner feststellbar (GM vor TG: $68,4 \pm 16,5$ %, GM nach TG: $28,2 \pm 10,0$ %, PM vor TG: $58,7$ % + $18,5$; - $19,9$, PM nach TG: $16,6$ % + $11,2$; - $8,7$). Die Unterschiede zwischen den Verdünnern waren statistisch signifikant ($p < 0,01$).

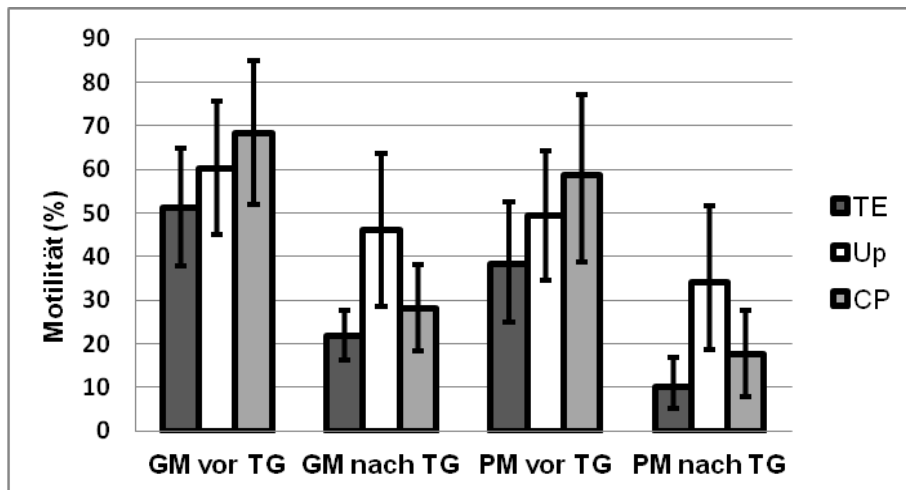


Abb. 8: Im CASA ermittelte Gesamt- (GM, %) und Progressivmotilität (PM, %) der vollständig aufgearbeiteten Proben vor und nach Tiefgefrierung (TG), GM angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}), PM als modifizierter ein S-Bereich nach Arcus-Sinus Transformation mit jeweiliger Standardabweichung (SD). Die Unterschiede zwischen den Verdünnern bezüglich der durchschnittlichen Abnahme der GM und PM waren statistisch signifikant ($p < 0,01$).

4.3.2 Auftauergebnisse der Gesamt- und Progressivmotilität

4.3.2.1 Unbehandelte Proben

Während der Inkubation im Wasserbad veränderten sich die Ergebnisse der GM und PM deutlich (GM und PM $p < 0,01$). In einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse bezüglich der Faktoren Untersuchungsmethode (Subjektiv/CASA), Zeit nach dem Auftauen, Verdünner (TE/Up/CP) und Auftaumedium (unverdünnt/UpA) erwiesen sich die nachfolgend beschriebenen Unterschiede zwischen den Verdünnern nach dem Auftauen als statistisch signifikant (GM und PM $p < 0,01$). Auch im paarweisen Vergleich bezüglich der GM und PM zeigten sich signifikante Unterschiede der drei untersuchten Verdüner (subj. und CASA: TE vs. CP/ TE vs. Up/ Up vs. CP jeweils für GM $p < 0,01$, PM $p < 0,01$). Die geschätzte GM und PM war in der Regel höher als die im CASA ermittelte Motilität. Jedoch wurden beim TE-Verdünner (auch mit UpA Zusatz) für die GM und PM höhere Ergebnisse mit dem SpermVision® nach 60 Minuten Inkubationszeit erzielt. Die festgestellten Unterschiede zwischen subjektiv geschätzter und mittels CASA gemessener GM und PM waren statistisch signifikant (GM und PM $p < 0,01$). Bezüglich der GM und PM konnten mit dem Up-Verdünner nach dem Auftauen zu allen Untersuchungszeitpunkten subjektiv und mittels CASA

objektiv die besten Ergebnisse erzielt werden (Abb. 9 und 10). Sowohl bei den geschätzten als auch bei den mittels SpermVision® gemessenen Werten konnte ein Anstieg der GM und PM nach 10 Minuten Inkubationszeit beobachtet werden. Die höchste ermittelte GM nach Verdünnung mit Up betrug geschätzt $60,5 \pm 7,0$ % und gemessen $50,1 \pm 13,9$ %. Die PM wurde nach 10-minütiger Inkubation durchschnittlich subjektiv auf $50,5 \pm 13,4$ % geschätzt, im CASA lag der Mittelwert bei $37,0$ % (+ 13,8; - 12,8).

Mit dem CP-Verdüner wurden für die GM und PM zu allen Zeitpunkten nach dem Auftauen subjektiv und mittels CASA Werte unterhalb der des Up-Verdüners gemessen, allerdings konnte auch hier ein Anstieg der GM und PM nach 10-minütiger Inkubationszeit nachgewiesen werden. Die maximale GM lag bei $49,8 \pm 12,6$ % (Schätzung) bzw. bei $28,9 \pm 10,0$ % (CASA). Die PM betrug geschätzt $41,7 \pm 15,2$ % und gemessen $17,2$ % (+ 10,8; - 8,6).

Die geringsten Motilitäten wurden mit beiden Untersuchungsmethoden zu allen Zeitpunkten nach dem Auftauen im TE-Verdüner beobachtet. Die höchsten GM und PM wurden sowohl nach subjektiver Schätzung als auch mittels CASA direkt nach dem Auftauen erreicht (GM: $32,0 \pm 13,3$ % bzw. $21,8 \pm 5,7$ %, PM: $20,4 \pm 13,4$ % bzw. $10,2$ % (+ 6,7; - 5,2).

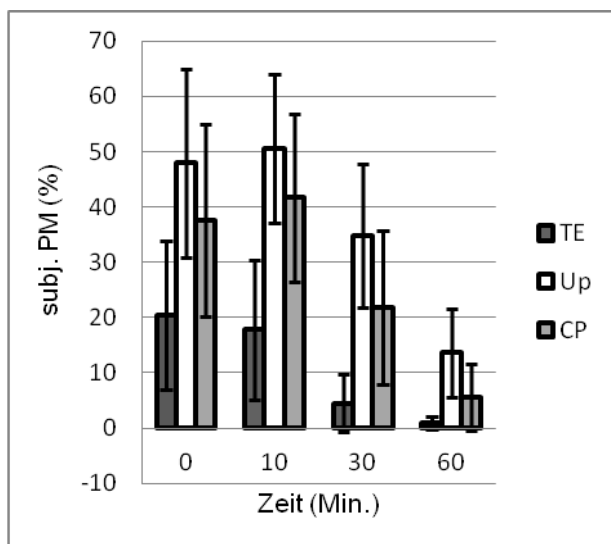


Abb. 9: Subjektive Progressivmotilität (subj. PM, %) der aufgetauten Proben nach 0, 10, 30 und 60 Minuten Inkubationszeit, angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD). Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

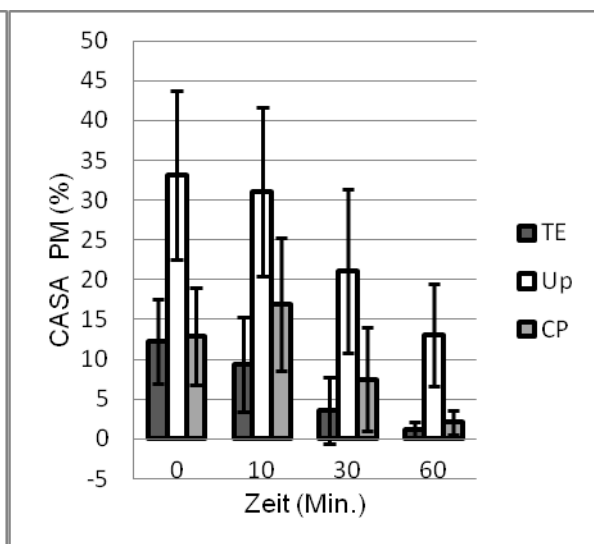


Abb. 10: Im CASA ermittelte Progressivmotilität (CASA PM, %) der aufgetauten Proben nach 0, 10, 30 und 60 Minuten Inkubationszeit, angegeben als modifizierter ein S-Bereich nach Arcus-Sinus Transformation mit jeweiliger Standardabweichung (SD). Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

Tab. 16: Geschätzte und mittels SpermVision® ermittelte Gesamt- (GM) und Progressivmotilität (PM) der aufgetauten Verdünnerproben, für GM (geschätzt, CASA) und PM (geschätzt) angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und für PM (CASA) als modifizierter ein S-Bereich nach Arcus-Sinus Transformation. Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

Untersuchungsmethode und Parameter	Zeit (Minuten)	TE-Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	Up-Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	CP-Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)
GM, geschätzt (%)	0	32,0 ± 13,3	58,3 ± 10,2	47,0 ± 13,8
	10	27,1 ± 12,8	60,5 ± 7,0	49,8 ± 12,6
	30	13,3 ± 6,6	51,4 ± 11,5	39,5 ± 11,3
	60	4,9 ± 4,5	34,6 ± 14,5	19,9 ± 12,6
GM, CASA (%)	0	21,8 ± 5,7	46,0 ± 17,5	28,2 ± 10,0
	10	19,8 ± 7,3	50,1 ± 13,9	28,9 ± 10,0
	30	12,0 ± 4,2	37,1 ± 12,3	20,9 ± 7,7
	60	9,0 ± 2,2	24,1 ± 7,4	12,9 ± 5,0
PM, geschätzt (%)	0	20,4 ± 13,4	47,9 ± 17,1	37,6 ± 17,4
	10	17,8 ± 12,6	50,5 ± 13,4	41,7 ± 15,2
	30	4,5 ± 5,2	34,8 ± 12,9	21,8 ± 13,9
	60	0,9 ± 1,2	13,6 ± 8,0	5,6 ± 6,1
PM, CASA (%)	0	10,2 (+ 6,7; - 5,2)	34,2 (+ 17,5; - 15,5)	16,6 (+ 11,2; - 8,7)
	10	9,0 (+ 7,3; - 5,3)	37,0 (+ 13,8; - 12,8)	17,2 (+ 10,8; - 8,6)
	30	2,4 (+ 1,9; - 1,8)	23,7 (+ 11,4; - 9,7)	9,4 (+ 7,0; - 5,2)
	60	0,8 (+ 0,5; - 0,4)	13,0 (+ 6,7; - 5,5)	3,0 (+ 2,9; - 1,9)

4.3.2.2 Nach Zusatz von Auftaumedium

Durch den generellen Zusatz von Auftaumedium (UpA) zu den drei getesteten Verdünnern nach dem Auftauen konnte trotz tendenzieller Beobachtungen keine generelle statistisch abgesicherte Verbesserung der GM ($p = 0,11$) und PM ($p = 0,35$) nachgewiesen werden. Die drei untersuchten Verdüner reagierten jedoch auf einen UpA Zusatz bezüglich der GM und PM unterschiedlich (subj. und CASA: TE vs. CP GM $p < 0,05$, PM $p < 0,01$; TE vs. Up GM $p = 0,93$, PM $p = 0,26$; Up vs. CP GM $p < 0,05$, PM $p = 0,11$) (Abb. 11, 12).

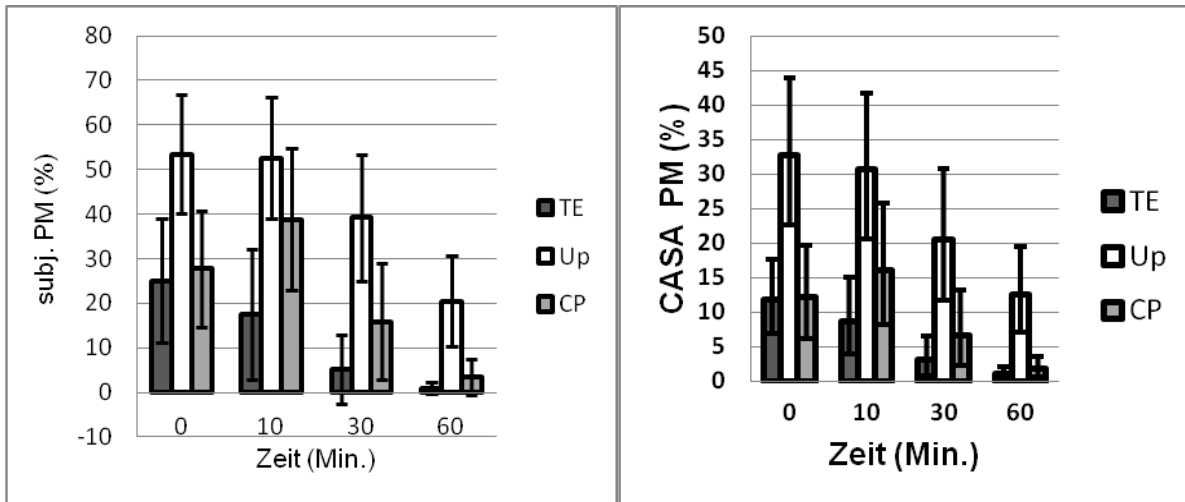


Abb. 11: Subjektive Progressive Motilität (subj. PM, %) der aufgetauten Proben mit Zusatz von Auftaumedium (UpA) nach 0, 10, 30 und 60 Minuten Inkubationszeit, angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD). Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

Abb. 12: Im CASA ermittelte Progressive Motilität (CASA PM, %) der aufgetauten Proben mit Zusatz von Auftaumedium (UpA) nach 0, 10, 30 und 60 Minuten Inkubationszeit, angegeben als modifizierter ein S-Bereich nach Arcus-Sinus Transformation und jeweiliger Standardabweichung (SD). Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

Mit einem UpA Zusatz zum Up-Verdüner konnte bezüglich der subjektiven Schätzungen der GM und PM nach dem Auftauen zu allen untersuchten Zeitpunkten ein positiver Einfluß beobachtet werden. Dieser Zusammenhang konnte mittels CASA nicht bestätigt werden. Von allen drei Verdünnern erzielte zu allen Zeitpunkten nach dem Auftauen und mit beiden verwendeten Untersuchungsverfahren das Up-System die höchsten GM und PM Ergebnisse. Mit dem SpermVision® wurde direkt nach dem Auftauen die höchste GM von durchschnittlich $43,4 \pm 9,3$ % gemessen. Jedoch waren die subjektiv geschätzten Werte 10 Minuten nach dem Auftauen mit durchschnittlich $61,8 \pm 8,8$ % am höchsten. Bezüglich der PM wurden direkt nach dem Auftauen die besten Ergebnisse mit beiden Untersuchungsmethoden erreicht. Der Zusatz von UpA zum CP-Verdüner zeigte keine positiven Effekte auf die GM und PM. Die erreichten Motilitäten lagen zwischen denen des Up- und TE-Verdüners. Wie auch bereits ohne Zusatz von UpA festgestellt, wurden die höchsten Motilitäten erst nach 10 Minuten Inkubationszeit erreicht. Durch Zugabe von UpA zum TE-Verdüner zeigte sich eine Verbesserung der subjektiven und im CASA ermittelten GM und PM sowohl direkt nach dem Auftauen als auch nach 30 und 60 Minuten Inkubationszeit. Nach 10 minütiger Inkubationszeit

konnte nur subjektiv eine verbesserte GM festgestellt werden, die im CASA ermittelte GM und PM sowie subjektiv erfasste PM verschlechterten sich. Auch nach Zugabe von UpA waren die Ergebnisse des TE-Verdünners am schlechtesten.

Die entsprechenden Werte sind der nachfolgenden Tabelle (Tab. 17) zu entnehmen.

Tab. 17: Geschätzte und mittels SpermVision® ermittelte Gesamt- (GM) und Progressivmotilität (PM) der aufgetauten Verdünnerproben mit Zusatz von Auftaumedium (UpA), für GM (geschätzt, CASA) und PM (geschätzt) angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und für PM (CASA) als modifizierter ein S-Bereich nach Arcus-Sinus Transformation. Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

Untersuchungsmethode und Parameter	Zeit (Minuten)	TE-Verdüner ($\bar{x} \pm SD$)	Up-Verdüner ($\bar{x} \pm SD$)	CP-Verdüner ($\bar{x} \pm SD$)
GM, geschätzt (%)	0	33,4 ± 13,3	61,8 ± 8,6	43,0 ± 12,1
	10	27,4 ± 12,1	61,8 ± 8,8	49,0 ± 12,7
	30	16,7 ± 9,5	52,8 ± 11,7	31,8 ± 11,3
	60	6,9 ± 6,1	37,6 ± 16,3	17,6 ± 11,0
GM, CASA (%)	0	23,1 ± 5,8	43,4 ± 9,3	23,5 ± 7,6
	10	19,7 ± 6,1	41,0 ± 10,1	27,3 ± 9,1
	30	13,5 ± 4,6	31,4 ± 9,7	17,1 ± 7,4
	60	9,4 ± 2,3	23,2 ± 8,1	10,7 ± 3,9
PM, geschätzt (%)	0	25,1 ± 14,0	53,5 ± 13,4	27,7 ± 13,0
	10	17,5 ± 14,7	52,6 ± 13,7	38,8 ± 15,9
	30	5,2 ± 7,8	39,2 ± 14,1	15,9 ± 13,0
	60	1,0 ± 1,2	20,4 ± 10,2	3,5 ± 4,1
PM, CASA (%)	0	11,8 (+ 5,9; - 4,9)	32,8 (+ 11,1; - 10,2)	12,1 (+ 7,6; - 6,0)
	10	8,7 (+ 6,3; - 4,7)	30,6 (+ 11,1; - 10,0)	16,0 (+ 9,8; - 7,8)
	30	3,0 (+ 3,6; - 2,2)	20,4 (+ 10,4; - 8,7)	6,6 (+ 6,5; - 4,4)
	60	1,0 (+ 1,0; - 0,7)	12,6 (+ 6,8; - 5,5)	1,8 (+ 1,7; - 1,2)

4.3.2.3 Nach Zusatz von Verdünnermedium 1

Bei einem Großteil der Up-Proben konnte aufgrund einer zu hohen Dichte die Motilitätsanalyse im SpermVision®-System nur nach vorheriger Verdünnung mit Up1 durchgeführt werden. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde eine zusätzliche Probenreihe Up1 verdünnter Up-Proben untersucht.

Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede der GM und PM zwischen unverdünnten, mit UpA oder Up1 versetzten Proben (GM $p = 0,02$, PM $p < 0,01$) (Abb. 13 und 14). Zwischen den subjektiv geschätzten und im CASA gemessenen Ergebnissen der GM und PM wurden signifikante Unterschiede in einer mehrfaktorielle Varianzanalyse festgestellt ($p < 0,01$), weiterhin wurden methodenabhängige Unterschiede zwischen unverdünnten, mit UpA oder Up1 versetzten Proben nachgewiesen (GM $p < 0,01$, PM $p < 0,01$). Die Messergebnisse der einzelnen Untersuchungszeitpunkte unterschieden sich signifikant (GM $p < 0,01$, PM $p < 0,01$). Nach Zugabe von Up1 konnte direkt nach dem Auftauen mit beiden Methoden eine GM erreicht werden, die zwischen denen der unverdünnten und mit UpA versetzten Proben lag.

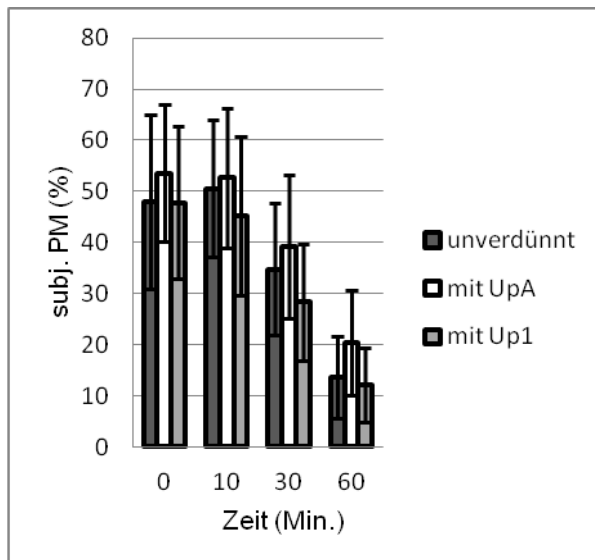


Abb. 13: Subjektive Progressivmotilität (PM, %) der aufgetauten Uppsala-Verdünnerproben mit Zusatz von Auftaumedium (UpA), Verdünnermedium (Up1) oder ohne Zusatz nach 0, 10, 30 und 60 Minuten Inkubationszeit, angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD). Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

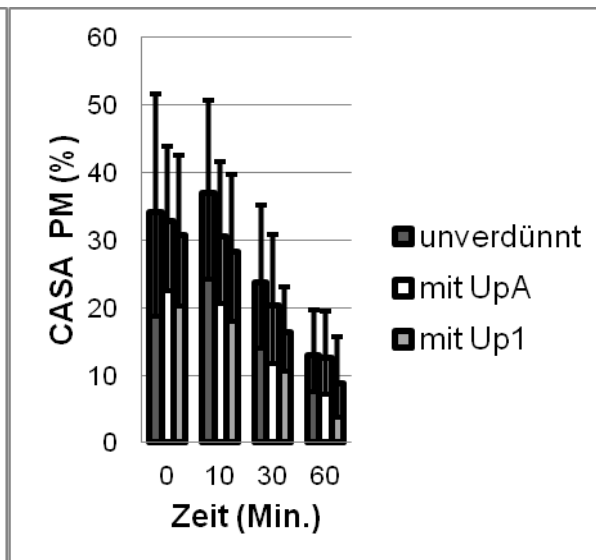


Abb. 14: Im CASA ermittelte Progressivmotilität (PM, %) der aufgetauten Uppsala-Verdünnerproben mit Auftaumedium (UpA), Verdünnermedium (Up1) oder ohne Zusatz nach 0, 10, 30 und 60 Minuten Inkubationszeit, angegeben als modifizierter ein S-Bereich nach Arcus-Sinus Transformation und jeweiliger Standardabweichung (SD). Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

Im Gegensatz zur normalen Up-Verdünnung kam es bei Up1 Zusatz nach 10-minütiger Inkubation nicht zu einem Motilitätsanstieg, sondern zu einer abnehmenden GM und PM. Die weiteren Ergebnisse bezüglich GM und PM nach weiterem Zusatz von Uppsala-1 Medium (Up1) sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tab. 18: Geschätzte und mittels SpermVision® ermittelte Gesamt- (GM) und Progressivmotilität (PM) der aufgetauten Up-Verdünnernproben mit Zusatz von Verdünnermedium 1 (Up1), für GM (geschätzt, CASA) und PM (geschätzt) angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und für PM (CASA) als modifizierter ein S-Bereich nach Arcus-Sinus Transformation. Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

Untersuchungsmethode und Parameter	Zeit (Minuten)	GM ($\bar{x} \pm SD$)	PM ($\bar{x} \pm SD$)
Motilität, geschätzt (%)	0	58,4 ± 8,1%	47,8 ± 14,9 %
	10	56,5 ± 9,3 %	45,2 ± 15,6 %
	30	45,7 ± 12,6 %	28,3 ± 11,4 %
	60	32,1 ± 14,7 %	12,2 ± 7,3 %
Motilität, CASA (%)	0	43,7 ± 10,7 %	30,8 (+ 11,8; - 10,6)
	10	42,2 ± 11,0 %	28,3 (+ 11,5; - 10,3)
	30	30,3 ± 7,1%	16,3 (+ 6,8; - 5,8)
	60	21,4 ± 6,6 %	8,8 (+ 6,9; - 5,1)

4.3.3 Zusammenhang zwischen subjektiver und mittels SpermVision® gemessener Motilität nach dem Auftauen

Auch nach dem Auftauen wurden Korrelationsanalysen zur Darstellung der Straffheit des linearen Zusammenhanges zwischen subjektiv und mittels CASA erfassten Motilitäten (GM, PM) durchgeführt. Bei 12 Korrelationsanalysen hinsichtlich der subjektiven und im SpermVision® ermittelten GM korrelierten im CP-Verdüner 11 signifikant ($p < 0,01 - 0,03$). Im Up-Verdüner hingegen 8 ($p < 0,01 - 0,04$) und im TE-Verdüner 5 ($p < 0,01 - 0,03$) von 12 Korrelationsanalysen (Anhang Kap. 10.4, Tab. A2). Nach Zusatz von Auftaumedium UpA korrelierten alle Up- und ein Großteil der im CP-Verdüner ermittelten Ergebnisse der subjektiv geschätzten und im SpermVision® erfassten GM (Up $n = 12$ von 12, $p < 0,01 - 0,04$; CP $n = 7$ von 12, $p < 0,01 - 0,01$). Im TE-Verdüner zeigten sich auch mit dem Zusatz von UpA nur wenige Zusammenhänge der geschätzten und gemessenen GM (TE $n = 5$ von 12,

$p < 0,01 - 0,05$). Vergleichbar viele signifikante Korrelationen der geschätzten und gemessenen GM zeigten sich in unverdünnten und mit UpA versetzten Proben (unverdünnt und mit UpA je $n = 24$ von 36) (Anhang Kap. 10.4, Tab. A2). Ein Großteil der mit Up1 versetzten Up-Verdünnerproben wies einen signifikanten linearen Zusammenhang der geschätzten und im SpermVision® ermittelten Ergebnisse der GM auf ($n = 9$ von 12, $p < 0,01 - 0,05$) (Anhang Kap. 10.4, Tab. A2). Vor allem die Ergebnisse nach 60-minütiger Inkubationszeit bei unverdünnten und mit UpA sowie Up1 versetzten Proben zeigten nur wenige statistisch signifikante Korrelationen zwischen geschätzter und im CASA gemessener GM.

Bis auf wenige Ausnahmen ($n = 5$ von 84, $p = 0,06 - 0,23$) korrelierten alle geschätzten PM signifikant mit den im SpermVision® ermittelten Werten ($n = 79$ von 84, $p < 0,01 - 0,02$). Alle CP-Verdünner-enthaltenden Proben zeigten eine Abhängigkeit der subjektiv geschätzten und der mittels SpermVision® festgestellten PM ($n = 24$ von 24, $p < 0,01 - 0,02$) (Anhang Kap. 10.4, Tab. A4).

Im Gegensatz zur GM wurden nur geringe Zusammenhänge zwischen den im CASA gemessenen und geschätzten PM von UpA ($n = 3$ von 36, $p = 0,07 - 0,23$) und Up1 ($n = 1$ von 12, $p = 0,06$) verdünnten Proben in einer Korrelationsanalyse nachgewiesen (Anhang Kap. 10.4, Tab. A4). Zur größten Divergenz zwischen subjektiver und CASA Motilität kam es auch bei der PM v.a. nach 60 Minuten Inkubationszeit ($n = 4$ von 21, $p = 0,06 - 0,23$).

Bei den meisten Proben waren trotz signifikanter Korrelationen zwischen subjektiver und CASA Motilität deutliche Methoden- bzw. Mittelwertunterschiede bei der Bewertung der GM und PM im t-Test nachweisbar. Mit wenigen Ausnahmen (v.a. TE-Verdünner mit und ohne Auftaumedium) wurde mittels subjektiver Schätzung ein höherer Wert verglichen mit der CASA Motilität ermittelt (Anhang Kap. 10.4, Tab. A3, A5). Auch die Mittelwertunterschiede der subjektiv erhobenen und mittels CASA erfassten Progressivmotilität als modifizierter ein S-Bereich nach einer Arcus-Sinus Transformation waren signifikant ($p < 0,01$).

4.3.4 Zusammenhang zwischen subjektiver und mittels SpermVision® gemessener Motilität nach Pseudoreplikation

In einer Pseudoreplikation bezüglich der im CASA ermittelten und subjektiven GM unverdünnter Proben korrelierten - mit Ausnahme des TE-Verdünner nach 30- sowie 60- minütiger Inkubation - alle Wertepaare nach dem Auftauen signifikant ($p \leq 0,01$) (Anhang Kap. 10.4, Tab. A6). Nach Zusatz von Auftaumedium UpA zum Verdünner zeigte sich - außer im CP-Verdünner nach 60-minütiger ($p = 0,07$) Inkubation - ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang der geschätzten und im CASA ermittelten GM in der Korrelationsanalyse ($p < 0,01 - 0,01$).

Bezüglich der PM wurden in allen Verdünnerproben nach dem Auftauen signifikante Korrelationen zwischen beiden Untersuchungsmethoden beobachtet ($p < 0,01$) (Anhang Kap. 10.4, Tab. A6).

Im t-Test wurden auch hier mit wenigen Ausnahmen signifikante Methoden- bzw. Mittelwertunterschiede festgestellt (Anhang Kap. 10.4, Tab. A7).

4.3.5 Zusätzliche Motilitätsparameter des SpermVision®

4.3.5.1 Unbehandelte Proben

Bei den mittels SpermVision® erfassten Motilitätsparametern zeigten sich außer bei DSL ($p = 0,15$) und BCF ($p = 0,27$) statistisch signifikante Unterschiede zwischen den drei Verdünnern ($p < 0,01 - \leq 0,04$). Der Messzeitpunkt nach dem Auftauen hatte außer bei ALH ($p = 0,06$) einen deutlichen Einfluss auf die Motilitätsparameter ($p < 0,01 - \leq 0,03$).

Mit Ausnahme von STR ($p = 0,13$) konnte eine Wechselwirkung zwischen den verwendeten Verdünnern und dem Untersuchungszeitpunkt nach dem Auftauen statistisch bewiesen werden ($p < 0,01 - \leq 0,04$). Eine Tabelle mit allen Messergebnissen befindet sich im Anhang Kapitel 10.4 (Tab. A1) .

a. Durchschnittliche Distanz

Während der Inkubationsperiode konnte eine Abnahme der durchschnittlich zurückgelegten Distanz / Distance Average Path (DAP) der Spermatozoen festgestellt werden (Anhang Kap. 10.4, Tab. A1). Direkt nach dem Auftauen sowie nach 10 und 30 Minuten zeigte der CP-Verdünner die geringsten Veränderungen verglichen mit den nativ gemessenen Proben. Jedoch wurde nach 60 Minuten

Inkubationszeit beim Up-Verdünner die geringste Abnahme der durchschnittlich zurückgelegten Distanz ermittelt. Zu allen untersuchten Zeitpunkten nach dem Auftauen zeigte der TE-Verdünner die größten Abnahmen von DAP.

b. Kurvilineare Distanz

Beim TE- und Up-Verdünner konnte nach 10-minütiger Inkubationsperiode verglichen mit t_0 ein Anstieg der kurvilinearen Distanz (DCL) beobachtet werden. Der CP-Verdünner zeigte hingegen innerhalb der ersten 30 Minuten nur geringe Veränderungen. Direkt nach dem Auftauen sowie nach 10 und 60 Minuten konnten die geringsten Abnahmen der zurückgelegten kurvilinearen Distanz mit dem Up-Verdünner beobachtet werden. Jedoch zeigten sich nach einer 30-minütigen Inkubationszeit im CP-Verdünner die besten Ergebnisse. Mit dem TE-Verdünner wurden zu allen untersuchten Zeitpunkten nach dem Auftauen die stärksten Abnahmen der kurvilinearen Distanz gemessen. Die stärksten Abnahmen des DCL Wertes wurden direkt nach dem Auftauen und nach 10 Minuten mit dem CP-Verdünner sowie nach 30 und 60 Minuten mit dem TE-Verdünner nachgewiesen.

c. Geradlinige Distanz

Im Laufe der Inkubationsperiode konnte außer beim CP-Verdünner eine stetige Abnahme der geradlinigen Distanz (DSL), beobachtet werden. Direkt nach dem Auftauen sowie nach 10 und 30 Minuten zeigte der CP-Verdünner die geringsten Veränderungen zum Nativsperma. Nach einer 60-minütigen Inkubationszeit wurden jedoch beim Up-Verdünner die besten Ergebnisse erzielt. Die größten Abnahmen wurden direkt nach dem Auftauen und nach 10 Minuten Inkubationszeit beim Up-Verdünner festgestellt. Nach 30 und 60 Minuten zeigte jedoch der TE-Verdünner die größten Veränderungen.

d. Mittlere Geschwindigkeit

Mit fortschreitender Inkubationsdauer wurde beim TE- und Up-Verdünner ein stetiger Rückgang der mittleren Geschwindigkeit (VAP) beobachtet. Beim CP-Verdünner hingegen wurden bessere Werte nach einer 10-minütigen Inkubation festgestellt. Direkt nach dem Auftauen, nach 10 und 30 Minuten wurden die höchsten VAP Werte beim CP-Verdünner beobachtet. Jedoch zeigte der Up-Verdünner nach einer Stunde Inkubationszeit die besten Ergebnisse. Zu allen gemessenen Zeitpunkten nach dem

Auftauen wurden mit dem TE-Verdünner die größten Abnahmen der mittleren Geschwindigkeit festgestellt.

e. Kurvilineare Geschwindigkeit

Im TE- und Up-Verdünner zeigten sich nach 10-minütiger Inkubationszeit die höchsten kurvilinearen Geschwindigkeiten (VCL). Im Gegensatz dazu konnten im CP-Verdünner erst nach 30-minütiger Inkubationszeit die höchsten Geschwindigkeiten erfasst werden. Der Up-Verdünner zeigte nach dem Auftauen, nach 10 sowie 60 Minuten und der CP-Verdünner nach 30 Minuten die höchste kurvilineare Geschwindigkeit. Zu allen untersuchten Zeitpunkten nach dem Auftauen wurden mit dem TE-Verdünner die größten Abnahmen der kurvilinearen Geschwindigkeit beobachtet.

f. Lineare Geschwindigkeit

Eine stetige Abnahme der linearen Geschwindigkeit (VSL) wurde innerhalb der Inkubationszeit beim TE- und Up-Verdünner beobachtet. Im CP-Verdünner zeigten sich hingegen nach 10 Minuten Inkubationszeit höhere VSL Werte als direkt nach dem Auftauen. Direkt nach dem Auftauen und nach 10-minütiger Inkubationszeit lag die durchschnittliche lineare Geschwindigkeit des CP-Verdünners oberhalb der gemessenen Nativproben. Ebenfalls wurden mit dem CP-Verdünner direkt nach dem Auftauen sowie nach 10 und 30 Minuten die höchsten Ergebnisse erzielt. Nach 60-minütiger Inkubationszeit war im Up-Verdünner die beste lineare Geschwindigkeit zu verzeichnen. Die größten Veränderungen im Vergleich zum Nativsperma wurden direkt nach dem Auftauen und nach 10-minütiger Inkubationszeit beim Up-Verdünner beobachtet. Nach 30 und 60 Minuten zeigte jedoch der TE-Verdünner die größten Geschwindigkeitsabnahmen.

g. Geradlinigkeit

Beobachtet wurden nur minimale Veränderungen der Geradlinigkeit (STR) während der Inkubationsperiode und zwischen den drei Verdünnern.

h. Linearität

Mit Ausnahme eines leichten Anstiegs der Linearität (LIN) nach 60 Minuten konnten im TE-Verdünner kaum Veränderungen beobachtet werden. Der Up-Verdünner zeigte keine Veränderungen während der Inkubationsperiode. Nach 10-minütiger

Inkubationszeit wurde im CP-Verdünner ein Anstieg der Linearität beobachtet. Die Werte aller drei Verdünner lagen knapp oberhalb der in den Nativproben gemessenen Werte.

i. Wobble

Die Auslenkung der kurvilinearen Bewegung (WOB) an der durchschnittlichen Bewegung lag bis auf zwei Ausnahmen bei $0,1 \pm \leq 0,1$ und somit über den Werten, die in den unverdünnten Proben gemessen wurden. Nach 30-minütiger Inkubationszeit zeigten sich im CP-Verdünner niedrigere Ergebnisse als direkt nach dem Auftauen, diese lagen jedoch nach 60 Minuten bereits wieder auf Ausgangsniveau. Im TE-Verdünner konnte nach 60 Minuten ein Anstieg von WOB beobachtet werden.

j. Frequenz der Kopfbewegung

Für die Frequenz der Kopfbewegung (BCF) konnte ein stetiger Abfall mit Ausnahme des CP-Verdünners nach 10-minütiger Inkubationszeit beobachtet werden. Diese lagen beim TE- und CP-Verdünner direkt nach dem Auftauen sowie nach 10 Minuten Inkubationszeit oberhalb der Nativwerte. Die Frequenz der Kopfbewegung war direkt nach dem Auftauen sowie nach 10 Minuten beim TE-Verdünner am höchsten. Eine Messung nach 30 Minuten zeigte im CP-Verdünner die höchsten durchschnittlichen Werte. Nach 60 Minuten waren jedoch beim Up-Verdünner die höchsten BCF Werte zu beobachten. Am niedrigsten war die Frequenz der Kopfbewegung direkt nach dem Auftauen und nach 10 Minuten beim Up-Verdünner sowie nach 30 und 60 Minuten im TE-Verdünner.

k. Durchschnittliche Ausrichtungs-/Orientierungsänderung des Spermienkopfes

Im Gegensatz zu den Up- und CP-Proben war im TE-Verdünner eine tendenzielle Zunahme der Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung (ALH) der Spermien während der Inkubationszeit zu beobachten. Betrachtete man alle untersuchten Zeitpunkte nach dem Auftauen, so konnten im Up-Verdünner immer die geringsten und im TE-Verdünner die größten Veränderungen der Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung im Vergleich zu den Nativwerten der Spermien nachgewiesen werden.

4.3.5.2 Nach Zusatz von Auftaumedium

Eine signifikante Beeinflussung der GM und PM nach UpA Zugabe konnte nicht nachgewiesen werden. Die Unterschiede der mit Auftaumedium versetzten Verdüner waren nur zwischen TE und CP signifikant ($p < 0,01$). Durch die Verwendung von UpA veränderten sich jedoch alle Motilitätsparameter ($p < 0,01 - 0,05$), außer ALH ($p = 0,10$), statistisch signifikant. Des Weiteren wurde eine signifikante Wechselwirkung zwischen dem Verdünner und der Verwendung von UpA, außer für BCF ($p = 0,08$), nachgewiesen ($p < 0,01 - 0,02$).

Nach Zusatz von UpA zum TE-, Up- und CP-Verdünner konnten mit wenigen Ausnahmen (CP: t_0 DAP und t_0, t_{10} DSL; TE: t_{60} DSL) zu allen Untersuchungszeitpunkten nach dem Auftauen höhere DAP-, DCL- und DSL-Werte ermittelt werden. Bezüglich der Streckenparameter (DAP, DSL, DCL) zeigte der Up-Verdünner mit wenigen Ausnahmen zu allen untersuchten Zeitpunkten nach dem Auftauen die höchsten Messwerte. Nur direkt nach dem Auftauen wurden im TE-Verdünner höhere DAP- und DSL-Werte sowie im CP-Verdünner nach 30-minütiger Inkubationszeit höhere DCL-Werte beobachtet.

Die im CP-Verdünner ermittelten DAP-Werte und im TE- sowie Up-Verdünner ermittelten DSL-Werte lagen direkt nach dem Auftauen oberhalb der nativ ermittelten Ergebnisse. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten zeigten sich im TE-, Up- und CP-Verdünner ebenfalls höhere DSL-Werte im Vergleich zu den nativ ermittelten Ergebnissen.

Eine Verbesserung der Geschwindigkeitsparameter VAP, VSL und VCL konnte ebenfalls in fast allen untersuchten Proben nach dem Zusatz von UpA beobachtet werden. Keine Verbesserung ließ sich beim TE-Verdünner bei VCL zum Zeitpunkt t_0 und bei VSL zum Zeitpunkt t_{60} feststellen. Im CP-Verdünner waren direkt nach dem Auftauen und nach einer 10-minütigen Inkubationszeit keine Verbesserungen von VAP und VSL feststellbar. Auch hier konnten außer bei VSL im TE-Verdünner direkt nach dem Auftauen zu allen untersuchten Zeitpunkten nach dem Auftauen die höchsten Geschwindigkeitsparameter im Up-Verdünner ermittelt werden. Die direkt nach dem Auftauen und nach 10 Minuten ermittelten VSL-Werte des TE- sowie CP-Verdüners lagen oberhalb der Nativproben. Gleichfalls zeigte der VAP-Wert nach 10-minütiger Inkubationszeit im Up-Verdünner verglichen mit den Nativproben höhere Werte.

Im CP- und Up-Verdünner wurden keine deutlichen Unterschiede in der Linearität im Vergleich zu den unverdünnten Proben festgestellt. Der Zusatz von UpA führte jedoch beim TE-Verdünner zu einer minimalen Abnahme der LIN an allen nach dem Auftauen untersuchten Zeitpunkten.

Eine Erhöhung der BCF Werte konnte nach UpA Zusatz in allen Verdünnerproben außer zu den Zeitpunkten t0 und t10 im TE-Verdünner beobachtet werden. Die höchsten Werte wurden zum Zeitpunkt t0, t10 im TE-Verdünner, zum Zeitpunkt t30 im CP- und zum Zeitpunkt t60 im Up-Verdünner ermittelt. Die Unterschiede zwischen den Verdünnern konnten jedoch statistisch nicht belegt werden. Nur direkt nach dem Auftauen und nach 10-minütiger Inkubationszeit wurden im TE- sowie CP-Verdünner höhere BCF Werte als in den Nativproben nachgewiesen.

Eine statistisch nicht signifikante Zunahme der ALH konnte außer im CP-Verdünner direkt nach dem Auftauen und im TE- sowie CP-Verdünner nach 60-minütiger Inkubationszeit für alle mit UpA versetzten Proben verifiziert werden. Zu allen untersuchten Zeitpunkten nach dem Auftauen waren im Up-Verdünner die höchsten ALH-Werte zu beobachten. Diese lagen zum Zeitpunkt t10 und t30 oberhalb der nativ ermittelten Proben.

Die Parameter STR und WOB zeigten mit dem Zusatz von UpA trotz statistisch signifikanter Unterschiede keine deutlichen Veränderungen zu unverdünnten Proben und zwischen den einzelnen Verdünnern.

Die entsprechenden Messwerte sind der Tabelle A1 im Anhang (Kap. 10.4) zu entnehmen.

4.3.5.3 Nach Zusatz von Verdünnermedium 1

Die verschiedenen Up-Verdünnerproben mit und ohne UpA sowie Up1 zeigten, außer bei den Parametern STR ($p = 0,12$) und WOB ($p = 0,72$), signifikante Unterschiede bezüglich der Motilitätsparameter ($p \leq 0,01$). Deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten der Up-Verdünnerproben konnten nur bei den Strecken- (DAP, DCL, DSL) und Geschwindigkeitsparametern (VAP, VCL, VSL) statistisch belegt werden (alle $p < 0,01$). Jedoch wurde eine signifikante Wechselwirkung zwischen der Verwendung eines Auftaumediums (UpA, Up1 oder unverdünnte Proben) und dem Messzeitpunkt nur für DCL ($p = 0,05$) und BCF ($p < 0,01$) bewiesen. Der Zusatz von Up1 führte innerhalb der Inkubationsperiode und zwischen den Verdünnern zu keiner wesentlichen Veränderung der untersuchten Parameter.

Nach Up1 Zusatz in Up-Verdünnerproben waren zu allen Zeitpunkten nach dem Auftauen die geringsten Amplituden der seitlichen Kopfauslenkung (ALH) der Spermien messbar.

4.3.6 Viabilität

Es wurde eine signifikante Abnahme der durchschnittlich gemessenen Viabilität durch die Verdünnerzugabe und den Kryokonservierungsprozess nachgewiesen ($p < 0,01$). Die Unterschiede zwischen den drei Verdünnern waren in einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse statistisch signifikant ($p < 0,01$, Abb. 15).

Im Up-Verdünner zeigten sich die geringsten Viabilitätsverluste (t_0 : $-44,5 \pm 9,4$ %, t_{10} : $-56,2 \pm 9,8$ %, t_{30} : $-62,2 \pm 10,9$ %, t_{60} : $-65,3 \pm 10,3$ %). Die größten Viabilitätsverluste waren zu den Zeitpunkten t_0 , t_{10} und t_{60} im TE-Verdünner zu beobachten (t_0 : $-53,6 \pm 12,7$ %, t_{10} : $-60,7 \pm 15,2$ %, t_{60} : $-68,6 \pm 9,2$ %), während nach 30-minütiger Inkubationszeit sich jedoch im CP-Verdünner (t_{30} : $-67,3 \pm 13,9$ %) die deutlichsten Viabilitätsverluste (t_{30} : $-65,8 \pm 13,8$ %) zeigten. Zu allen übrigen Messzeitpunkten lag die Viabilität des CP-Verdünners im Mittelfeld (t_0 : $-48,8 \pm 10,6$ %, t_{10} : $-58,4 \pm 12,6$ %, t_{60} : $-68,8 \pm 12,9$ %).

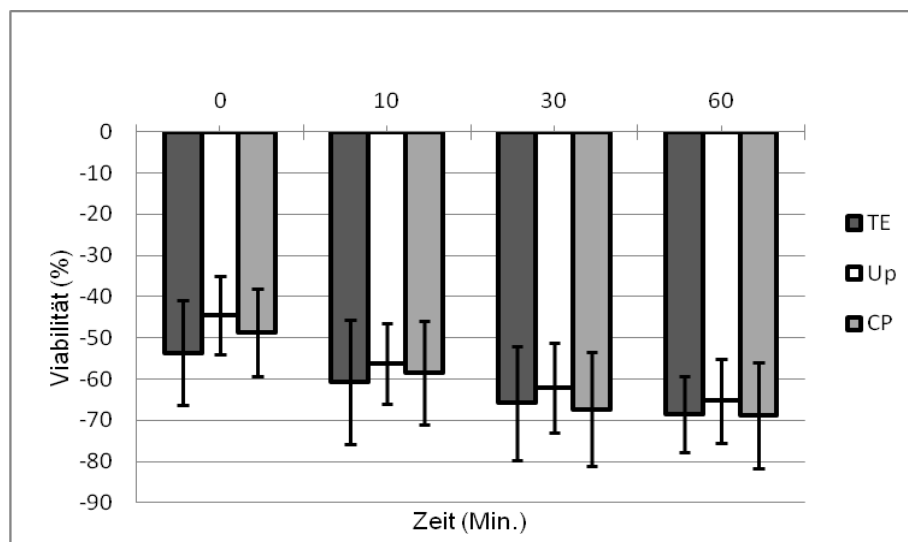


Abb. 15: Durchschnittliche Abnahme der im SpermVision® ermittelten Viabilität (%) der aufgetauten Proben nach 0, 10, 30 und 60 Minuten Inkubationszeit im Vergleich zum Nativsperma, angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD). Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

Die Viabilitätsuntersuchungen wurden ebenfalls an den einzelnen Verdünnerproben nach Zugabe von UpA durchgeführt (Abb. 16). Es zeigten sich signifikante Unterschiede ($p = 0,01$) in einer mehrfaktoriellen Varianzanalyse zwischen den Proben mit und ohne UpA Zusatz. Durch die Verwendung von UpA verbesserte sich der Anteil an vitalen Spermienzellen im Up- und CP-Verdünner zu allen gemessenen Zeitpunkten. Im TE-Verdünner konnte nur direkt nach dem Auftauen eine Verbesserung der Viabilität erzielt werden.

Mit zunehmender Inkubationsdauer kam es zu einer signifikanten Abnahme an vitalen Spermien bei allen Verdünnerkombinationen ($p < 0,01$). Die geringsten Viabilitätsabnahmen zeigte der Up-Verdünner in Kombination mit dem Zusatz von UpA (t_0 : $-40,8 \pm 8,7$ %, t_{10} : $-51,8 \pm 9,0$ %, t_{30} : $-58,3 \pm 10,7$ %, t_{60} : $-59,2 \pm 10,8$ %). Im TE-Verdünner waren die größten Viabilitätsabnahmen im Vergleich zu den nativ untersuchten Proben nachweisbar (t_0 : $-52,7 \pm 13,9$ %, t_{10} : $-62,6 \pm 11,9$ %, t_{30} : $-66,2 \pm 11,4$ %, t_{60} : $-69,5 \pm 9,9$ %), der CP-Verdünner lag hingegen im mittleren Wertebereich (t_0 : $-45,1 \pm 10,5$ %, t_{10} : $-52,4 \pm 11,3$ %, t_{30} : $-63,2 \pm 13,7$ %, t_{60} : $-66,9 \pm 12,7$ %). Bei den hier beschriebenen Messwert-Unterschieden zeigte sich eine Abhängigkeit vom verwendeten Verdünner, der Verwendung eines Auftaumediums und dem Untersuchungszeitpunkt nach dem Auftauen ($p < 0,01$).

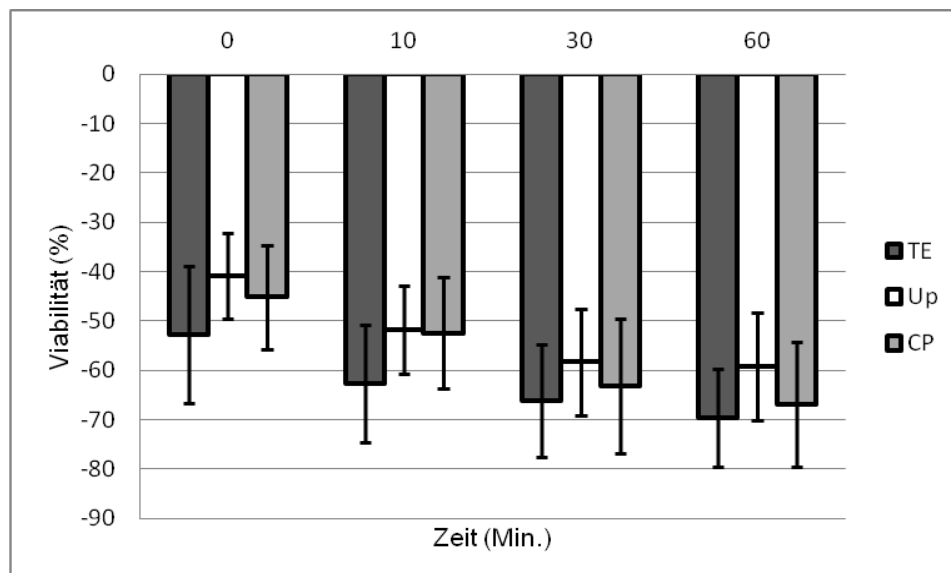


Abb. 16: Durchschnittliche Abnahme der im SpermVision® ermittelten Viabilität (%) der aufgetauten Proben nach Zusatz von Auftaumedium (UpA) nach 0, 10, 30 und 60 Minuten Inkubationszeit im Vergleich zum Nativsperma, angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD). Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

4.3.7 Lebend-Tot-Anteil und Pathomorphologie

Die prozentualen Anteile lebender und morphologisch veränderter Spermien, die sich aus der Differenz der Proben nach der Kryokonservierung verglichen mit den Ergebnissen der Nativejakulate am Eosin-Ausstrich ergaben, sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 19) dargestellt.

Tab. 19: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse des EosinG-Ausstriches, angegeben als Messwertdifferenz der Tiefgefrier-Spermaproben zu den nativ untersuchten Proben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD). Angaben bezüglich der Signifikanz sind dem Text zu entnehmen.

Differenz (Aufgetaute - nativ Probe)	TE- Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	Up- Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	CP- Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	Veränderungen vor + nach TG (p-Wert)	Verdünner- unterschiede (p-Wert)
Anteil lebender Spermien (%)	-47,5 ± 14,3	-18,0 ± 6,2	-28,2 ± 7,4	p < 0,01	p < 0,01
Pathomorphologie (%)	7,7 ± 4,3	5,5 ± 4,6	2,4 ± 3,6	p < 0,01	p < 0,01
Kopf- und Kappenveränderungen (%)	-0,1 ± 0,4	0,02 ± 0,4	0,1 ± 0,3	p = 0,95	p = 0,14
Schwanzveränderungen (%)	6,5 ± 3,7	2,6 ± 2,5	0,4 ± 1,9	p < 0,01	p < 0,01
lose Köpfe (%)	1,0 ± 2,9	2,0 ± 3,2	1,6 ± 1,8	p = 0,09	p = 0,17
Anteil der Plasmotropfen (%)	0,3 ± 2,5	0,8 ± 4,1	0,2 ± 2,4	p = 0,67	p = 0,36

Es konnte eine signifikante Abnahme des Anteils lebender Spermien nachgewiesen werden (p < 0,01). Vergleicht man die Ergebnisse der einzelnen Verdünner, so zeigten sich bezüglich des Anteils lebenden Spermien die besten Ergebnisse beim Up-, gefolgt vom CP- und TE-Verdünner. Die Unterschiede zwischen den Verdünnern waren in einer einfaktoriellen Varianzanalyse statistisch signifikant (p < 0,01).

Nach dem Auftauen wurde eine deutliche Zunahme des Anteils morphologischer Veränderungen (p < 0,01) nachgewiesen. Diese waren beim CP-Verdünner am geringsten und beim TE-Verdünner am größten. Auch hier waren die Unterschiede zwischen den drei getesteten Verdünnern statistisch signifikant (p < 0,01). Bei Betrachtung einzelner morphologischer Veränderungen zeigten sich bei den Geißelveränderungen signifikante Unterschiede zu den Nativejakulaten (p < 0,01) und zwischen den einzelnen Verdünnern (p < 0,01). Vor allem der TE-Verdünner zeigte hier erhebliche Zunahmen. Die geringsten Veränderungen waren diesbezüglich mit dem CP-Verdünner zu beobachten. Die Anteile an losen Köpfen, Plasmotropfen sowie Kopf- und Kappenveränderungen zeigten keine statistisch

gesicherten Unterschiede beim Vergleich der nativen und kryokonservierten Proben sowie zwischen den einzelnen Verdünnern.

Mit der Spermac®-Färbung wurde eine signifikante Zunahme des Anteils an nicht mehr vorhandenen Akrosomen nach dem Tiefgefrieren festgestellt ($p < 0,01$). Tendenziell wurden mit dem CP-Verdünner die wenigsten und mit dem Up-Verdünner die meisten Kappenverluste beobachtet (TE $5,7 \pm 1,7$ %, Up $6,8 \pm 1,7$ %, CP $5,1 \pm 4,0$ %). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Verdünnern ließen sich jedoch statistisch nicht belegen ($p = 0,34$).

4.3.8 Korrelation des Anteile lebender Spermien im EosinG Ausstrich und der mittels SpermVision® ermittelte Viabilität nach dem Auftauen

Die direkt nach dem Auftauen ermittelte Viabilität und im EosinG Ausstrich ausgezählten Anteile lebender Spermien korrelierten im TE- und Up-Verdünner signifikant miteinander ($p < 0,01$). Die Ergebnisse des CP-Verdünners zeigten nur in der Pseudoreplikation eine statisch nachweisbare Abhängigkeit ($n = 10$: $p = 0,14$, $n = 30$: $p = 0,04$).

Der Anteil lebender Spermien lag durchschnittlich beim TE $7,9 \pm 7,2$ %, Up $28,3 \pm 6,0$ % und CP $22,4 \pm 7,2$ % über der vom CASA ermittelten Viabilität. Die Unterschiede beider Methoden waren im t-Test bei allen drei Verdünnern signifikant (jeweils $p < 0,01$). In der Pseudoreplikation wurden ebenfalls signifikante Methodenunterschiede bei allen drei Verdünnern festgestellt (jeweils $p < 0,01$).

4.4 Sonderfall: Blutbeimengungen in allen Spermaproben

4.4.1 Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate

Die Ergebnisse eines Rüden werden aufgrund von der Norm abweichenden Ejakulatbefunden, insbesondere den Blutbeimengungen, gesondert dargestellt. Eine vergleichende Übersicht zu den übrigen untersuchten Nativproben befindet sich in der Tabelle 23 am Ende dieses Abschnittes. Die Ejakulate fielen durch eine rötliche bis rote Farbe auf (Abb. 17), hatten einen tierartspezifischen Geruch und eine molkige ($n = 2$) bzw. wässrige Konsistenz ($n = 1$).

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Nativejakulate waren alle Ejakulate aufgrund von mittel- bis hochgradigen Erythrozytenbeimengungen auffällig. Der Rüde zeigte ebenfalls geringere Anteile lebender Spermien, an zwei Terminen eine

verringerte subjektive PM sowie zu einem Termin einen erhöhten Anteil pathomorphologisch veränderter Samenzellen und einen erhöhten Anteil akrosomaler Veränderungen (Tab. 20).

Die verschiedenen Motilitätsparameter und die Viabilität der SpermVision®-Untersuchung zeigten außer für VCL vergleichbare Mittelwerte zu den übrigen Nativejakulaten (Tab. 20). Die VCL-Werte des Sonderfalls lagen höher ($131,0 \pm 20,5 \mu\text{m}/\text{Sek.}$; Min. $102,5 \mu\text{m}/\text{Sek.}$, Max. $150,2 \mu\text{m}/\text{Sek.}$) als die im Durchschnitt bei allen anderen Proben gemessenen Werte ($123,3 \pm 13,0 \mu\text{m}/\text{Sek.}$; Min. $93,8 \mu\text{m}/\text{Sek.}$, Max. $143,3 \mu\text{m}/\text{Sek.}$).

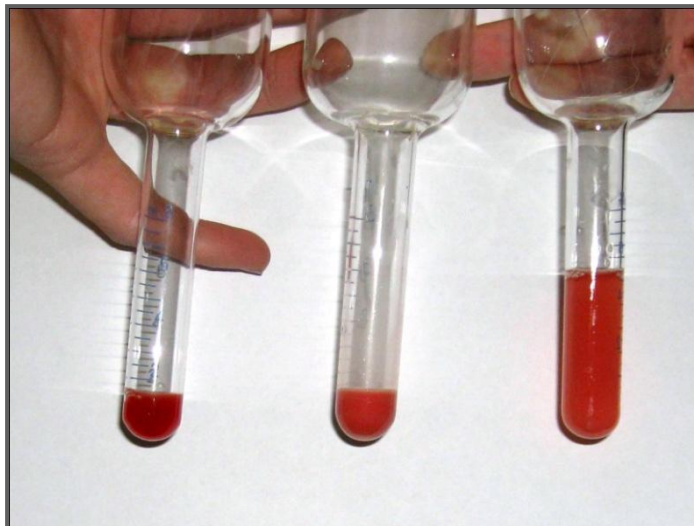


Abb.17: Vorsekret (links), spermienreiche Fraktion (Mitte) und Prostatasekret (rechts) mit Blutbeimengungen in allen Fraktionen

Tab. 20: Gegenüberstellung der Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate des Sonderfalls (ein Tier; drei Ejakulate) und der übrigen Proben (zehn Tiere; je drei Ejakulate) angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD) sowie Minimum (Min.) und Maximum (Max.) der ermittelten Werte

Parameter	Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate (n = 30) ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.)	Untersuchungsergebnisse der Nativejakulate des Sonderfalles (n = 3) ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max.)
Ergebnisse der subjektiven Untersuchung		
Volumen (ml)	3,6 \pm 0,2 (Min. 2,2 /Max. 6)	3,9 \pm 0,1 (min 3,8, Max. 4)
pH-Wert	6,5 \pm 0,2 (Min. 6,3, Max. 6,7)	6,3 \pm 0,1 (min 6,2, Max. 6,4)
Dichte (SpermaCue) (Mio./ml)	265,7 \pm 68,9	173,7 \pm 11,3 Mio./ ml
Gesamtspermienzahl (Mio. pro Ejakulat)	894,8 \pm 150,3 (Min. 484,2, Max. 1199,5)	672,2 \pm 55,7 (Min. 600,4, Max. 736)
geschätzte Progressivmotilität (%)	80 \pm 4,8 (Min. 73,3, Max. 88,3)	71,7 \pm 2,4 (Min. 70, Max. 75)
Pathomorphologie (%)	11,7 \pm 4,6 (Min. 4,7, Max. 19,3)	14 \pm 7,5 (Min. 6, Max. 24)
lebende Spermien (%)	87,7 \pm 2,8 (Min. 83,8, Max. 92,3)	76,3 \pm 6,7 (Min. 67, Max. 82)
Hypoosmotischer- Schwelltest (%)	4,7 \pm 0,1 (Min. 2,3, Max. 9,3)	7 \pm 4,2 (Min. 4, Max. 13)
Spermac® (%)	1,5 \pm 0,9 (Min. 0,7, Max. 3,2)	10,5 \pm 10,5 (Min. 0, Max. 21)
Ergebnisse der SpermVision® Untersuchungen		
Gesamtmotilität (%)	78,2 \pm 7,9 (Min. 62,1, Max. 88,3)	77,3 \pm 5,2 (Min. 73,0, Max. 84,6)
Progressivmotilität (%)	70,3 \pm 8,4 (Min. 54,5, Max. 81,1)	65,9 \pm 5,6 (Min. 60,4, Max. 73,6)
DCL (µm)	54,0 \pm 5,3 (Min. 42,4, Max. 61,8)	56,9 \pm 7,8 (Min. 59,2, Max. 65,1)
DSL (µm)	20,5 \pm 2,4 (Min. 16,5, Max. 25,0)	19,3 \pm 2,9 (Min. 15,4, Max. 22,1)
DAP (µm)	28,0 \pm 2,8 (Min. 24,1, Max. 33,3)	27,9 \pm 3,5 (Min. 23,2, Max.31,4)
VAP (µm/Sek.)	64,3 \pm 7,1 (Min. 54, Max. 76,3)	64,5 \pm 9,3 (Min. 51,4 Max. 72,6)
VCL (µm/Sek.)	123,3 \pm 13,0 (Min. 93,8, Max. 143,3)	131,0 \pm 20,5 (Min. 102,5, Max.150,2)
VSL (µm/Sek.)	47,1 \pm 5,7. (Min. 37,1, Max. 57,8)	44,6 \pm 7,6 (Min. 34,1 , Max. 51,3)
STR	0,7 \pm < 0,1 (Min. 0,7, Max. 0,8)	0,7 \pm 0,02 (Min.0,7, Max. 0,7)
LIN	0,4 \pm < 0,1 (Min. 0,3, Max. 0,5)	0,3 \pm 0,01 (Min. 0,3, Max. 0,3)
WOB	0,5 \pm < 0,1 (Min. 0,5 , Max. 0,6)	0,5 \pm 0,01 (Min. 0,5, Max. 0,5)
ALH (µm)	5,2 \pm 0,9 (Min. 3,6, Max. 6,6)	5,6 \pm 1,2 (Min. 4,0, Max. 6,5)
BCF (Hz)	23,9 \pm 1,6 (Min. 21,7, Max. 26,2)	22,6 \pm 1,0 (Min.21,6, Max. 24,0)
Viabilität (%)	85,9 \pm 5,7 (Min. 75,7, Max. 96,0)	82,0 \pm 11,4 (Min. 67,0, Max. 94,5)

Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis

4.4.2 Untersuchungsergebnisse der verdünnten Proben nach vollständiger Aufarbeitung

Während sich bei allen Proben vor der Tiefgefrierung bezüglich der CASA GM und PM im CP-Verdünner die geringsten Veränderungen zu den untersuchten Nativproben zeigten, wurden bei dem beschriebenen Sonderfall im Up-Verdünner die geringsten Motilitätsunterschiede festgestellt (Abb. 18, Tab. 21). Die größten durchschnittlichen Motilitätsverluste der GM und PM wurden, wie auch bei den übrigen Proben mit dem TE-Verdünner beobachtet.

Bei den Strecken- (DAP, DCL, DSL) und Geschwindigkeitsparametern (VSL, VCL, VAP) konnten, wie bereits bei den anderen Proben, im CP-Verdünner die höchsten Werte gemessen werden. Diese Werte lagen interessanterweise alle oberhalb der nativ gemessenen Ergebnisse. Für DCL wurden im Up-Verdünner und für die übrigen Strecken- und Geschwindigkeitsparameter im TE-Verdünner die größten Abnahmen nachgewiesen. Beobachtet wurde ebenfalls ein Anstieg der BCF-Werte bei allen drei Verdünnern. Im Gegensatz zu allen anderen Proben waren diese jedoch im CP-Verdünner am größten, wogegen der TE-Verdünner die geringsten Veränderungen zeigte. Verglichen mit den Ergebnissen der Nativejakulate zeigte die Amplitude der lateralen Kopfauslenkung (ALH) im Up-Verdünner die geringsten und im TE-Verdünner die stärksten Veränderungen. Bei den Parametern STR, LIN und WOB zeigten sich auch hier wie bereits bei allen anderen Proben beobachtet nur sehr geringe Veränderungen zu den nativ gemessenen Werten bzw. zwischen den drei Verdünnern.

Tab. 21: Durchschnittliche Abnahme der im SpermVision® ermittelten Motilität nach vollständiger Verdünnung der Aliquots im Vergleich zum Nativsperma, angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD)

Parameter	TE- Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	Differenz verdünnt- nativ	Up- Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	Differenz verdünnt- nativ	CP- Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	Differenz verdünnt- nativ
GM (%)	41,0 ± 0,6	-36,3	66,3 ± 6,4	-11	61,5 ± 12,5	-15,8
PM (%)	24,3 ± 8,1	-41,6	45,0 ± 15,3	-20,9	44,7 ± 19,2	-21,2
DAP (µm)	22,1 ± 2,5	-5,7	24,7 ± 3,8	-3,2	34,2 ± 4,3	6,4
DCL (µm)	40,7 ± 2,9	-16,2	39,7 ± 7,1	-17,2	62,7 ± 6,8	5,8
DSL (µm)	17,7 ± 3,3	-1,6	19,9 ± 3,8	0,7	29,2 ± 4,9	10
VAP (µm/Sek.)	47,7 ± 5,6	-16,7	58,2 ± 8,8	-6,2	76,5 ± 10	12
VCL (µm/Sek.)	87,5 ± 6,5	-43,5	93,4 ± 16,3	-37,6	139,5 ± 15,1	8,5
VSL (µm/Sek.)	38,1 ± 7,2	-6,5	46,9 ± 8,8	2,3	65,2 ± 11,4	20,6
ALH (µm)	3,1 ± 0,1	-2,5	4,5 ± 0,8	-1,1	4,3 ± 0,2	-1,3
STR	0,8 ± 0,1	0,1	0,8 ± 0,1	0,1	0,8 ± 0,0	0,2
LIN	0,4 ± 0,1	0,1	0,5 ± 0,1	0,2	0,5 ± 0,0	0,1
WOB	0,5 ± 0,0	0,1	0,6 ± 0,0	0,1	0,5 ± 0,0	0,1
BCF (Herz)	22,7 ± 2,5	0,1	23,3 ± 1,4	0,7	25,6 ± 2,2	3

Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis

4.4.3 Untersuchungsergebnisse der aufgetauten Verdünnerproben

4.4.3.1 Einfriereffekt

Vor und nach dem Kryokonservierungsprozess war im Up-Verdünner die höchste GM (GM vor TG: TE 41,0 ± 25,7 %, Up 66,3 ± 22,8 %, CP 61,5 ± 21,5 %, GM nach TG: TE 25,3 ± 7,3 %, Up 45 ± 5,2 %, CP 24,7 ± 9,5 %) und PM (PM vor TG: TE 24,3 ± 25,2 %, Up 45,0 ± 21,2 %, CP 44,7 ± 19,8 %) nachzuweisen. Die geringsten Verluste durch Tiefgefrierung konnten für die GM im TE-Verdünner (-15,7 %) und für die PM (-15,4 %) im Up-Verdünner festgestellt werden. Die größten Motilitätsabnahmen bezüglich der GM und PM zeigten sich im CP-Verdünner (GM - 36,8 %, PM -33,6 %).

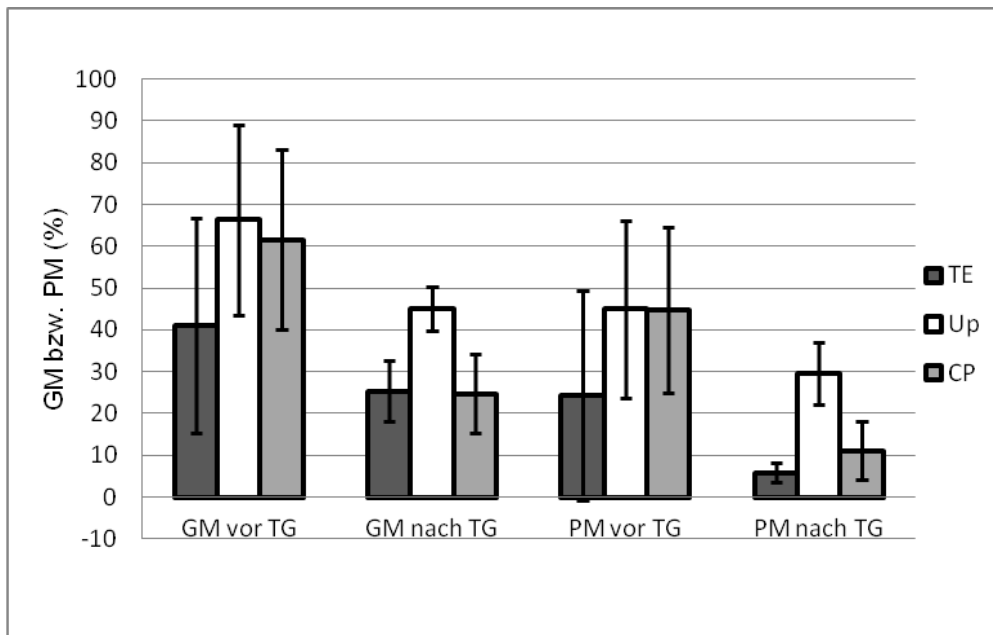


Abb. 18: Im CASA ermittelten Gesamt- (GM, %) und Progressivmotilität (PM, %) der vollständig aufgearbeiteten Proben vor und nach Tiefgefrierung (TG), angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD)

4.4.3.2 Motilität un behandelter Verdünnerproben

Auch bei dem vorliegenden Sonderfall konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten nach dem Auftauen die höchste geschätzte und auch im CASA gemessene GM und PM beim Up-Verdünner ermittelt werden (Tab. 22). Dabei lag hier die geschätzte PM direkt nach dem Auftauen im CP-Verdünner auf gleich hohem Niveau wie beim Up-Verdünner. Auch hier konnten mit einer Ausnahme die niedrigsten Motilitäten im TE-Verdünner festgestellt werden. Nur direkt nach dem Auftauen wurde bezüglich der GM mit dem SpermVision®-System eine geringere durchschnittliche GM im CP-Verdünner ermittelt. Wie bereits bei den anderen Proben festgestellt, konnte auch hier nach 10-minütiger Inkubationszeit ein Anstieg der subjektiven GM und PM im Up-Verdünner beobachtet werden. Abweichend von den übrigen Proben konnten für die im CASA gemessenen Werte beim Sonderfall nur eine Erhöhung der PM und nicht auch generell der GM nach 10 Minuten ermittelt werden. Jedoch zeigte sich im CP-Verdünner nach einer 10-minütigen Inkubationszeit ein Anstieg der im CASA gemessenen GM.

Tab. 22: Geschätzte und mittels SpermVision® (CASA) ermittelte Gesamt- (GM, %) und Progressivmotilität (PM, %) unverdünnter Proben, angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD)

Untersuchungsmethode und Parameter	Zeit (Minuten)	TE-Verdüner ($\bar{x} \pm SD$)	Up-Verdüner ($\bar{x} \pm SD$)	CP-Verdüner ($\bar{x} \pm SD$)
GM, geschätzt (%)	0	23,3 ± 12,5	45,0 ± 10,0	38,3 ± 12,6
	10	16,7 ± 11,5	50,0 ± 10,0	33,3 ± 15,3
	30	7,0 ± 2,6	41,7 ± 10,4	26,7 ± 16,1
	60	2,0 ± 2,0	20,0 ± 8,7	12,3 ± 11,0
GM, CASA (%)	0	25,3 ± 7,3	45,0 ± 5,2	24,7 ± 9,5
	10	20,9 ± 6,0	44,5 ± 9,5	26,9 ± 9,5
	30	15,1 ± 2,3	34,0 ± 4,1	22,3 ± 10,0
	60	11,0 ± 2,9	25,1 ± 11,6	20,8 ± 7,7
PM, geschätzt (%)	0	15,0 ± 10,8	36,7 ± 11,5	36,7 ± 10,4
	10	10,0 ± 8,7	40,0 ± 15,0	26,7 ± 16,1
	30	2,0 ± 1,7	26,7 ± 11,5	9,3 ± 4,0
	60	1,0 ± 1,0	10,0 ± 5,0	3,3 ± 3,2
PM, CASA (%)	0	5,8 ± 2,3	29,6 ± 7,4	11,1 ± 7,0
	10	5,1 ± 2,4	29,9 ± 11,5	9,7 ± 5,0
	30	1,7 ± 0,9	19,1 ± 3,4	3,4 ± 1,6
	60	1,3 ± 0,7	12,1 ± 8,2	3,9 ± 2,0

Die Parameter STR, LIN und WOB zeigten nur sehr geringe Unterschiede zwischen den drei Verdünnern und zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten. Bezüglich des Parameters ALH konnten die größten Unterschiede außer nach 10-minütiger Inkubation im TE-Verdüner festgestellt werden. Die höchsten BCF-Werte wurden außer nach 30 Minuten Inkubationszeit ebenfalls im TE-Verdüner beobachtet (Anhang Kap. 10.4).

4.4.3.3 Ergebnisse nach Zusatz von Auftaumedium

Bei den untersuchten Proben des Sonderfalles konnte keine generelle Verbesserung der GM und PM (CASA, Subj.) nach UpA Zusatz festgestellt werden (Tab. 23). Besonders im TE-Verdüner zeigten sich verbesserte oder vergleichbare Werte der GM und PM (CASA, Subj.) mit Zusatz von UpA. Im Up- und CP-Verdüner waren hingegen meist vergleichbare oder auch schlechtere GM- und PM-Werte (CASA,

Subj.) nachweisbar. Trotzdem konnten, wenn auch mit einer Ausnahme, im Up-Verdüner zu allen Zeitpunkten nach dem Auftauen mit beiden Methoden (CASA, Subj.) die höchsten GM- und PM-Werte ermittelt werden. Nur mit dem CP-Verdüner wurde nach 60-minütiger Inkubationszeit im CASA eine höhere GM nachgewiesen. Übereinstimmend mit den vorherigen Beobachtungen wurden auch hier zwar mit einigen Ausnahmen (n = 3) im TE-Verdüner die niedrigsten geschätzten und im CASA gemessenen GM- und PM-Werte festgestellt.

Nach 10-minütiger Inkubationszeit wurde mit dem Zusatz von UpA ein Anstieg der geschätzten GM und auch PM beim Up-Verdüner beobachtet. Wie bereits bei den übrigen Proben beobachtet, konnte auch hier beim CP-Verdüner nach 10-minütiger Inkubationszeit sowohl bei der subjektiven als auch der im CASA gemessenen GM und PM ein Anstieg der Messwerte dokumentiert werden.

Eine Ergebnistabelle mit allen Strecken- und Geschwindigkeitsparametern nach Zugabe von UpA befindet sich im Anhang (Kap. 10.4, Tab. A9).

Tab. 23: Geschätzte und mittels SpermVision® ermittelte Gesamt- (GM, %) und Progressivmotilität (PM, %) mit Zusatz von Auftaumedium (UpA), angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD)

Untersuchungsmethode und Parameter	Zeit (Minuten)	TE-Verdüner ($\bar{x} \pm SD$)	Up-Verdüner ($\bar{x} \pm SD$)	CP-Verdüner ($\bar{x} \pm SD$)
GM, geschätzt (%)	0	28,3 ± 14,4	45,0 ± 5,0	25,0 ± 5,0
	10	20,0 ± 10,0	51,7 ± 7,6	30,0 ± 10,0
	30	10,0 ± 5,0	36,7 ± 16,1	24,3 ± 13,7
	60	4,0 ± 1,7	18,3 ± 7,6	11,0 ± 8,5
GM, CASA (%)	0	25,9 ± 8,4	36,6 ± 6,2	24,0 ± 15,4
	10	20,8 ± 2,5	35,1 ± 3,8	27,8 ± 15,8
	30	17,0 ± 2,6	24,8 ± 3,8	21,9 ± 8,1
	60	18,1 ± 2,4	17,8 ± 1,0	21,3 ± 9,4
PM, geschätzt (%)	0	20,0 ± 13,2	38,3 ± 5,8	18,3 ± 2,9
	10	13,3 ± 7,6	45,0 ± 5,0	23,3 ± 7,6
	30	3,3 ± 1,5	28,3 ± 15,3	12,3 ± 7,5
	60	0,3 ± 0,6	13,3 ± 7,6	1,7 ± 2,1
PM, CASA (%)	0	4,6 ± 0,5	24,0 ± 6,5	3,6 ± 2,1
	10	3,5 ± 2,7	23,1 ± 4,5	6,5 ± 3,0
	30	1,6 ± 0,6	12,3 ± 4,6	5,1 ± 3,2
	60	0,1 ± 0,2	7,2 ± 3,1	1,4 ± 0,9

4.4.3.4 Ergebnisse nach Zusatz von Verdünnermedium 1

In den meisten Fällen ($n = 13$) lagen die geschätzten und im SpermVision® gemessenen GM- und PM-Werte der Proben mit Up1 Zusatz unterhalb unverdünnt oder mit UpA gemessener Proben (Tab. 24). Ausnahmen waren dabei die im CASA gemessene GM nach 30 und 60 Minuten Inkubationszeit sowie die geschätzte GM nach 30 Minuten.

Eine Ergebnistabelle mit allen Strecken- und Geschwindigkeitsparametern nach Zugabe von Up1 befindet sich im Anhang (Anhang Kap. 10.4, Tab. A10).

Tab. 24: Geschätzte und mittels SpermVision® ermittelte Gesamt- (GM, %) und Progressivmotilität (PM, %) nach Zusatz von Verdünnermedium 1 (Up1) zum Up-Verdünner, angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD)

Untersuchungsmethode	Zeit (Minuten)	GM ($\bar{x} \pm SD$)	PM ($\bar{x} \pm SD$)
geschätzt (%)	0	41,7 \pm 7,6	35,0 \pm 8,7
	10	45,0 \pm 8,7	35,0 \pm 13,2
	30	33,3 \pm 12,6	16,7 \pm 7,6
	60	18,3 \pm 7,6	7,3 \pm 2,5
CASA (%)	0	35,5 \pm 7,4	21,8 \pm 8,1
	10	32,2 \pm 3,0	16,9 \pm 6,2
	30	26,5 \pm 1,5	10,8 \pm 3,5
	60	18,6 \pm 2,4	6,0 \pm 2,0

4.4.4 Viabilität

Der Zusatz von Auftaumedium UpA führte beim behandelten Sonderfall zu keiner Beeinflussung der Viabilität. Auch hier wurden außer nach 60-minütiger Inkubationszeit im Up-Verdünner die geringsten Viabilitätsverluste gemessen (Tab. 25). Zu allen untersuchten Zeitpunkten nach dem Auftauen waren auch ebenfalls im TE-Verdünner die größten Viabilitätsverluste im Vergleich zu den nativ untersuchten Proben feststellbar.

Tab. 25: Durchschnittliche im SpermVision® ermittelte Viabilitäten nach dem Auftauen mit und ohne Auftaumedium (UpA) Zusatz, angegeben als arithmetischer Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD) sowie als Messwertdifferenz zum Nativsperma (Diff.)

Verdüner	Zeit (Minuten)	0		10		30		60	
		($\bar{x} \pm SD$)	Diff.	($\bar{x} \pm SD$)	Diff.	($\bar{x} \pm SD$)	Diff.	($\bar{x} \pm SD$)	Diff.
TE	unverdünnt	22,0 ± 8,0	-60	18,6 ± 8,9	-63,4	19,4 ± 6,1	-62,6	19,0 ± 6,8	-63
	mit UpA	26,0 ± 7,5	-56	19,2 ± 4,5	-62,8	16,9 ± 5,7	-65,1	15,3 ± 4,5	-66,7
Up	unverdünnt	37,7 ± 3,1	-44,3	25,5 ± 3,2	-56,5	24,4 ± 1,6	-57,6	21,0 ± 1,5	-61
	mit UpA	41,2 ± 8,2	-40,8	28,2 ± 6,3	-53,9	19,4 ± 6,7	-62,6	23,8 ± 1,9	-58,2
CP	unverdünnt	28,3 ± 8,2	-53,7	22,8 ± 7,8	-59,2	20,4 ± 4,1	-61,7	23,7 ± 6,4	-58,3
	mit UpA	32,5 ± 5,9	-49,5	33,0 ± 6,6	-49	23,7 ± 2,7	-58,3	20,3 ± 4,6	-61,7

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Proben wurden beim Sonderfall mit einem Zusatz von UpA direkt nach dem Auftauen und nach 60 Minuten mit dem Up- sowie nach 10 und 30 Minuten mit dem CP-Verdüner die höchsten Viabilitäten erreicht. Im TE-Verdüner zeigten sich auch hier mit dem Zusatz von UpA zu allen untersuchten Zeitpunkten nach dem Auftauen die stärksten Viabilitätsabnahmen.

4.4.5 Lebend-Tot-Anteil und Pathomorphologie

Wie bei den übrigen Proben wurde auch hier nach dem Auftauen der Verdünnerproben im Up-Verdüner der größte und im TE-Verdüner der geringste prozentuale Anteil an lebenden Spermien nachgewiesen. Die geringsten Veränderungen hinsichtlich des Anteils morphologisch veränderter Spermien wurden ebenfalls im CP-Verdüner beobachtet (Tab. 26).

Tab. 26: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse vom EosinG-Ausstrich des Sonderfalls, angegeben als Messwertdifferenz (Diff.) (aufgetaute Probe-nativ) zu den nativ untersuchten Proben mit arithmetischem Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD)

Parameter	TE-Verdünner		Up-Verdünner		CP-Verdünner	
	$\bar{x} \pm SD$	Diff.	$\bar{x} \pm SD$	Diff.	$\bar{x} \pm SD$	Diff.
Anteil lebender Spermien (%)	41,0 ± 14,1	-35,3	60,7 ± 7,7	-15,6	45,5 ± 6,7	-30,8
Pathomorphologie (%)	27,3 ± 11,9	13,3	21,3 ± 10,4	7,3	18,0 ± 8,0	4,0
Kopf- und Kappenveränderungen (%)	0,0 ± 0,0	0,0	0,3 ± 0,2	0,3	0,0 ± 0,0	0,0
Schwanzveränderungen (%)	20,0 ± 9,3	9,0	15,0 ± 8,5	4,0	13,3 ± 7,6	2,3
loser Köpfe (%)	7,0 ± 2,8	5,5	5,3 ± 1,9	3,8	4,3 ± 3,3	2,8
Anteil der Plasmatrophen (%)	0,3 ± 0,5	-1,2	0,5 ± 0,4	-1,0	0,3 ± 0,5	-1,2

Mit der Spermac®-Färbung wurden nach dem Tiefgefrieren wie auch bei allen übrigen Verdünnerproben im CP- die wenigsten und im Up-Verdünner die meisten Kappenverluste beobachtet (TE 9,3 ± 7,6 %, Up 12,5 ± 4,6 %, CP 7,2 ± 4,3 %).

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

Durch die stetig zunehmende Bedeutung der Kryokonservierung von Rüdensperma und den steigenden Einsatz in der KB besteht Bedarf bei der Optimierung der Auftauergebnisse. Verglichen zur Flüssigkonservierung bietet die Kryokonservierung eine Reihe von Vorteilen (Kapitel 2.4).

In der Literatur finden sich bereits zahlreiche Arbeiten über die Eignung verschiedener Verdünnerkombinationen und -zusätze für die Kryokonservierung von caninem Sperma; jedoch gibt es bislang keine Untersuchung, welche die Verdünner TE, Up und CP miteinander vergleicht. Ein Ziel dieser Arbeit war somit, diese Informationslücke zu füllen.

Der TE-Verdünner wurde bereits langjährig in der Klinik zur Kryokonservierung von caninem Sperma verwendet und hat sich als weitgehend geeignet erwiesen. Während über den TE-Verdünner und die Up-Systeme zahlreiche Publikationen vorliegen, ist die Datenlage über CP bislang rar. Vorteil des CP-Systems ist die kommerzielle Erhältlichkeit und die einfache Verwendbarkeit, d. h. vor dem Einsatz muss nur Eidotter zugefügt werden. Ein Abwiegen der Einzelkomponenten, wie bei TE- und Up-Verdünner erforderlich, entfällt, was das Handling für den Routineinsatz wesentlich erleichtert.

Des Weiteren wurde parallel der Einfluss eines Auftaumediums zur Verbesserung der Spermaqualität nach dem Auftauen untersucht.

5.2 Diskussion der Methodik

5.2.1 Auswahl der Probanden

Um repräsentative Stichproben zu erhalten, wurden je 3 Ejakulate von 11 Rüden verwendet. Aufgrund von Blutbeimengungen in allen Ejakulaten eines Rüden wurden diese Proben als Sonderfall behandelt.

Um Ejakulatveränderungen durch umweltbedingte oder vom Rüden ausgehende Faktoren zu minimieren, wurden die Absamungen an drei zeitnah aufeinander folgenden Terminen durchgeführt. Die drei Termine hatten einen Abstand von mindestens zwei Tagen, da bei Absamungen häufiger als alle 48 Stunden reduzierte Gesamtspermienzahlen durch Erschöpfung der epididymalen Reserven auftreten können (Root Kustritz, 2007). Motilität und prozentuale Anteile an morphologisch

veränderten Spermien werden durch häufiges Absamen nicht beeinflusst (England, 1999). Der für die Absamung im Rahmen dieser Studie gewählte Zeitraum (Juli - August 2009) wurde absichtlich kurz gewählt, um saisonale Schwankungen in der Samenqualität auszuschließen (Root Kustritz, 2007).

Um eine ausreichende Gesamtspermienzahl zu erhalten, die für die weitere Aufarbeitung und Aliquotierung in 3 Teile essentiell war, wurden ausschließlich große Rüden für die Untersuchung verwendet. Diese besitzen größere Hoden mit einem entsprechend höheren Anteil an funktionellem Hodengewebe und produzieren demnach nachweislich Ejakulate mit höheren Gesamtspermienzahlen (Olar et al., 1983; Günzel-Apel et al., 1994; Rijsselaere et al., 2007).

Um rassebedingte Einflüsse auf die Ejakulatqualität (England, 1999) zu vermeiden und um eine Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse zu gewährleisten, wurden unterschiedliche Rassen ausgewählt (Bull-Mastiff, Bernhardiner, Mastin de los Pirineos, Rottweiler, Berner-Sennenhund). Mit dem Ziel die Situation im täglichen Kliniksbetrieb widerzuspiegeln, wurden ebenfalls Rüden verschiedener Altersstufen eingesetzt.

In allen Fällen handelte es sich um privat gehaltene Tiere, die zufällig und nicht aufgrund ihrer Gefriertauglichkeit oder Konzeptionserfolge selektiert wurden. Als weiteres Kriterium wurden nur Rüden ausgewählt (mit Ausnahme des Sonderfalls), deren Ejakulate den gestellten Mindestanforderungen entsprachen und die keine Anzeichen für eine Beeinträchtigung der Sexualfunktion oder eine Erkrankung der Geschlechtsorgane aufwiesen.

5.2.2 Angewendete Gefrier- und Auftauraten

Die Qualität von caninem Sperma nach dem Auftauen wird entscheidend durch Gefrier- (Olar et al., 1989; Dobrinski et al., 1993; Rota et al., 1998; Peña und Linde-Forsberg, 2000b; Szász et al., 2000; Schäfer-Somi et al., 2006) und Auftauraten bzw. damit in Zusammenhang stehende Methoden beeinflusst (Battista et al., 1988; Olar et al., 1989; Rota et al., 1998; Peña und Linde-Forsberg, 2000b; Szász et al., 2000). Szász et al. (2000) postulierten sogar, dass die Gefrierate einen größeren Einfluss auf die Samenqualität hat als die Verdünner, was darauf hindeutet, daß die in dieser Dissertation erhaltenen Ergebnisse nur für die hier verwendeten Gefrier- und Auftauraten gültig sind. Um einheitliche Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden alle Pailletten unabhängig vom Verdünner nach Herunterkühlen auf 4 °C 10 cm über

flüssigen Stickstoff (-140 °C) für 10 Minuten adaptiert und dann in -196 °C umgelagert. Ebenso wurden alle Proben bei 37 °C für 60 Sekunden in einem Wasserbad aufgetaut. Diese Vereinheitlichung der Methodik, die aus Gründen der Vergleichbarkeit notwendig war, bedingte jedoch gewisse Abweichungen insbesondere von in der Literatur genannten Einfrierraten.

Der mögliche Einfluss verschiedener Equilibrierungszeiten der getesteten TE-, CP- und Up-Verdüner auf die Spermaqualität wird im jeweiligen Kapitel zur Diskussion der Ergebnisse abgehandelt.

5.2.3 Verdünnerunterschiede

Wesentliche Unterschiede zwischen den drei untersuchten Verdünnern, die bei der Interpretation der Versuchsergebnisse berücksichtigt werden müssen, sind deren unterschiedliche Inhaltsstoffe (Kap. 10.1.1) und Unterschiede in der Aufarbeitung (Kap. 10.1.2).

5.2.3.1 Unterschiede bezüglich der Inhaltsstoffe

Mit Ausnahme des selbst zugesetzten Eidotters sind vom kommerziellen CP-Verdüner nur einzelne Inhaltsstoffe, jedoch ohne eine Mengenangabe, bekannt. Eine Auswertung der Effekte durch einzelne Inhaltsstoffe der drei Verdüner auf die Messergebnisse ist daher nur bedingt möglich.

Die untersuchten Up- und TE-Verdüner enthalten als Zuckerkomponente Fruktose, der CP-Verdüner hingegen Glukose. Ebenfalls unterscheiden sich die verwendeten Glycerinmengen und deren Zugabezeitpunkte bei den Verdünnern. Bei dem TE-Verdüner wird die gesamte Glycerinmenge von 6,38 % zeitnah der Ejakulatentnahme vor einer Equilibrierung zugesetzt. Der zweiphasige Up-Verdüner hingegen enthält in Up1 3 % und in dem nach einer Equilibrierung zugesetzten Up2 7 % Glycerin, was zu einer Gesamtmenge von 5,26 % in der Endverdünnung führt. Die genaue Glycerinmenge des CP-Verdüners ist unbekannt, jedoch nur in CPB enthalten. Vergleiche der Ergebnisse bezüglich der einzelnen Parameter aufgrund der verwendeten Glycerinmenge in der Endverdünnung des entsprechenden Verdüners sind daher nur zwischen TE- und Up-Verdüner möglich. Diese liegen in annähernd vergleichbaren Endkonzentrationsbereichen. Da die optimale Glycerinkonzentration von der verwendeten Tris-Verdüner-

Zusammensetzung abhängig ist (England, 1993) sind Vergleiche mit anderen Studien nur schwer möglich.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied liegt in der im Up-Verdüner enthaltenen Equex STM-Paste und beim CP-Verdüner in unbekanntem, herstellereigenen Zusätzen.

5.2.3.2 Unterschiede bezüglich der Aufarbeitung

Ein wesentlicher Unterschied des Up-Verdüners zum TE- und CP-Verdüner lag in der Zentrifugation und dem damit verbundenen Abpipettieren des Seminalplasmas. Up- und CP- waren im Gegensatz zum TE-Verdüner zweiphasig. Die vor dem Tiefgefrieren durchgeführten Equilibrierungszeiten bei 4°C mit den verschiedenen Verdünnerkomponenten unterschieden sich deutlich bei den drei untersuchten Verdünnern (Gesamtequilibrierungszeit bei 4°C: TE: 120 Minuten, Up: 60 Minuten, CP: 160 Minuten, Tab. 13). Auch die erreichte Endverdünnung der Nativejakulate differierte zwischen den Verdünnern (Tab. 13).

Ein weiterer Punkt sind die nur beim CP- und Up-Verdüner auf 4°C vorgekühlten Midi-Pailletten, da diese Ejakulatproben zum Zeitpunkt der Abfüllung bereits längere Zeit bei 4°C equilibriert wurden. Die Midi-Pailletten des TE-Verdüners hingegen hatten Raumtemperatur, da diese vor einer Equilibrierung des Verdüners befüllt wurden.

5.2.4 Verwendete spermatologische Untersuchungsmethoden

Die Untersuchung der Nativejakulate und der aufgetauten Verdünnerproben erfolgte mit Hilfe klassischer und computergestützter spermatologischer Analyseverfahren.

5.2.4.1 Klassische Analyseverfahren

Neben den standardmäßig durchgeführten Untersuchungen (GM, PM, Lebend-Tot-Anteil, Pathomorphologie, Dichte) wurden zusätzlich ein HOS-Test und eine Spermac®-Färbung durchgeführt. Der HOS-Test diente dazu, möglicherweise Tiere zu identifizieren, die trotz eines normalen Spermogrammes als subfertil einzustufen sind (Kumi-Diaka, 1993; Rijsselaere et al., 2005).

Die zur Beurteilung des Akrosoms beim Rüden bewährte Spermac®-Färbung (Riesenbeck et al., 2001) wurde sowohl zur Beurteilung der Nativejakulate als auch

der aufgetauten Verdünnerproben verwendet, um anhand des akrosomalen Status die während der Tiefgefrierkonservierung entstandenen Veränderungen und Einflüsse durch die verschiedenen Verdünner zu erfassen. Jedoch erwies sich insbesondere bei den mit den verschiedenen Verdünnern versetzten Proben die Beurteilung aufgrund von Überlagerungen mit grün gefärbten Partikeln - vermutlich vom Eidotter resultierend - teilweise als schwierig. Möglicherweise hätte eine Verdünnung der Tiefgefrierspermaproben (1:1) mit Natriumcitratlösung vor dem Ausstreichen (Riesenbeck et al., 2001) diese Überlagerungen reduziert.

5.2.4.2 Anwendung von CASA zur Beurteilung der Motilität und Viabilität von Rüdensperma

5.2.4.2.1 Motilität

Die Motilität gilt als wichtiger Parameter für die Besiedlung des Oviduktes und die Befruchtung (Martínez, 2004). Aufgrund der Bedeutung der Motilität wurde neben der subjektiven Schätzung eine zusätzliche Beurteilung mittels SpermVision®-Systems durchgeführt.

Die visuelle Beurteilung der Motilität stellt eine äußerst einfache, schnelle und preiswerte Methode zur Beurteilung der Spermaqualität dar, die jedoch subjektiv von der Erfahrung des Untersuchers abhängig ist und demnach nicht in jedem Fall zuverlässig zur Prognostizierung der Fertilität geeignet ist (Martínez, 2004).

CASA-Systeme dagegen ermöglichen eine schnelle Erfassung großer Mengen an objektivierte Analysedaten unter Berücksichtigung verschiedener Spermienpopulationen, die mit dem menschlichen Auge nicht differenzierbar sind, wodurch genauere Aussagen bezüglich der Spermaqualität getroffen werden können. Außerdem liefern CASA-Systeme weiterführende präzise Informationen über die Bewegungsmuster von Spermien (Verstegen et al., 2002) und ermöglichen somit eine objektivere Beurteilung einzelner Verarbeitungsschritte bei der Bewertung von Kryokonservierungsmethoden (Günzel-Apel et al., 1993). Eine fehlende Standardisierung zwischen den CASA-Systemen und deren Benutzern erschweren jedoch die Definition von einheitlich akzeptierten Werten für normale und von der Norm abweichende Spermienbewegungen (Verstegen et al., 2002). Bei den einzelnen CASA-Systemen (Cellsoft Computer Videomicrography System, Stromberg-Mika Cell Motion Analyzer, Hobson Sperm Tracker, Hamilton-Thorne,

usw.) werden unterschiedliche technische Einstellungen verwendet, welche einen signifikanten Einfluss auf die Messergebnisse haben (Martínez, 2004; Rijsselaere et al., 2005), so daß die Ergebnisse stets im Verhältnis zu den verwendeten Einstellungen beurteilt werden müssen (Verstegen et al., 2002).

Die in dieser Dissertationsarbeit zur Analyse der Proben verwendeten CASA-Einstellungen basieren auf Empfehlung der Herstellerfirma Minitüb (Tiefenbach) (Kap. 3.3.3.1). Sie stimmen im Wesentlichen mit denen von Schäfer-Somi und Aurich (2007) empfohlenen Einstellungen für das SpermVision®-System überein (gleiche Einstellungen für hyperaktive Spermien, nicht bewegliche Spermien, lineare Spermien). Abweichungen, die die Definition der PM und der kurvenbeweglichen Spermien betreffen, sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 27) dargestellt und neben individuellen Präferenzen v.a. durch Unterschiede in der verwendeten Software Version bedingt.

Tab. 27: Abweichende Einstellungen für die Motilitätsanalyse

Parameter	Verwendete Einstellungen	Schäfer-Somi und Aurich, 2007; Witte et al., 2009; Eulenberger et al., 2009; Koderle et al., 2009
Vorwärtsbewegliche Spermien	Jede Zelle, die nicht als immotil (AOC < 9,5) und ortsbeweglich (DSL < 6) eingestuft wurde	VCL > 15 µm/Sek. STR > 0,9
kurvenbewegliche Spermien	DAP/Radius ≥ 3 und LIN < 0,5	keine Angabe
Spermienerkennung	20 - 60 µm ²	35 µm ²

Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis

Die Frame Rate gibt die Anzahl der pro Sekunde ausgewerteten Bilder an (Rijsselaere et al., 2003) und hat Einfluss auf die ermittelten Motilitätsparameter (Günzel-Apel et al., 1993; Rijsselaere et al., 2003; Schäfer-Somi und Aurich, 2007). In Übereinstimmung mit Rijsselaere et al. (2003) sowie Schäfer-Somi und Aurich (2007) wurde mit 60 Bildern pro Sekunde gearbeitet.

Neben technischen Faktoren, wie den gewählten Einstellungen, sind bei jeder Auswertung von Ergebnissen auch der Prozess der Verarbeitung und z. B. die unterschiedlichen Eigenschaften der Verdünner zu berücksichtigen, da Messergebnisse nicht unwesentlich durch die Viskosität des Mediums und dem Anteil an Eidotterpartikeln etc. beeinträchtigt werden (Rijsselaere et al., 2003). Da auch die Analysetemperatur einen Einfluss auf die ermittelte Motilität hat, wurden alle Messungen bei 38°C durchgeführt. Diese Temperatur entspricht den Erfahrungen

aus der Literatur, wonach Temperaturen nahe der Körpertemperatur (37 - 38°C) signifikant höhere Motilitäten ergeben als solche unterhalb der Körpertemperatur (38°C vs. 30°C) (Iguer-Ouada und Verstegen, 2001). Sie sind demnach besonders geeignet und finden deshalb üblicherweise Verwendung (Verstegen et al., 2002; Schäfer-Somi et al., 2006; Verstegen et al., 2006; Schäfer-Somi und Aurich, 2007; Witte et al., 2009).

5.2.4.2.1.1 Verdünnung vor Motilitätsanalyse

Um eine Motilitätsanalyse der Nativejakulate, der aufbereiteten und aufgetauten Verdünnerproben durchführen zu können, mussten diese in einigen Fällen aufgrund einer zu hohen Dichte vorher verdünnt werden. Da Partikel einer ähnlichen Größe wie Spermienköpfe (z. B. nicht geklärter Eidotter, Milch-Verdünner) im CASA nicht von immotilen Spermien unterschieden werden können (Verstegen et al., 2002; Rijsselaere et al., 2003), ist die entscheidende Voraussetzung an das Verdünnermedium, dass keine derartigen Partikel als Inhaltstoffe enthalten sind.

In der Literatur gibt es einige vergleichende Untersuchungen zum Einfluss der Zugabe eines Verdünnermediums zu Nativsperma auf die Motilitätsparameter. Während Smith und England (2001) mit physiologischer Kochsalzlösung und Methylcellulose (0,3 mg/ml) verglichen mit Seminalplasma sowie Rijsselaere et al. (2003) mit physiologischer Kochsalzlösung und Tris-Eidotter-Verdünner verglichen mit Hapes-TALP- und Prostatasekret die geringsten Auswirkungen auf die Motilität nachweisen konnten, ergaben sich im Gegensatz dazu bei Schäfer-Somi und Aurich (2007) mit PBS sowie 0,9 %iger Kochsalzlösung im Vergleich zu Tris-Medium und autologem Prostatasekret stärkere Auswirkungen auf die Motilität. Da 0,9 % Kochsalzlösung keine Energiesubstrate oder Partikel, die die CASA Motilitätsanalyse beeinflussen, enthält (Rijsselaere et al., 2003), wurden Proben mit einer zu hohen Ausgangsdichte auch in dieser Studie mit 0,9 % Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10 verdünnt. Um Temperaturschwankungen zu minimieren, wurde die 0,9 % Natriumchloridlösung zuvor auf 38°C temperiert. Subjektiv erschien der Zusatz von Natriumchloridlösung jedoch die Motilität negativ zu beeinflussen. Inwieweit dies objektiv zu bestätigen ist, bedarf weiterer Klärung.

Eine Verdünnung der zu untersuchenden Proben war zudem bei mittels Up-System aufgearbeiteten Proben notwendig, da diese aufgrund der Zentrifugation höhere Dichten als die entsprechenden TE- und CP-Verdünnerproben aufwiesen. Da es sich

bereits um vorverdünnte Proben handelte, wurde eine Verdünnung mit Up1 der Verdünnung mit 0,9 % Natriumchloridlösung vorgezogen (ebenfalls im Verhältnis 1:5 bzw. 1:10). Nach dem Auftauen der Up-Proben wurde aus demselben Grund eine generelle zusätzliche Verdünnungsreihe mit Up1 im Verhältnis 1:1 vorgenommen, die parallel zu den anderen Up-Proben im Wasserbad inkubiert und untersucht wurde.

5.2.4.2.1.2 Einfluss der Dichte auf die Motilitätsergebnisse

Unabhängig vom eingesetzten Verdünnermedium zeigten sich auch bei aufbereiteten und aufgetauten Verdünnerproben vom Untersucher subjektiv empfundene Abhängigkeiten der CASA Motilitäten von der Spermiedichte: so wurden die Motilitätsergebnisse nach starker Verdünnung einer initial sehr dichten Probe subjektiv besser als im CASA eingestuft.

Übereinstimmend mit den hier gemachten subjektiven Beobachtungen wurde von Rijsselaere et al. (2003) bei hohen Spermiedichten ein Anstieg der Geschwindigkeit, Linearität, GM und PM beobachtet (zwischen 25, 50 oder $100 \cdot 10^6$ Spermien/ml). Im Gegensatz dazu konnten Smith und England (2001) bei abnehmender Spermiedichte (Vergleich 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 verdünnte Proben) einen Anstieg der linearen Vorwärtsbewegung, der Linearität sowie eine geringe Abnahme der durchschnittlichen Geschwindigkeit beobachten. Weiterführende Untersuchungen sind zur Klärung dieses Problems notwendig. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass bei zu niedrigen Dichten die Unterschiede zwischen den einzelnen Messfeldern zu groß werden können, es bei zu hohen Dichten aber zu Spermienzellüberlagerung und -kollision kommen kann, was die Zuverlässigkeit der Analyse ebenfalls verringert (Verstegen et al., 2006). Neben indirekten Einflüssen des Verdünners auf das Ejakulat sind auch technische oder Software bedingte Unterschiede zu berücksichtigen. Obwohl das SpermVision®-System über einen großen Konzentrationsbereich ohne signifikante Messwertsunterschiede als leistungsfähig angesehen wird, zeigten sich die besten Ergebnisse bei Konzentrationen zwischen 50 und 100 Mio. Spermien/ml (Verstegen et al., 2006). Beim Vergleich 50 bzw. 100 Mio./ml waren die Ergebnisse von 100 Mio. Spermien/ml denen von 50 Mio. Spermien/ml überlegen (Schäfer-Somi und Aurich, 2007). Um system-bedingte Unterschiede auszuschließen und die Ergebnisse zu vereinheitlichen, wird von Schäfer-Somi et al. eine Verdünnung auf eine Spermienkonzentration von

100*10⁶/ml empfohlen (Schäfer-Somi et al., 2006; Schäfer-Somi und Aurich, 2007; Eulenberger et al., 2009; Koderle et al., 2009; Witte et al., 2009).

Um mögliche Fehlbeurteilungen des CASA auszuschließen, war eine Kontrolle der einzelnen Analysefelder mittels Overlay bezüglich der Motilitätsklassifizierung der Spermien im Anschluss an jede Analyse unumgänglich. Eventuelle Fehlbeurteilungen wurden durch eine erneute Messung korrigiert, wobei einzelne betroffene Analysefelder durch den Untersuchenden gelöscht und durch neu gemessene Felder vom CASA ersetzt wurden.

Auch die unterschiedliche Verteilung motiler Spermien in der Leja-Kammer bedarf der Berücksichtigung hinsichtlich der Messergebnisse. So wandern motile Spermien eher auf die der Einfüllöffnung gegenüberliegende Seite der Leja-Kammer, während immotile Spermien nur durch passive Bewegung weitertransportiert werden. Um diese Beeinflussung möglichst gering zu halten, werden stark abweichende Motilitätsergebnisse in einzelnen Messfeldern automatisch vom SpermVision®-System gelöscht und erneute Messungen neuer Felder vorgenommen. Zudem wurden die Ergebnisse nur verwendet, wenn die Messwerte der einzelnen Messfelder nicht mehr als 20 % voneinander abweichen, um eine gewisse Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten (Verstegen et al., 2006).

5.2.4.2.1.3 Vergleich subjektiver und mittels SpermVision®-System ermittelter Motilitätsergebnisse

Die Korrelationsanalyse wurde mit den arithmetischen Mittelwerten der drei Absamungstermine berechnet und durch eine Pseudoreplikation, bei der alle Messergebnisse wie 30 unabhängige Proben behandelt wurden, ergänzt. Des Weiteren wurden Methoden- bzw. Mittelwertunterschiede untersucht.

Im Gegensatz zu Rijsselaere et al. (2003) konnte in dieser Arbeit keine statistisch signifikante Korrelation (auch nicht in der Pseudoreplikation) zwischen subjektiv geschätzten und mittels CASA ermittelten Motilitäten bei Nativejakulaten verifiziert werden. Rijsselaere et al. (2003) verglich wie in dieser Arbeit die Ergebnisse der subjektiven PM mit denen der CASA PM und verdünnte die Proben - sofern die Dichte größer als 50*10⁶/ml war – ebenfalls mit physiologischer Kochsalzlösung. In dieser Arbeit lagen die Schätzwerte für die PM durchschnittlich 9,7 % über den vom Computer ermittelten Werten.

Bei den verdünnten Proben zeigten sich nach dem Auftauen, vor allem bei der geschätzten und im SpermVision® ermittelten PM, eine Vielzahl signifikanter Korrelationen, welche in der Pseudoreplikation bestätigt werden konnten. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung bestätigen auch andere Autoren signifikante Korrelationen zwischen geschätzten und im CASA ermittelten Motilitäten nach dem Auftauen (Peña et al., 2003b; Martins-Bessa et al., 2006). Günzel-Apel et al. (1993) ermittelten signifikante Korrelationen zwischen subjektiv und mittels CASA ermittelter GM nach Verdünnung auf $34 - 102 \cdot 10^6/\text{ml}$ mit einem Magermilch-Verdünner; als Ursache für die hohe Korrelation postulieren die Autoren eine Elimination von Nicht-Spermien-Partikeln durch Filtration sowie die Erwärmung des Verdünners auf 39°C . Da bei den verschiedenen Verdünnern sowie durch den Zusatz von UpA, Up1 unterschiedlich viele Korrelationen festgestellt wurden, beeinflusst das Verdünnermedium und die damit in Zusammenhang stehende Dichte höchstwahrscheinlich das Messergebnis der CASA. Die meisten signifikanten Korrelationen bezüglich der geschätzten und im CASA ermittelten GM und PM zeigten sich im CP-Verdünner. Nach Zusatz von Auftaumedium waren jedoch bezüglich der GM die meisten Korrelationen im Up-Verdünner und nur für die PM im CP-Verdünner feststellbar. In dieser Arbeit wurde vor allem auf die GM ein Einfluß durch den verwendeten Verdünner festgestellt (relativ gesehen weniger signifikante Korrelationen). Ein Einfluss des Verdünners auf die Korrelation der geschätzten und im CASA ermittelten Ergebnisse wurde bereits von Schäfer-Somi und Aurich (2007) für verdünnte, jedoch nicht kryokonservierte Spermaproben beschrieben. Die Ergebnisse aufgetauter Proben zeigten vor allem nach 60-minütiger Inkubationszeit nur wenige Zusammenhänge zwischen geschätzter und im CASA gemessener GM und PM. In den meisten Fällen lag die subjektiv geschätzte GM und PM nach 60 minütiger Inkubationszeit höher als die im CASA ermittelte. Alle diese Proben hatten relativ gesehen zu den übrigen Messzeitpunkten eine geringe Motilität. Insgesamt muss in diesem Zusammenhang eine Überbewertung seitens des Untersuchenden bzw. eine Unterschätzung der Motilität des CASA diskutiert werden. Im Gegensatz dazu wurden mittels CASA Motilitäten bei Verdünnerproben ermittelt, die vom Untersucher als komplett immotil eingestuft wurden. Diese könnten als Folge einer passiven Bewegung im flüssigkeitsgefüllten Spalt der Leja-Kammer zustande kommen. Diese Beobachtungen unterstreichen die Notwendigkeit einer kritischen

Beurteilung der mit CASA ermittelten Motilitäten, vor allem in Proben mit geringer Motilität.

5.2.4.2.2 Viabilität

Ein Vorteil des in dieser Arbeit verwendeten SpermVision®-Systems ist, dass es im Vergleich zu anderen CASA-Systemen neben diversen Motilitätsparametern auch die Viabilität bzw. Membranintegrität der Spermien nach SYBR14/PI Färbung schnell und einfach erfassen kann (Schäfer-Somi und Aurich, 2007).

Während im SpermVision®-System und auch Eosin-Präparat nur lebende und tote Spermien differenzierbar sind, können mittels Flow-Cytometry zudem sterbende Spermien, die gleichzeitig SYBR14 und PI enthalten, identifiziert werden (Nizanski und Klimowicz, 2005; Rijsselaere et al., 2005).

Vorteil des SpermVision®-System ist eine schnelle Beurteilung der Membranintegrität bzw. Viabilität größerer Probenzahlen, während die Eosin-Färbung aufgrund der manuellen Auszählung und Auswertung von 200 Spermienzellen aufwendiger ist und somit eher für kleinere Probenzahlen geeignet ist. Die objektive Bewertung durch das CASA-System soll ebenfalls untersucherbedingte Einflüsse reduzieren; durch die verwendeten Einstellungen gibt es jedoch auch hier wie bei der Motilität Messunterschiede zwischen verschiedenen Laboren. Ebenfalls können durch fehlerhafte Einstellungen die Messwerte erheblich abweichen. Ein direkter Vergleich der für die Viabilitätsmessung verwendeten Einstellungen ist mangels Angaben in den Veröffentlichungen u. a. von Schäfer-Somi und Aurich (2007) nicht möglich.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden verschiedene Einstellungen zu Beurteilung der Viabilität von nativen und aufgetauten Proben vorgenommen. Eine Verwendung der gleichen Einstellungen bei Nativejakulaten und aufgetauten Verdünnerproben zeigte unbefriedigende Ergebnisse, da eine Vielzahl der Spermien nicht erkannt wurde. Dadurch wurden die Messergebnisse erheblich beeinträchtigt. Nach einer Veränderung der Viabilitätseinstellungen für die Beurteilung der aufgetauten Verdünnerproben verbesserten sich sowohl die Genauigkeit als auch die Zuverlässigkeit der Messergebnisse deutlich. In der Humanmedizin ist - anders als in der Veterinärmedizin - dieses Problem bereits bei der Beurteilung von Dichte und Spermienmotilität bekannt. Es werden verschiedene Einstellungen für native und aufgetaute, zuvor kryokonservierte Proben verwendet,

da der Zusatz eines Verdünnermediums andere Einstellungen erforderlich macht (Verstegen et al., 2002).

SYBR14/PI färbt selektiv Spermien und ermöglicht somit eine Differenzierung von anderen Partikeln im Medium (Peña et al., 2006). Eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch gefärbte Verdünnerbestandteile steht daher außer Frage. Wechselwirkungen von Verdünnerbestandteilen und Spermien sowie daraus resultierende Veränderungen der Fluoreszenz sind jedoch zu diskutieren, da beide Komponenten (SYBR14/PI) den gleichen Anregungsbereich (488 nm) aber unterschiedliche Emissionsbereiche [SYBR14 grüne Wellenlängen (515 nm), PI rote (610 nm)] haben (Peña et al., 2006). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung bestärkt, dass Unterschiede in der Fluoreszenz verschiedener Rüden und Verdünner nachweisbar waren. Diese individuellen Unterschiede konnten auch für Bullenspermien gefunden werden (Garner und Johnson, 1995); während Schäfer-Somi und Aurich (2007) eine Beeinflussung der Viabilität bei Verwendung verschiedener Verdünner nach SYBR14/PI Färbung im SpermVision®-System zeigten. Eine Beeinträchtigung der Viabilitätsergebnisse durch das verwendete Verdünner- und Auftaumedium sowie durch individuelle Faktoren kann somit in den hier durchgeführten Versuchen nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl bereits signifikante Korrelationen zwischen dem Lebend-Tot-Anteil (Eosin-Nigrosin) und der Viabilität (SYBR14/PI) bei equinem (Merkies et al., 2000) und caninem Nativsperma (Nizanski und Klimowicz, 2005) nachgewiesen wurden, konnte entgegen den Erwartungen in dieser Arbeit im Nativsperma keine statistisch signifikante Korrelation der mittels SYBR14/PI ermittelten Viabilität und des Anteils lebender Spermien (EosinG) festgestellt werden ($p > 0,05$). Dies wurde bisher ausschließlich bei Nativsperma vom Hahn beschrieben (Chalah und Brillard, 1998). Die Mittelwertunterschiede der beiden Methoden waren jedoch nicht signifikant.

Im Gegensatz dazu ergaben sich direkt nach dem Auftauen signifikante Korrelationen der untersuchten Parameter ($p < 0,01$; CP Pseudoreplikation $p = 0,04$). Prinzipiell kommt es durch Eosin-Nigrosin zu einer Überbewertung der Viabilität im Vergleich zu SYBR14/PI, die den Beobachtungen an kryokonserviertem sowie gekühltem Sperma entsprechen (Hahn-, Hengst- und Bullenspermien) (Chalah und Brillard, 1998; Merkies et al., 2000; Barito et al., 2003; Nizanski und Klimowicz, 2005). Als Ursache sind Unterschiede im Molekulargewicht der verschiedenen Farbstoffe unwahrscheinlich, da Eosin (692 Da) und PI (668 Da) vergleichbare

Molekulargewichte aufweisen. Eine mögliche Ursache wären die unterschiedlichen Färbezeiten, welche bei Eosin nur einige Sekunden im Vergleich dazu bei PI mehrere Minuten beträgt (Barito et al., 2003).

Die Bedeutung der mittels SYBR14/PI nachgewiesenen Viabilität für den Befruchtungserfolg ist derzeit aufgrund kontroverser Ergebnisse nicht abschließend zu beurteilen (Januskauskas et al., 2000; Barito et al., 2003; Baltissen, 2007; Foxcroft et al., 2008).

5.3 Diskussion der Messergebnisse

5.3.1 Motilitätsergebnisse nach Verdünnung der Proben vor und nach Kryokonservierung

5.3.1.1 Motilitätsergebnisse vor Kryokonservierung

Alle drei Verdüner wurden nach vollständiger Aufarbeitung mit dem jeweiligen System untersucht, um die bereits vor einer Tiefgefrierung durch alleinige Verdünerzugabe auftretenden Unterschiede darzustellen.

Schon vor der Tiefgefrierung zeigten sich deutliche Unterschiede für die im SpermVision®-System ermittelten Motilitätsparameter (außer für STR, LIN, WOB, BCF). Die geringsten Unterschiede und somit die geringsten Beeinträchtigungen der Nativejakulate wurden für zahlreiche Motilitätsparameter (GM, PM, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL und ALH) nach Aufarbeitung mit dem CP-Verdüner festgestellt. Der TE-Verdüner hingegen zeigte verglichen mit den Nativejakulaten die deutlichsten Veränderungen für einen Großteil der untersuchten CASA-Parameter (GM, PM, DAP, VAP, VCL, VSL und ALH). Mit dem Up-Verdüner wurden hingegen für DCL, DSL und BCF die größten Veränderungen beobachtet.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass die Motilitätsmessung nach vollständiger Aufbereitung des Nativspermas mit dem jeweiligen Verdüner-System und folglich nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Entnahme bzw. Untersuchung der Nativejakulate durchgeführt wurden. Der TE-Verdüner wurde bereits kurze Zeit nach der Samenentnahme mit allen Verdünerkomponenten vollständig aufgearbeitet. Die TE-Proben wurden als Erste gemessen und hatten verglichen mit den beiden anderen Verdünnern eine, bedingt durch die noch nicht durchgeführte Equilibrierungsphase bei 4°C, eine wesentlich höhere Temperatur. Die CP- und Up-Proben wurden erst nach unterschiedlich

langen Equilibrierungszeiten im Kühlschrank bei 4°C untersucht und waren somit auch verschieden lang den Verdünnereinstoffen ausgesetzt. CP war demnach am längsten dem Verdünnemedium und den niedrigen Temperaturen ausgesetzt, zeigte aber dennoch die besten CASA-Motilitäten.

Da die Spermienmembran bei niedrigen Temperaturen nahezu impermeabel, bei höheren Temperaturen (z. B. 38°C) jedoch gut permeabel für Glycerin ist, wird beim TE-Verdüner bereits nach wenigen Minuten das Equilibrium erreicht (Weitze und Petrunkina, 2007). Im Gegensatz dazu ist beim Up- und CP-Verdüner von einem langsamen, intrazellulären Glycerinanstieg auszugehen. Ein schneller Anstieg der intrazellulären Glycerinmenge, wie im TE-Verdüner, könnte folglich ein potenzieller Grund für die bereits vor der Tiefgefrierung beobachtete starke Beeinträchtigung der Motilität sein. Diese Hypothese widerspricht der Beobachtung von Peña et al. (1998a), die keine Unterschiede bezüglich des Zeitpunktes und der Temperatur einer Glycerinzugabe bei einer Beurteilung der Proben nach dem Auftauen nachweisen konnte. Der Einfluss von Equex STM und der Zentrifugation bedarf ebenfalls Berücksichtigung, insbesondere bei der Zentrifugation erscheint er jedoch vernachlässigbar (Schäfer-Somi et al., 2006; Koderle et al., 2009). Inwieweit unterschiedliche Glycerin-Endkonzentrationen (5,26 % Up versus 6,38 % TE) oder Zuckerkomponenten das Ergebnis begründen, bleibt unklar, da auch in der Literatur die Ansichten bezüglich der Unterschiede zwischen Glukose und Fruktose als geeignetere Energiequelle kontrovers diskutiert werden (Yildiz et al., 2000; Songsasen et al., 2002; Palomo et al., 2003; Ceylan und Serin, 2006).

5.3.1.2 Motilitätsergebnisse nach Kryokonservierung und Auftauen

Der Kryokonservierungsprozess beeinträchtigte mit Up-Verdüner versetzte Proben am wenigsten beim Gefrier- und Auftauprozess. Im CP-Verdüner hingegen waren die größten Motilitätsabnahmen durch den Gefrier- und Auftauprozess feststellbar.

Nach dem Auftauen und während einer 60 minütigen Inkubationszeit im Wasserbad zeigten sich mit dem Up-Verdüner die besten geschätzten und im CASA ermittelten GM, PM sowie im CASA ermittelten DCL- und VCL-Werte (außer nach 30 minütiger Inkubationszeit, CP-Verdüner). Im CP-Verdüner hingegen waren die CASA-Parameter DAP, DSL, VAP und VSL (außer nach 60 minütiger Inkubationszeit, Up-Verdüner) am höchsten. Die schlechtesten Ergebnisse zeigten sich bis auf wenige Ausnahmen (DSL und VSL: $t_0 + t_{10}$ Up-Verdüner) bei der GM und PM sowie den Strecken- und Geschwindigkeitsparametern in TE verdünnten Proben.

Unterschiede in den Motilitätsergebnissen der drei Verdünner könnten - wie bereits zuvor diskutiert - in verschiedenen Glycerinmengen (Rohloff et al., 1978; Peña et al. 1998a), Zugabezeitpunkten und -temperaturen (Peña et al., 1998a) oder auch durch die Zentrifugation begründet sein (Platz und Seager, 1977; Gil et al., 2000; Schäfer-Somi et al., 2006; Koderle et al., 2009). Wahrscheinlicher erscheint jedoch, dass die ein- oder zweiphasige Glycerinzugabe eine Beeinflussung der Motilität darstellt (Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006). So erwiesen sich zweiphasige Verdünner als besser geeignet, da wie auch hier bei CP- und Up- verglichen mit TE-Proben höhere Motilitäten nach dem Auftauen nachweisbar waren. Obwohl Koderle et al. (2009) einen negativen Effekt der Zentrifugation durch mechanische Schädigung als Ursache für Motilitätsunterschiede sowie von im Seminalplasma enthaltenen Antioxidativen oder anderen schützenden Proteinen postuliert, wiesen die Up-Proben die höchste Motilität auf.

Yildiz et al. (2000) sowie Ceylan und Serin (2006) konnten höhere Motilitäten in einem Tris-Verdünner mit Fruktose verglichen zu Glukose detektieren, diese Tendenz war hier nicht zu verifizieren (Up besser, TE schlechter). Dagegen wird jedoch insbesondere die im Up enthaltene Equex STM-Paste ursächlich im Zusammenhang mit einer Motilitätsverbesserung diskutiert (Rota et al., 1997; Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Peña et al., 2003b; Ponglowhapan und Chatdarong, 2008; Alhaider und Watson, 2009). Hier scheinen jedoch auch eine gewisse Adaptation nach dem Auftauen, die Aufarbeitung und Gefriermethode von Bedeutung zu sein (Petrunkina et al., 2005; Schäfer-Somi et al., 2006).

5.3.1.2.1 Motilitätsveränderungen während der Inkubation

Bei einigen Motilitätsparametern konnte ein Anstieg der Parameter nach 10 bzw. 30 minütiger Inkubationszeit nach dem Auftauen beobachtet werden. Möglicherweise ist hier ein Zusammenhang zwischen Temperaturanstieg und Erhöhung der Schwanz-Aktivität der Spermien zu sehen. Inwieweit dies auf eine unzureichende Auftautemperatur oder -zeit hindeuten könnte, kann nicht abschließend beantwortet werden. Wenngleich in der Literatur Auftauprotokolle von 75°C für 6,5 Sekunden bzw. 70°C bessere Ergebnisse bedingen als konventionelle Protokolle mit 37 - 40°C für 60 Sekunden (Battista et al., 1988; England, 1993; Rota et al., 1998; Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Nöthling und Shuttleworth, 2005), haben sich diese in der Praxis nicht durchgesetzt. Bei eigenen Vorversuchen konnten bei 30 Sekunden

Auftauzeit schlechtere subjektive Motilitäten verglichen mit 60 Sekunden nachgewiesen werden. Auch eine Hyperaktivierung, die zu einem Anstieg von VCL und VAP führt, könnte für den Motilitätsanstieg verantwortlich sein. In den eigenen Versuchen wurde für VCL im TE- (t10), Up- (t10) und CP- (t30) sowie für VAP im CP- Verdünner (t10) ein Anstieg der Messwerte ermittelt, was einen Hinweis auf eine Hyperaktivierung geben kann, obwohl dies bislang für Equex STM-Paste enthaltende Verdünner nicht beobachtet wurde (Peña und Linde-Forsberg, 2000a).

5.3.1.3 Bedeutung der einzelnen Motilitätsparameter für die Fertilität

Obwohl Baltissen (2007) die Spermienmorphologie als geeignetsten Parameter zur Prädiktion des Befruchtungserfolges ansieht, gilt auch die Motilität als eine der wichtigsten Charakteristika für die Befruchtungsfähigkeit von Sperma (Verstegen et al., 2002).

Hunde mit reduzierten in vivo Fertilitäten zeigten bei den meisten Spermienparametern signifikant niedrigere Werte (Rijsselaere et al., 2003, 2007), dennoch konnten bislang weder für Rüden- noch für Ebersperma signifikante Korrelationen zwischen CASA-Parametern und Fertilität ermittelt werden (Rijsselaere et al., 2003; Quintero-Moreno et al. 2004; Didion, 2008).

Obwohl noch nicht abschließend geklärt ist, welche CASA Parameter zur Prognostizierung der Befruchtungsfähigkeit und demnach den Kryokonservierungserfolg klinisch relevant sind, postulieren Verstegen et al. (2002) die besondere Bedeutung der Geschwindigkeitsparameter, wie VCL, VAP und VSL. Die Bedeutung von VCL und VAP ergibt sich ebenfalls aus ihrer biologischen Bedeutung. Beide Parameter stehen in Zusammenhang mit der Hyperaktivierung und steigen nach Kapazitation an. Diese Hyperaktivierung von Spermien findet normalerweise während der Durchquerung des Oviduktes statt, bei der es zu lateraler Auslenkung von Kopf und Geißel, verbunden mit langsamer bis nicht vorhandener PM, einer geringen Frequenz des Geißelschlages, einem hohen Grad an kurvenförmigen Geißelbewegungen und einer nicht-progressiven kreisförmigen "star-spin" Bewegung kommt. Vermutlich führt das Fehlen einer Hyperaktivierung zur Unfähigkeit des Spermiums, an die Zona pellucida zu binden und die Oozyte zu befruchten. Der Anteil hyperaktivierter Spermien ist in fertilem Sperma erhöht (Verstegen et al., 2002).

Während im Up-Verdünner bezüglich der GM, PM und VCL (außer nach 30 minütiger Inkubationszeit, CP-Verdünner) nach dem Auftauen die besten Ergebnisse ermittelt wurden, waren die VAP- und VSL-Werte im CP-Verdünner (außer nach 60 minütiger Inkubationszeit, Up-Verdünner) am höchsten. Es kann somit keine eindeutige Aussage der Überlegenheit eines Verdünners bezüglich der Motilitätsparameter und möglicher Fertilitäten sowie über die KB getroffen werden. Lediglich eindeutig ist, dass mit dem TE-Verdünner die schlechtesten Ergebnisse ermittelt wurden, sodass dieser in der verwendeten Form als weniger bis nicht mehr geeignet zur Kryokonservierung von Rüdensperma erscheint.

5.3.2 Ergebnisse der morphologischen Beurteilung der Spermien nach Kryokonservierung

Ein Zusammenhang zwischen dem Anteil morphologisch unveränderter Spermien und der Fertilität gilt als erwiesen, da morphologisch veränderte Spermien in ihrer Beweglichkeit und Funktionsfähigkeit, d.h. der Befruchtung der Oozyte beeinträchtigt sind. Welcher Parameter, Motilität oder Morphologie, entscheidender für die Fertilität ist, bleibt - wie zuvor erwähnt - derzeit unklar (Verstegen et al., 2002; Baltissen, 2007).

Nach dem Auftauen waren bei CP-Proben die geringsten, in TE-Proben die größten Zunahmen an morphologisch veränderten Spermien nachweisbar. Signifikante Unterschiede ließen sich jedoch nur bei den Geißelveränderungen verifizieren.

Ob die Zentrifugation einen Einfluss auf den Anteil an morphologisch veränderten Spermien und auf den akrosomalen Status hat, wird kontrovers diskutiert: Während Platz und Seager (1977) sowie Schäfer-Somi et al. (2006) keine Effekte - unabhängig vom Verdünner und der Gefriermethode - postulieren, konnten Koderle et al. (2009) beim direkten Vergleich eine signifikante negative Korrelation nachweisen. Während demnach die Zentrifugation möglicherweise die Ursache für den höheren Anteil an morphologisch veränderten Spermien in Up-Proben darstellt, bleibt der Anstieg im TE-Verdünner unklar.

Für die Bindung des Spermiums an die Zona pellucida mit darauffolgender Akrosomenreaktion ist die morphologische und funktionelle Integrität des Akrosoms erforderlich, weshalb hohe Anteile an defekten Akrosomen die Fertilität beeinträchtigen (Verstegen et al., 2002). Aus diesem Grund erfolgte die Beurteilung des Akrosoms mittels Spermac®-Färbung sowohl im Nativsperma als auch im

aufgetauten Tiefgefriersperma. Wie bereits von einer Vielzahl anderer Autoren beobachtet, konnte auch in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied im akrosomalen Status beim Vergleich der Verdünnungs-Systeme festgestellt werden (Ström et al., 1997; Szász et al., 2000; Layne et al., 2008; Alhaider und Watson, 2009). Ausschließlich Peña et al. (1999) konnten direkt nach dem Auftauen im Tris-Verdünnungssystem einen höheren Anteil intakter Akrosomen nachweisen. Obwohl Peña et al. (1999) die gleichen Verdünnungssysteme verglichen wie Ström et al. (1997) mag der Unterschied in der Methodik der Akrosombeurteilung (Flow-Cytometrie und Fluoreszenzfärbung mit Carboxy-SNARF-1/PI/FITC-PSA und CFDA-PI versus Spermac®-Färbung) begründet sein. In Zusammenhang mit erhöhten Anteilen akrosomaler Verluste nach Zentrifugation verdient die Hypothese von Peña und Linde-Forsberg (2000b) besondere Beachtung; die Autoren sehen einen kausalen Zusammenhang zwischen einer höheren Spermiedichte nach Zentrifugation und einem vermehrten Nachweis von akrosomalen Reaktionen u. a. bedingt durch die Anreicherung toxischer Produkte toter Spermien und daraus resultierend einer Destabilisierung der Membran. Das Ergebnis, dass die meisten akrosomalen Verluste bei den Up-Proben beobachtet wurden, ist in diesem Zusammenhang interessant, da ebenso postuliert wird, dass ein Zusatz von 0,5 % Equex STM-Paste in Tris-Verdünnern den akrosomalen Status beim Gefrier- und Auftauprozess positiv beeinflusst (Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Peña et al., 2003b; Petrunkina et al., 2005; Martins-Bessa et al., 2006; Ponglowhapan und Chatdarong, 2008). Im Gegensatz zu dieser Untersuchung erfolgte die Akrosomenbeurteilung jedoch mittels Fluoreszenzfärbungen und nicht mittels Spermac®-Färbung (Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Martins-Bessa et al., 2006; Ponglowhapan und Chatdarong, 2008).

5.3.3 Ergebnisse bezüglich der Viabilität und des Anteils lebender/toter Spermien

In der vorliegenden Arbeit wurden signifikante Unterschiede im Anteil lebender Spermien im EosinG-Ausstrich sowie der Viabilität (SYBR14/PI) zwischen den Verdünnern ermittelt. Wie auch bereits von Martins-Bessa et al. (2006) beschrieben, war der Anteil lebender Spermien beim Up-Verdünnungssystem im Vergleich zu anderen Tris-basierenden Verdünnern am höchsten. Ein Zusammenhang zur verwendeten Zuckerkomponente konnte, wie bereits zuvor bei Yildiz et al. (2000) sowie Ceylan und Serin (2006) ausgeführt, nicht direkt verifiziert werden.

Ebenfalls wie für den Erhalt der Motilität scheint auch hier die 2-stufige Verdünnung und der Equex STM-Pasten Zusatz für den höheren Anteil lebender und vitaler Spermien im Up-Verdünner im Vergleich zu CP- und insbesondere TE-Verdüner von Bedeutung zu sein (Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Peña et al., 2003b). Diverse Autoren beschreiben bereits positive membranstabilisierende Effekte der im Up-Verdüner enthaltenen Equex STM-Paste (Rota et al., 1997; Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Peña et al., 2003a, b; Petrunkina et al., 2005; Schäfer-Somi et al., 2006), die jedoch alleine keinen Effekt auf die Plasmamembranintegrität haben (Ponglowhapan und Chatdarong, 2008; Alhaider und Watson, 2009), sodass möglicherweise ein Synergismus von Equex STM-Paste und Zentrifugation den positiven Effekt bedingt. Peña et al. (2003b) postulieren des Weiteren, dass es durch Equex STM-Paste zu einem besseren Erhalt der Funktionsfähigkeit der Ca^{2+} -Pumpen der Spermienmembran kommt, was durch Kontrolle des intrazellulären Kalziumtransportes eine Depolarisation der Zelle mit anschließendem Tod verhindert.

5.3.4 Ergebnisse nach Zusatz von Auftaumedium

Obwohl in vielen Studien zur Kryokonservierung von Rüdensperma bereits ein Auftaumedium verwendet wurde (Ström et al., 1997; Rota et al., 1998; Peña et al., 1999; Peña und Linde-Forsberg, 2000a; Peña et al., 2003b; Peter und Linde-Forsberg, 2003; Rota und Mollo, 2005; Hermansson und Linde-Forsberg, 2006; Martins-Bessa et al., 2006, 2007; Michael et al., 2007; Yamashiro et al., 2007; Layne et al., 2008; Ponglowhapan und Chatdarong, 2008), liegen nur einzelne Untersuchungen über die Effekte des Zusatzes vor (Peña und Linde-Forsberg, 2000b; Peña et al., 2003a; Schäfer-Somi et al., 2006).

Unabhängig von der Art des Auftaumediums und dessen Zusatzstoffen (Antibiotika, verschiedene Zuckerzusätze) werden die Versuchsergebnisse durch dessen Verwendung zusätzlich beeinflusst (Peña und Linde-Forsberg, 2000b; Schäfer-Somi et al., 2006), was den Vergleich der Ergebnisse weiter erschwert. Das verwendete Verdünnermedium UpA stellt durch die enthaltenen Substanzen, Fruktose, Zitronensäure sowie Tris, zusätzliche metabolisierbare Substanzen und Pufferkapazität bereit, was eine Beeinflussung der Spermaqualität bedingen kann. Zudem kommt es nach Zusatz eines glycerinfreien Auftaumediums zu einem schnellen Glycerinausstrom aus den Zellen, da diese möglichst schnell ein Equilibrium beider Seiten anstreben. Die Zellen werden dadurch, noch zusätzlich zu den beim Auftauprozess stattfindenden Volumenveränderungen, weiterem

osmotischen Stress ausgesetzt, was in einem osmotischen Schock aufgrund einer abrupten Glycerinreduktion resultieren kann (Hammerstedt et al., 1990; Peña und Linde-Forsberg, 2000b).

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen sehr unterschiedlichen Effekte auf die drei untersuchten Verdünner sind sicherlich zumindest teilweise durch die Verdünnung toxischer Effekte von Glycerin, Eidotter und Equex STM-Paste erklärbar (Peña und Linde-Forsberg, 2000b). Im Gegensatz zu Peña und Linde-Forsberg (2000b), aber in Übereinstimmung mit Schäfer-Somi et al. (2006), zeigten sich in der vorliegenden Arbeit signifikante Unterschiede bezüglich der Viabilität bei Verdünnerproben mit und ohne Zusatz von Auftaumedium. Eine verbesserte Viabilität durch UpA-Zugabe konnte bei Up- und CP-Proben, jedoch nur direkt nach dem Auftauen bei TE-Proben nachgewiesen werden. Beim TE-Verdünner bedingte die Zugabe von UpA sowohl subjektiv als auch mittels CASA eine verbesserte GM und PM. Dieser Effekt war im Up-Verdünner hingegen nur subjektiv zu beobachten. Diese Ergebnisse könnten möglicherweise auf Defizite in der Zusammensetzung der Verdünnermedien hindeuten. Interessanterweise ergab sich für alle Verdünner eine signifikante Verbesserung der Strecken- und Geschwindigkeitsparameter (DAP-, DSL-, DCL-, VAP-, VSL- und VCL-Werte) bei fast allen Proben. In Übereinstimmung mit Peña und Linde-Forsberg (2000b) konnte durch die Verwendung von UpA, in einem Verdünnungsverhältnis von 1:1 und innerhalb einer Inkubationszeit von 60 Minuten nur tendenziell eine Verbesserung der Motilität beobachtet werden, erst nach längerer Inkubation (5, 6 und 7 Stunden) stieg die PM signifikant an (Peña und Linde-Forsberg, 2000b).

5.3.5 Diskussion des Sonderfalls

Der untersuchte Sonderfall zeigte zu allen drei untersuchten Entnahmezeitpunkten Blutbeimengungen im Ejakulat. Als Ursache für Hämospermie kommen Prostataerkrankungen, wie die benigne Prostatahyperplasie (BPH) als eine der häufigsten altersbedingten Erkrankungen beim intakten Rüden sowie Prostatitis und das Platzen von Blutgefäßen am Penis in Frage (England und Allen, 1992; Johnston et al., 2000; Gradil et al., 2006; Memon, 2007; Smith, 2008). Häufig handelt es sich um eine Mischung aus Blut, entzündlichem Exsudat, Immunglobulinen und anderen Proteinen (England und Allen, 1992). Diese Bedingungen führen möglicherweise zu einer Reduktion der Motilität (England und Allen, 1992; Johnston et al., 2000; Möller

et al., 2005). Beim Sonderfall konnte sonographisch eine BPH mit intraprostatistischen Zysten und eine chronische Prostatitis dargestellt werden. Über die Auswirkungen einer BPH und chronischen Prostatitis auf die Spermaqualität bei Spermakonservierung ist bislang nur wenig bekannt. Es können daher nur Vergleiche mit Veröffentlichungen, die reine Blutzusätze verwenden, herangezogen werden.

Die in dieser Dissertationsarbeit verwendete Einstellung für die Spermienerkennung von (20 - 60 μm^2 , Minitüb, Tiefenbach), die sich im Vorfeld als geeignet erwiesen hatte, besonders wenige Fremdpartikel, wie z. B. Eidotter, fälschlicherweise als Spermien zu erkennen, erwies sich bei den Ejakulaten des Sonderfalls dennoch als problematisch. Obwohl Erythrozyten einen geringeren Durchmesser (7,5 μm) aufweisen, wurden diese vom CASA häufig als immotile Spermien identifiziert, was eine negative Beeinflussung der Messergebnisse wahrscheinlich macht. Weiterhin kommt es aufgrund einer vermehrten Agglomeration von Spermien um Erythrozyten zu einem Anstieg der Ortsbeweglichkeit zu Ungunsten der PM (Möller et al., 2005). Im Gegensatz zu equinem Sperma war dieser Effekt auf die Motilität beim Hund erst bei höheren Erythrozyten-Konzentrationen und nach 4 stündiger Inkubationszeit (37°C) nachweisbar (England und Allen, 1992). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von England und Allen (1992) konnten keine deutlichen Unterschiede im Anteil lebender Spermien und morphologisch abweichender Spermien nach Eosin-Nigrosin-Färbung sowie im HOS-Test verglichen mit Proben ohne Blutbeimengungen nachgewiesen werden.

Nach vollständiger Aufarbeitung zeigte sich bei den unterschiedlichen Motilitäts-Parametern kein Verdünner deutlich überlegen. Rijsselaere et al. (2004) konnten auch nach 96 stündiger Lagerung (4°C) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Motilität (Subj. GM, PM) zwischen Proben mit 0, 1, 2, 4 oder 10 % Blutzusatz nachweisen.

Durch den Gefrier- und Auftauprozess kommt es zur Hämolyse von $58,3 \pm 11,6$ % der Erythrozyten, was zu einer Freisetzung von Hämoglobin und vermutlich daraus resultierender reaktiver Sauerstoffspezies führt (Rijsselaere et al., 2004). Trotz der zu erwartenden Verschlechterung der Motilität wurde hingegen in Einzelfällen eine Verbesserung der Motilitätsparameter beobachtet. Die bereits zuvor diskutierte Problematik des Erkennens von Erythrozyten als immotile Spermien die demzufolge nach dem Auftauen nicht mehr gemessen werden können, führte gleichermaßen zu

einer scheinbaren Verbesserung der Messwerte. Inwieweit tatsächlich indirekte Unterschiede diese Ergebnisse mehr beeinflusst haben als die Blut- und Seminalplasmabeimengungen, bedürfen weiterführender Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv.

Nach dem Tiefgefrier- und Auftauprozess wurden die geringsten Verluste der GM im TE-Verdünner und für die PM im Up-Verdünner nachgewiesen. In der Literatur gibt es bisher keine vergleichende Untersuchung zu den Auswirkungen verschiedener Verdünner-Systeme bei der Kryokonservierung von caninem Sperma mit Hämospermie, chronischer Prostatitis und BPH. Rijsselaere et al. (2004) untersuchten jedoch verschiedene Blutkonzentrationen in einem zweiphasigen Tris-Verdünner mit Equex STM-Paste bei der Kryokonservierung von caninem Sperma und konnten bei Blutzusätzen von mehr als 4 % (v/v) eine negative Beeinflussung der Motilitätsparameter, der Membranintegrität und des akrosomalen Status beobachten. Auch in dieser Studie konnten bei einem Großteil der GM- und PM-Werte (CASA, Subj.), jedoch nicht bei den einzelnen Motilitätsparametern, schlechtere Ergebnisse in Proben mit Blutbeimengungen festgestellt werden. Übereinstimmend wurden auch bei allen getesteten Verdünnern des Sonderfalls höhere Anteile morphologisch veränderter Spermienzellen und mehr Kappenverluste beobachtet. Hingegen war bezüglich der Viabilitätsverluste und im Anteil lebender Spermien beim Sonderfall keine generelle Verschlechterung zu erkennen.

Der Zusatz von UpA hat keinen deutlich positiven Effekt auf GM, PM und Viabilität; beim Up- und CP-Verdünner wurden sogar teilweise Verschlechterungen der GM- und PM-Werte beobachtet. Die Frage, ob dies auf die Blutbeimengungen oder eher individuelle Unterschiede zurückzuführen ist, bedarf erneut weiterführender Untersuchungen, zumal in der Literatur über eine unterschiedliche Gefriertauglichkeit von Spermien verschiedener Rüden, resultierend aus Unterschieden in der Spermienmembran, berichtet wird (England, 1993; Gröppler, 2004; Peña et al., 2006; Alhaider und Watson, 2009).

6 Schlussbetrachtung

Zur objektiveren Beurteilung der Versuchsergebnisse wurde neben der üblichen subjektiven Untersuchungsmethoden ein computergestütztes CASA-System SpermVision® verwendet, wobei die Ergebnisse jedoch bezüglich der Motilitäts- und Viabilitätsanalyse nicht die erwarteten Korrelationen zu den geschätzten Parametern zeigten. Eine weitere Optimierung der Software für canines Sperma erscheint daher sinnvoll, um in Zukunft objektivere und vergleichbarere Ergebnisse zu erzielen.

Obwohl mit dem TE-Verdünner eine einfache und schnelle Aufarbeitung der Spermaproben möglich war (vollständige Verdünnerzugabe in zwei aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten mit nachfolgender Equilibrierung), kann er aufgrund der signifikant schlechteren Spermaqualität nach dem Auftauen nicht länger empfohlen werden. Die etwas aufwendigeren zweiphasigen Verdünner Up und CP, welche zentrifugiert (Up) bzw. einer zweiten Equilibrierungsphase (CP) unterzogen werden mussten, lieferten wesentlich bessere Spermaqualitäten nach dem Auftauen. Zur Beurteilung der Tauglichkeit im täglichen Praxisalltag muss dazu berücksichtigt werden, dass beim Up-Verdünner neben einer Zentrifuge diverse Instrumente und Verdünnerinhaltsstoffe zur Herstellung des Verdünners erforderlich sind. Die oben angegebenen, mit erhöhten Anschaffungskosten verbundenen Geräte, Instrumente sowie notwendigen Inhaltsstoffe rechnen sich daher vermutlich nur bei häufiger Kryokonservierung von Rüdensperma. Der CP-Verdünner hingegen benötigt nur den Zusatz von Eidotter, was mit minimalem technischen Aufwand und deutlich geringeren Kosten verbunden ist. Im Gegensatz zu den selbsthergestellten Verdünnern Up und TE sind jedoch die Anschaffungskosten des kommerziellen CP-Verdünners zu berücksichtigen.

Hinsichtlich der verschiedenen Einzelmotilitätsparameter des CASA zeigten jeweils CP- oder Up-Verdünner nach dem Auftauen ihre Überlegenheit. Da bisher noch nicht abschließend geklärt wurde, welche CASA-Parameter zur Prognostizierung der Fertilität und Befruchtungsfähigkeit bzw. des Kryokonservierungserfolges klinisch relevant sind (Verstegen et al., 2002) bleibt die Frage offen, welcher der beiden Verdünner überlegen ist.

Die geringsten morphologischen Veränderungen (Eosin-Präparat, Spermac®-Färbung) durch den Tiefgefrierungsprozess konnten im CP-Verdünner festgestellt werden. Dagegen war im Up-Verdünner die Viabilität besser und es konnten höhere Anteile lebender Spermien im Eosin-Präparat nach dem Auftauen ermittelt werden.

Mit dem Zusatz von Auftaumedium UpA konnten abhängig vom Verdünner die Motilität, die CASA-Motilitätsparameter und die Viabilität unterschiedlich stark verbessert werden. Im Up-Verdünner waren auch nach UpA-Zugabe die höchsten Motilitäten (GM, PM), Strecken- und Geschwindigkeitsparameter sowie höchsten Viabilitäten feststellbar. Die geringsten positiven Effekte auf die Motilität bzw. Parameter konnten im CP-Verdünner, bei der Viabilität hingegen im TE-Verdünner, ermittelt werden. Ein Zusatz von UpA kann demnach insbesondere bei Up zur Verbesserung der Spermaqualität empfohlen werden.

Auch im untersuchten Sonderfall mit Blutbeimengung im Ejakulat konnten im CP- und Up-Verdünner bessere Ergebnisse erzielt werden als im TE-Verdünner. Die Verdünner verhielten sich beim Sonderfall vergleichbar der Proben ohne Blutbeimengungen, jedoch ergab sich durch Zusatz von UpA kein deutlicher Effekt auf Motilität und Viabilität. Da es sich hierbei aber nur um eine Einzelbetrachtung handelt, sind weitere Untersuchungen mit größeren Probenzahlen nötig, um optimale Kryokonservierungsprotokolle bei Hämospermie infolge von BPH zu entwickeln.

7 Offene Fragestellungen

Es stellt sich die Frage, ob eine verbesserte Motilitätsanalyse durch eine Kombination von SYBR14/PI Färbung der Spermien und einer parallelen Motilitätsmessung unter Zuhilfenahme des Fluoreszenzmikroskopes die Genauigkeit der Motilitätsergebnisse verbessert hätte, da Fehlmessungen durch Fremdpartikel minimiert würden. Klärungsbedarf besteht ebenfalls zum Thema: Korrelation des lebend-tot-Anteils zwischen subjektiv ausgewerteten EosinG- und mittels CASA gemessenen SYBR14/PI Präparaten, da hierzu bislang keine Veröffentlichungen vorliegen.

Da nicht abschließend geklärt werden konnte, welche Parameter entscheidender bei der Beurteilung der Gefriertauglichkeit verschiedener Verdünner bei Rüdensperma sind und nicht bekannt ist, inwieweit lebensfähige nicht-motile Spermien im weiblichen Genitaltrakt nach KB motil und fertil werden können (Ponglowhapan und Chatdarong, 2008), bleibt die Frage zu klären, wie sich diese Verdünner in vivo bzw. in vitro verhalten. Zur weiteren Klärung der Gefriertauglichkeit der Verdünner mit und ohne UpA-Zusatz wären die Trächtigkeitsraten nach KB bzw. die Befruchtungsraten nach einem Zona-pellucida-Bindungs-Assay ein möglicher Ansatz.

Die Auswirkungen von BPH, Prostatazysten und chronischer Prostatitis auf die Spermaqualität von nativem und konserviertem Sperma bedarf weiterführender Untersuchungen an einem größeren Patientenkollektiv. Ebenso muß untersucht werden inwieweit in diesem Zusammenhang eine Dichtegradientenzentrifugation nach Phillips et al. (2008) zur Trennung nicht-motiler roter Erythrozyten und motiler Spermien positive Auswirkungen auf die Spermaqualität nach Kryokonservierung haben könnte.

8 Zusammenfassung

Untersuchungen zur Optimierung der Kryokonservierung caniner Spermien unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Verdünner

Die Kryokonservierung von Rüdensperma gewinnt durch den stetig steigenden Einsatz der künstlichen Besamung zunehmend an Bedeutung. Zahlreiche kommerzielle und nicht-kommerzielle Verdünner-Systeme sind bereits beschrieben und verfügbar. Ziel dieser Studie war es, drei verschiedene Verdünner, zwei selbst hergestellte Tris-Eidotter-Verdünner (TE und Uppsala Equex System 2, Up, nach Linde-Forsberg, 2001) sowie den kommerziellen CaniPRO™ Freeze A&B Verdünner (CP), bezüglich ihrer Eignung für die Kryokonservierung von caninem Sperma sowie für den Einsatz im täglichen Kliniks-Alltag zu untersuchen. Des Weiteren wurde der Zusatz eines Auftaumediums (UpA, Auftaumedium des Uppsala Equex Systems 2 nach Linde-Forsberg, 2001) zur Verbesserung der Spermaqualität untersucht. Mittels digitaler Manipulation wurden 30 Ejakulate fraktioniert von zehn gesunden Rüden verschiedener, großer Rassen sowie 3 Ejakulate von einem Rüden (Sonderfall) mit benigner Prostatahyperplasie, Prostatazysten und chronischer Prostatitis gewonnen. Unmittelbar an die Gewinnung wurde die spermienreiche Fraktion makroskopisch (Volumen, Farbe, Geruch, Konsistenz, Beimengungen), chemisch-physikalisch (pH-Wert) und mikroskopisch untersucht. Die mikroskopische Untersuchung schloss eine Dichtebestimmung mittels SpermaCue® zur Berechnung der Gesamtspermienzahl und eine subjektive Beurteilung von Gesamt- (GM) und Progressivmotilität (PM), Lebend-Tot-Anteil, Anteil morphologisch veränderter Spermien (Eosin-Ausstrich), akrosomalem Status (Spermac®-Färbung) und Membranintegrität (HOS-Test) ein. Ergänzend wurde eine computerassistierte (CASA) Motilitäts- (GM_{CASA}, PM_{CASA}) und Viabilitätsanalyse (SYBR14/PI) mittels SpermVision® (Minitüb) durchgeführt. Die spermienreiche Fraktion wurde in drei Aliquots aufgeteilt und mit einem der drei Verdünner (TE, UP, CP) aufgearbeitet und nach entsprechender Equilibrierung bei 4°C in Midipailletten eingefroren. Unmittelbar vor dem Einfrieren erfolgte eine erneute Untersuchung eines Aliquots, um die Unterschiede zwischen Nativsperma und vollständig aufgearbeitetem Sperma vor Kryokonservierung festzuhalten. Weitere Untersuchungen wurden direkt nach dem Auftauen (60 Sekunden, 37°C) sowie nach 10, 30 und 60 Minuten durchgeführt. Zudem wurde unmittelbar nach dem Auftauen ein Aliquot 1:1 mit Auftaumedium versetzt und ebenso untersucht.

Im Nativsperma wurden folgende Befunde erhoben: Gesamtspermienzahl $894,8 \pm 150,3$ Mio., PM $80,0 \pm 4,8$ %, GM_{CASA} $78,2 \pm 7,9$ %, PM_{CASA} $70,6$ % (+ 8,0; - 8,7); Lebend-Tot-Anteil $87,7 \pm 2,8$ %, Viabilität $85,9 \pm 5,7$ %, morphologisch veränderte Spermien $11,7 \pm 4,6$ %, Kappenverluste $0,1$ % (+ 0,3; 0), nicht aufgerollte Geißel im HOST $4,7 \pm 0,1$ %.

Nach vollständiger Aufarbeitung, jedoch vor Kryokonservierung war in mit CP-aufgearbeiteten Proben die geringste Beeinflussung der Motilitätsparameter, in mit TE-aufgearbeiteten Proben die größte Beeinflussung nachweisbar. Nach der Kryokonservierung war die Motilität in Up-Proben am höchsten (GM $60,5 \pm 7,0$ %, PM $50,5 \pm 13,4$ %, GM_{CASA} $50,1 \pm 13,9$ %, PM_{CASA} $37,0$ % (+ 13,8; - 12,8)) verglichen mit CP-verdünnten Ejakulaten (GM $49,8 \pm 12,6$ %, PM $41,7 \pm 15,2$ %, GM_{CASA} $28,9 \pm 10$ %, PM_{CASA} $17,2$ % (+ 10,8; - 8,6)) und TE-aufgearbeiteten Proben (GM $32,0 \pm 13,3$ %, PM $20,4 \pm 13,4$ %, GM_{CASA} $21,8 \pm 5,7$ %, PM_{CASA} $10,2$ % (+ 6,7; - 5,2)). Die Geschwindigkeits- und Streckenparameter (VSL $48,5 \pm 8,2$; VCL $93,5 \pm 11,6$; VAP $58,0 \pm 8,7$; DSL $20,5 \pm 3,4$; DCL $39,8 \pm 4,7$; DAP $24,5 \pm 3,6$) waren jedoch in CP-Proben am höchsten. Der mittlere Anteil morphologisch veränderter Spermien lag bei $17,2 \pm 8,7$ % (Up), $14,1 \pm 8,4$ % (CP) und $19,8 \pm 9,6$ % (TE).

Während der Inkubation bei 37°C waren die Viabilitätsverluste und die Abnahme des Anteils lebender Spermien in mit Up-versetzten Proben am geringsten.

Der Zusatz von Auftaumedium führte insbesondere zu einer subjektiven Verbesserung der Motilität, zu höheren Strecken- und Geschwindigkeitsparametern sowie zu einer erhöhten Viabilität (CP, Up).

Anhand der vorliegenden Ergebnisse konnte eine deutliche Überlegenheit der zweiphasigen Up- und CP- Verdünner im Vergleich zum einphasigen TE-Verdünner gezeigt werden, was ihren Einsatz im Klinik-Alltag bei nur geringgradig höherem Zeitaufwand rechtfertigt. Während nach dem Auftauen GM und PM beim Up-Verdünner am höchsten waren, zeichnete sich der CP-Verdünner durch die höchsten Geschwindigkeits- und Streckenparameter sowie den geringsten Anteil an morphologisch veränderten Spermien aus. Welcher dieser Untersuchungsparameter einen entscheidenderen Einfluss auf die Fertilität hat, bedarf weiterer in vivo bzw. in vitro Untersuchungen.

9 Summary

Investigations for optimising cryopreservation of canine spermatozoa with special reference to different extenders

The importance of cryopreservation of canine semen has steadily increased by an increased demand for artificial insemination. Various commercial and non-commercial extenders are available. The aim of the present study was to compare three different semen extenders, two self-made tris-egg yolk extenders (TE and Uppsala Equex System 2, Up, according to Linde-Forsberg, 2001) and the commercially available CaniPRO™ Freeze A&B extender (CP) for cryopreservation of canine semen and their use in every day practice. Furthermore, the use of a thawing medium (Up A, thawing medium of the Uppsala Equex System 2 according to Linde-Forsberg, 2001) was evaluated for improvement of post-thaw semen quality. Thirty ejaculates from 10 healthy, large breed stud dogs as well as 3 ejaculates from a dog with benign hyperplasia of the prostate, prostatic cysts and chronic prostatitis (special case) were collected fractionatedly by digital manipulation. Immediately after collection, the sperm rich fraction was evaluated macroscopically (volume, colour, odour, consistency, additives), chemical-physically (pH) and microscopically. Microscopical examination included determination of sperm concentration using SpermaCue® for calculation of the total sperm count and a subjective evaluation of total (GM) and progressive motility (PM), live/dead ratio and pathomorphology (eosine smear) including acrosomal structure (Spermac® stain) and membrane integrity (HOS test). In addition, total (GM_{CASA}) and progressive motility (PM_{CASA}) as well as viability (SYBR/PI) were evaluated using the casa system SpermVision (Minitüb, Germany). The sperm rich fraction was divided into three equal aliquots, diluted with one of the respective extenders (TE, CP, Up) and finally frozen in straws after equilibration at 4°C. An examination of an aliquot was performed immediately before freezing to evaluate changes between native and chilled semen. Additional examinations were done immediately after thawing (60 seconds, 37°C) as well as 10, 30 and 60 minutes later. One aliquot of the frozen-thawed sample was mixed with a thawing medium at 1:1 ratio and processed as described before.

In native semen, the following results were obtained: total sperm count 894.8 ± 150.3 Mio., PM 80.0 ± 4.8 %, GM_{CASA} 78.2 ± 7.9 %, PM_{CASA} 70.6 % (+ 8.0; - 8.7), % living sperm 87.7 ± 2.8 %, viability 85.9 ± 5.7 %, morphologically abnormal sperm 11.7 ± 4.6 %, acrosomal loss 0.1 % (+ 0.3; 0), HOST: not curled 4.7 ± 0.1 %. After

extending but before freezing, lowest influence on motility was observed in CP-samples and biggest in TE-samples. Following cryopreservation, motility in Up-samples was highest (GM 60.5 ± 7.0 %, PM 50.5 ± 13.4 %, GM_{CASA} 50.1 ± 13.9 %, PM_{CASA} 37.0 % (+ 13.8; - 12.8)) compared to CP-samples (GM 49.8 ± 12.6 %, PM 41.7 ± 15.2 %, GM_{CASA} 28.9 ± 10 %, PM_{CASA} 17.2 % (+ 10.8; - 8.6)) and TE-samples (GM 32.0 ± 13.3 %, PM 20.4 ± 13.4 %, GM_{CASA} 21.8 ± 5.7 %, PM_{CASA} 10.2 % (+ 6.7; - 5.2)). However, speed and distance parameters (VSL 48.5 ± 8.2 ; VCL 93.5 ± 11.6 ; VAP 58.0 ± 8.7 ; DSL 20.5 ± 3.4 ; DCL 39.8 ± 4.7 ; DAP 24.5 ± 3.6), were highest in CP-samples. In mean, 17.2 ± 8.7 % (Up), 14.1 ± 8.4 % (CP) and 19.8 ± 9.6 % (TE) morphologically abnormal sperm were detected. During incubation at 37°C, the reduction of viability and % of living spermatozoa was lowest in Up-samples compared to the other extenders. The addition of the thawing medium UpA resulted mainly in a subjective improvement of the motility, higher speed and distance parameters and increased viability (CP, Up).

This study shows that the two-phase Up and CP extenders are significantly better for cryoconservation than the one-phase TE extender that justifies their use during daily practice with an only slightly higher expenditure of time. While motility (GM and PM) after thawing was highest in the Up-samples, the CP-extender was characterised by highest speed and distance parameters as well as the lowest percentage of morphologically abnormal sperm. However, which of these parameters has the highest impact on fertility needs further in vivo and in vitro investigations, respectively.

10 Anhang

10.1 Rezepte

10.1.1 Rezepte der Verdünner

Modifizierter Up-Verdünner nach Linde-Forsberg (2001)		TE-Verdünner	CP-Verdünner⁴ (Beipackzettel)
selbst hergestellt		selbst hergestellt	kommerziell
Verdünnermedium 1	Verdünnermedium 2		Verdünner A und B
Aqua dest. (ad 77 ml)	Aqua dest. (ad 72 ml)	Aqua dest. (ad 100 ml)	Wasser
Zitronensäure ⁵ (1,7 g)	Zitronensäure (1,7 g)	Zitronensäure (1,78 g)	Natriumcitrat
Tris ⁶ (3,025 g)	Tris (3,025 g)	Tris (3,028 g)	Tris
Fruktose ⁷ (1,25 g)	Fruktose (1,25 g)	Fruktose (1,25 g)	Glukose
Eigelb (20 ml)	Eigelb (20 ml)	Eigelb (20 ml)	20 % Eigelb in A + B
Glycerin ⁸ (3 ml)	Glycerin (7 ml)	Glycerin (6,38 %)	Glycerin (nur in Phase B)
	Equex STM-Paste ⁹ (1 ml)		Herstellereigene Zusätze

Auftaumedium des Uppsala Equex 2 System nach Linde-Forsberg (2001):

- Zitronensäure (1,7 g)
- Fruktose (1,25 g)
- Tris (3,025 g)
- Wasser (ad 100 ml)

⁴ CaniPRO™ Freeze A&B Verdünner 13574/0060, Fa. Minitüb, Tiefenbach

⁵ Citronensäure-Monohydrat, Fa. Merck, Darmstadt

⁶ Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Fa. Merck, Darmstadt

⁷ D(-)Fructose, Min. 99%, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

⁸ Glycerol ReagentPlus™, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

⁹ Fa. Nova Chemical Sales Inc., Scituate, USA

10.1.2 Rezepte diverser Gebrauchslösungen

10.1.2.1 2 %ige EosinG Färbelösung:

- 2 g EosinG (Fa. Merck, Darmstadt)
- 3 g Natriumcitrat (Fa. Merck, Darmstadt)
- ad. 100 ml Aqua dest.

10.1.2.2 Hypoosmotische Lösung (150 mosmol)

- 0,735 g Natriumcitrat (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- 1,351 g Fructose (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- ad 100 ml Aqua dest.

Die Lösung wird in 1,2 ml Eppendorf-Gefäße zu je 100 µl portioniert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

10.1.2.3 LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (L-7011)

(Herstellung nach Gebrauchsanweisung von Minitüb)

- 120 µl Androhep® Plus Verdünner
- 5 µl SYBR® 14 (enthält 100 µl einer 1 mM Lösung in DMSO)
- 125 µl Propidiumjodid (PI) (enthält 5 ml einer 2,4 mM Lösung in Wasser)

Die einzelnen Komponenten werden nacheinander in ein lichtundurchlässiges braungefärbtes Eppendorfgefäße (0,5 ml Tubes, Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert. Nach einem Durchmischen werden jeweils 2,5 µl der Mischung in braune Eppendorfgefäße pipettiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

10.2 Herstellung der Verdünner

10.2.1 Tris-Eidotter-Vorverdünner

Die Komponenten Tris, Fructose und Zitronensäure wurden in sterilen Bechergläsern auf einer Laborwaage Mettler PJ300 (Fa. Mettler-Toledo, Giessen) abgewogen und in bidestilliertem Wasser gelöst. Das benötigte Eigelb wurde aus handelsüblichen frischen Eiern gewonnen. Nach dem Aufschlagen des Eies wurde das Eigelb sorgfältig vom Eiweiß getrennt. Verbleibendes Eiweiß wurde durch ein vorsichtiges Abrollen des Eidotters auf einem Filterpapier (Faltenfilter, Durchmesser 185 mm,

595 ½ Fa. Schleicher und Schuell Micro Science GmbH) entfernt. Der Eidotter wurde mit einer Kanüle (Kanüle Sterican®, 1,20*40 mm, Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen) angestochen und der Inhalt konnte nun mit einer Spritze (Spritze Injekt®-F, 20 ml, Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen) aufgezogen werden. Die benötigte Eidottermenge wurde zu der bereits hergestellten Stammlösung gegeben und mit Hilfe eines Magnetrührers (Heidolph MR 2000 Vertrieb MAGV GmbH, Rabenau-Londorf) gleichmäßig verrührt. Der hergestellte Verdünner wurde zu je ca. 3 ml in Spritzen (Spritze Injekt®-F, 5 ml, Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen) abgefüllt. Er wurde bis zur Verwendung bei -18°C eingefroren. Eine Glycerinzugabe erfolgte erst während der Spermaverarbeitung.

10.2.2 Modifizierter Uppsala-Verdünner nach Linde-Forsberg (2001)

Wie bereits beim TE-Verdünner beschrieben wurden die einzelnen Komponenten abgewogen und in Wasser (Aqua dest.) gelöst. Das Eigelb wurde auf die gleiche Weise wie beim TE-Verdünner beschrieben gewonnen. Glycerin und Equex STM-Paste wurden den jeweiligen Verdünnern in entsprechender Menge zugegeben. Die von Linde-Forsberg (2001) verwendeten Antibiotikazusätze wurden nicht zum Verdünnermedium zugegeben. Der hergestellte Verdünner wurde wie bereits beschrieben abgefüllt und eingefroren.

10.2.3 CaniPRO™ Freeze A&B Verdünner

Der CP-Verdünner wird nur noch mit dem benötigten Eigelb versetzt. Die Menge ist dem Beipackzettel zu entnehmen. Er wurde ebenfalls portioniert eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.

10.3 Färbeverfahren

10.3.1 Spermac® Färbung

Zunächst wird ein Ausstrich der Spermprobe auf einem Objektträger angefertigt und dieser maximal fünf Minuten luftgetrocknet. Danach wird dieser für 5 - 10 Minuten in einer Fixierlösung eingetaucht und erneut luftgetrocknet. Anschließend wird für zwei Minuten mit Reagenz A dann je eine Minute mit Reagenz B und C gefärbt. Zwischen

den einzelnen Schritten wird der Objektträger mehrfach in Aqua dest. gewaschen (Fa. Zellkulturbedarf GmbH, Berlin).

10.4 Ergebnistabellen

Tab. A1: Durchschnittliche Abnahme der einzelnen Motilitätsparameter des SpermVision® bei unverdünnten, mit Auftaumedium (UpA) und Verdünnermedium 1 (Up1) versetzten Proben nach dem Auftauen im Vergleich zum Nativsperma, angegeben mit arithmetischem Mittelwert (\bar{x}) und Standardabweichung (SD)

Motilitätsparameter	Zeit (Minuten)	TE-Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)		Up-Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)			CP-Verdünner ($\bar{x} \pm SD$)	
		unverdünnt	mit UpA	unverdünnt	mit UpA	mit Up1	unverdünnt	mit UpA
DAP	0	-4,9 ± 3,8	-0,4 ± 4,6	-4,1 ± 3,7	-1,0 ± 3,8	-2,8 ± 3,6	-3,5 ± 4,3	-6,8 ± 3,6
	10	-5,2 ± 3,0	-2,5 ± 3,9	-4,1 ± 2,7	-0,4 ± 3,2	-3,1 ± 3,6	-3,1 ± 3,9	-2,9 ± 4,3
	30	-10,3 ± 3,1	-7,9 ± 3,9	-6,9 ± 2,6	-2,7 ± 3,9	-5,9 ± 2,9	-6,7 ± 3,2	-4,2 ± 3,9
	60	-13,8 ± 2,7	-12,8 ± 5,2	-10,0 ± 3,6	-5,7 ± 3,7	-9,0 ± 3,7	-11,5 ± 2,3	-10,8 ± 3,9
DCL	0	-18,4 ± 5,0	-7,7 ± 5,7	-13,9 ± 6,8	-6,6 ± 6,2	-12,1 ± 5,7	-14,2 ± 6,8	-12,8 ± 6,2
	10	-17,6 ± 4,8	-7,8 ± 7,3	-13,0 ± 5,3	-5,6 ± 6,7	-11,7 ± 6,0	-14,8 ± 5,5	-8,2 ± 6,5
	30	-25,1 ± 9,2	-12,5 ± 8,5	-16,5 ± 6,8	-5,3 ± 9,5	-14,2 ± 6,2	-14,5 ± 7,3	-4,7 ± 7,3
	60	-33,9 ± 6,9	-26,1 ± 15,8	-23,5 ± 6,7	-10,8 ± 8,2	-21,5 ± 7,4	-26,2 ± 8,8	-21,5 ± 9,8
DSL	0	-0,3 ± 3,9	3,3 ± 5,0	-2,0 ± 2,9	0,9 ± 3,3	-0,3 ± 3,2	-0,03 ± 3,3	-4,3 ± 3,0
	10	-0,9 ± 3,1	1,1 ± 4,3	-2,2 ± 2,4	2,2 ± 3,2	-0,7 ± 2,9	0,4 ± 3,3	0,03 ± 3,4
	30	-5,7 ± 2,2	-4,9 ± 3,0	-4,7 ± 2,1	-0,8 ± 3,0	-3,3 ± 2,4	-3,8 ± 2,2	-1,6 ± 3,4
	60	-8,2 ± 2,6	-8,5 ± 3,6	-6,7 ± 3,1	-3,3 ± 3,3	-5,5 ± 3,4	-7,3 ± 2,0	-7,0 ± 4,2
VAP	0	-11,0 ± 9,3	-1,8 ± 12,0	-6,6 ± 9,60	-0,9 ± 9,8	-5,4 ± 9,5	-6,3 ± 11,1	-16,2 ± 9,4
	10	-11,5 ± 7,9	-6,8 ± 10,3	-7,0 ± 7,4	0,4 ± 8,4	-5,8 ± 9,6	-5,3 ± 10,7	-7,2 ± 11,2
	30	-22,0 ± 6,2	-17,9 ± 9,2	-13,1 ± 6,1	-4,5 ± 9,2	-11,7 ± 6,9	-12,8 ± 8,3	-9,1 ± 10,1
	60	-27,6 ± 5,2	-26,7 ± 11,3	-19,6 ± 8,7	-11,2 ± 8,7	-17,9 ± 8,9	-23,1 ± 4,8	-22,0 ± 11,2
VCL	0	-41,7 ± 12,8	-19,3 ± 15,0	-27,3 ± 17,7	-12,8 ± 16,2	-26,0 ± 15,5	-29,8 ± 17,4	-30,9 ± 15,8
	10	-39,9 ± 12,2	-20,1 ± 16,8	-25,7 ± 13,8	-10,5 ± 16,5	-24,5 ± 16,4	-30,8 ± 15,3	-20,0 ± 17,8
	30	-55,9 ± 19,7	-29,5 ± 19,5	-33,3 ± 15,6	-9,4 ± 21,7	-30,0 ± 14,5	-29,4 ± 17,6	-11,0 ± 17,7
	60	-73,0 ± 13,1	-57,1 ± 33,1	-49,2 ± 15,2	-22,4 ± 17,2	-45,3 ± 17,2	-56,1 ± 18,3	-45,6 ± 21,4
VSL	0	-0,6 ± 9,0	6,9 ± 12,1	-2,3 ± 6,9	3,2 ± 7,9	0,1 ± 7,6	1,4 ± 8,2	-10,2 ± 7,4
	10	-1,8 ± 7,7	1,7 ± 10,5	-3,0 ± 6,0	3,5 ± 7,5	-0,3 ± 7,4	2,5 ± 8,7	-0,3 ± 8,8
	30	-11,5 ± 3,7	-11,0 ± 6,7	-8,4 ± 4,5	-0,5 ± 6,8	-6,0 ± 5,4	-6,7 ± 5,3	-3,3 ± 8,3
	60	-15,4 ± 5,3	-16,7 ± 7,9	-12,6 ± 7,4	-6,1 ± 7,7	-10,2 ± 7,8	-13,9 ± 3,8	-13,6 ± 11,1
STR	0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± <0,1	<0,1 ± <0,1
	10	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	30	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	60	0,1 ± <0,1	<0,1 ± 0,1	<0,1 ± <0,1	<0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1
LIN	0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1
	10	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	30	0,2 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1
	60	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
WOB	0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± <0,1	<0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1
	10	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1
	30	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1
	60	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	<0,1 ± 0,1

BCF	0	3,1 ± 4,2	5,3 ± 3,5	-1,3 ± 2,8	-0,1 ± 2,2	-0,4 ± 2,8	1,2 ± 3,2	1,0 ± 1,7
	10	2,4 ± 4,6	3,4 ± 2,7	-1,6 ± 2,6	-0,5 ± 2,2	-0,5 ± 2,6	1,8 ± 2,8	0,9 ± 2,9
	30	-5,1 ± 5,2	-1,1 ± 4,6	-3,8 ± 2,3	-1,8 ± 2,6	-3,0 ± 2,5	-2,8 ± 3,5	-0,8 ± 2,9
	60	-11,6 ± 5,0	-8,2 ± 7,4	-5,8 ± 2,4	-2,3 ± 2,3	-5,7 ± 3,1	-6,4 ± 4,8	-4,6 ± 6,1
ALH	0	-1,6 ± 1,2	-1,3 ± 1,2	-0,3 ± 1,3	-0,02 ± 1,3	-0,6 ± 1,3	-0,8 ± 1,1	-1,2 ± 1,0
	10	-1,6 ± 1,1	-1,3 ± 1,0	-0,2 ± 1,1	0,6 ± 2,0	-0,5 ± 1,3	-0,9 ± 1,1	-0,9 ± 1,2
	30	-1,2 ± 1,2	-1,2 ± 1,4	-0,3 ± 1,0	0,1 ± 1,3	-0,5 ± 1,1	-0,4 ± 1,2	-0,4 ± 1,1
	60	-1,1 ± 0,9	-1,3 ± 1,2	-0,5 ± 0,9	-0,2 ± 0,9	-0,8 ± 0,9	-0,8 ± 1,0	-1,1 ± 1,2

Tab. A2: Korrelationen der subjektiv geschätzten und im CASA ermittelten Gesamtmotilität (angegeben mit R- und p-Wert)

Gesamtmotilität, geschätzt Versus CASA									
Zeit (Minuten)	ohne Auftaumedium UpA			mit Auftaumedium UpA			mit Verdünnermedium Up1		
	Termin 1	Termin 2	Termin 3	Termin 1	Termin 2	Termin 3	Termin1	Termin2	Termin 3
TE-Verdünner									
0	R = 0,57 p = 0,09	R = 0,59 p = 0,07	R = 0,74 p = 0,02	R = 0,62 p = 0,05	R = 0,49 p = 0,15	R = 0,85 p < 0,01			
10	R = 0,73 p = 0,02	R = 0,86 p < 0,01	R = 0,73 p = 0,02	R = 0,88 p < 0,01	R = 0,57 p = 0,08	R = 0,48 p = 0,16			
30	R = 0,39 p = 0,27	R = -0,27 p = 0,46	R = 0,67 p = 0,03	R = 0,83 p < 0,01	R = 0,29 p = 0,423	R = 0,44 p = 0,20			
60	R = 0,46 p = 0,18	R = -0,20 p = 0,59	R = 0,35 p = 0,33	R = 0,54 p = 0,11	R = -0,13 p = 0,72	R = 0,71 p = 0,02			
Up-Verdünner									
0	R = 0,83 p < 0,01	R = 0,88 p < 0,01	R = 0,84 p < 0,01	R = 0,74 p = 0,02	R = 0,92 p < 0,01	R = 0,71 p = 0,02	R = 0,83 p < 0,01	R = 0,88 p < 0,01	R = 0,73 p = 0,03
10	R = 0,66 p = 0,04	R = 0,83 p < 0,01	R = 0,77 p < 0,01	R = 0,83 p < 0,01	R = 0,87 p < 0,01	R = 0,88 p < 0,01	R = 0,61 p = 0,06	R = 0,68 p = 0,03	R = 0,86 p < 0,01
30	R = 0,59 p = 0,08	R = 0,60 p = 0,07	R = 0,81 p < 0,01	R = 0,65 p = 0,04	R = 0,78 p < 0,01	R = 0,91 p < 0,01	R = 0,63 p = 0,05	R = 0,72 p = 0,02	R = 0,84 p < 0,01
60	R = 0,68 p = 0,03	R = 0,36 p = 0,31	R = 0,53 p = 0,12	R = 0,80 p < 0,01	R = 0,763 p = 0,01	R = 0,86 p < 0,01	R = 0,65 p = 0,04	R = 0,52 p = 0,12	R = 0,41 p = 0,28
Canipro™ Freeze A&B Verdünner									
0	R = 0,85 p < 0,01	R = 0,79 p < 0,01	R = 0,97 p < 0,01	R = 0,80 p < 0,01	R = 0,47 p = 0,17	R = 0,92 p < 0,01			
10	R = 0,90 p < 0,01	R = 0,86 p < 0,01	R = 0,94 p < 0,01	R = 0,88 p < 0,01	R = 0,47 p = 0,17	R = 0,94 p < 0,01			
30	R = 0,88 p < 0,01	R = 0,69 p = 0,03	R = 0,82 p < 0,01	R = 0,75 p = 0,01	R = 0,18 p = 0,62	R = 0,93 p < 0,01			
60	R = 0,76 p = 0,01	R = 0,45 p = 0,19	R = 0,91 p < 0,01	R = 0,39 p = 0,26	R = -0,27 p = 0,46	R = 0,80 p < 0,01			

Tab. A3: Durchschnittliche Messwertdifferenz der Gesamtmotilität im t-Test (geschätzt – CASA) (%) sowie p-Wert

Gesamtmotilität, geschätzt – CASA Motilität									
	ohne Auftaumedium UpA			mit Auftaumedium UpA			mit Verdünnermedium Up1		
Zeit (Minuten)	Termin 1	Termin 2	Termin 3	Termin 1	Termin 2	Termin 3	Termin1	Termin2	Termin 3
TE-Verdünner									
0	9,3 ± 16,1 p = 0,10	10,9 ± 10,7 p = 0,01	10,4 ± 9,7 p = 0,01	9,2 ± 11,5 p = 0,03	10,9 ± 11,7 p = 0,02	10,9 ± 10,3 p = 0,01			
10	7,4 ± 14,1 p = 0,13	6,4 ± 5,2 p < 0,01	8,2 ± 10,7 p = 0,04	5,7 ± 9,8 p = 0,10	7,7 ± 9,7 p = 0,03	9,8 ± 13,8 p = 0,05			
30	3,6 ± 12,0 p = 0,37	-1,3 ± 9,0 p = 0,67	1,3 ± 6,7 p = 0,54	3,9 ± 9,0 p = 0,21	2,6 ± 9,3 p = 0,41	3,2 ± 9,4 p = 0,31			
60	-2,7 ± 4,4 p = 0,08	-5,7 ± 8,0 p = 0,05	-3,9 ± 4,9 p = 0,03	-1,5 ± 6,1 p = 0,47	-3,9 ± 8,6 p = 0,19	-2,2 ± 3,6 p = 0,08			
Up-Verdünner									
0	16,1 ± 16,1 p = 0,01	11,3 ± 8,4 p < 0,01	9,5 ± 10,5 p = 0,02	19,5 ± 8,4 p < 0,01	18,5 ± 6,2 p < 0,01	17,5 ± 12,8 p < 0,01	14,7 ± 7,8 p < 0,01	13,0 ± 6,0 p < 0,01	17,3 ± 9,9 p < 0,01
10	9,8 ± 15,5 p = 0,08	13,2 ± 8,6 p < 0,01	8,3 ± 14,5 p = 0,10	17,8 ± 8,6 p < 0,01	22,2 ± 4,9 p < 0,01	22,4 ± 7,0 p < 0,01	15,7 ± 9,6 p < 0,01	12,6 ± 7,6 p < 0,01	15,6 ± 8,8 p < 0,01
30	14,8 ± 12,9 p = 0,01	15,9 ± 11,0 p < 0,01	12,1 ± 11,6 p < 0,01	22,8 ± 7,2 p < 0,01	21,2 ± 8,1 p < 0,01	20,2 ± 12,0 p < 0,01	16,2 ± 8,6 p < 0,01	15,1 ± 9,2 p < 0,01	16,0 ± 11,2 p < 0,01
60	7,8 ± 11,8 p = 0,07	17,0 ± 17,2 p = 0,01	6,6 ± 15,2 p = 0,20	14,9 ± 8,8 p < 0,01	18,7 ± 12,1 p < 0,01	9,4 ± 16,1 p = 0,10	10,8 ± 10,1 p < 0,01	15,2 ± 16,8 p = 0,02	6,8 ± 18,8 p = 0,31
Canipro™ Freeze A&B Verdünner									
0	19,4 ± 9,0 p < 0,01	19,5 ± 7,3 p < 0,01	17,6 ± 8,1 p < 0,01	18,5 ± 11,6 p < 0,01	24,1 ± 11,4 p < 0,01	15,9 ± 8,3 p < 0,01			
10	22,4 ± 6,6 p < 0,01	21,3 ± 5,9 p < 0,01	19,2 ± 8,2 p < 0,01	22,3 ± 9,2 p < 0,01	24,4 ± 9,5 p < 0,01	18,3 ± 8,7 p < 0,01			
30	17,8 ± 7,1 p < 0,01	19,2 ± 11,5 p < 0,01	18,7 ± 11,3 p < 0,01	14,6 ± 11,7 p < 0,01	13,7 ± 10,8 p < 0,01	16,0 ± 7,0 p < 0,01			
60	5,5 ± 12,5 p = 0,20	9,1 ± 12,5 p = 0,05	6,4 ± 8,2 p = 0,04	4,8 ± 12,6 p = 0,26	10,2 ± 15,5 p = 0,07	5,6 ± 10,3 p = 0,12			

Tab. A4: Korrelationen der subjektiv geschätzten und im CASA ermittelten Progressivmotilität (angegeben mit R- und p-Wert)

Progressivmotilität, geschätzt Versus CASA									
Zeit (Minuten)	ohne Auftaumedium UpA			mit Auftaumedium UpA			mit Verdünnermedium Up1		
TE-Verdünner									
	Termin 1	Termin 2	Termin 3	Termin 1	Termin 2	Termin 3	Termin 1	Termin 2	Termin 3
0	R = 0,95 p < 0,01	R = 0,95 p < 0,01	R = 0,83 p < 0,01	R = 0,59 p = 0,07	R = 0,89 p < 0,01	R = 0,88 p < 0,01			
10	R = 0,98 p < 0,01	R = 0,95 p < 0,01	R = 0,83 p < 0,01	R = 0,89 p < 0,01	R = 0,92 p < 0,01	R = 0,92 p < 0,01			
30	R = 0,94 p < 0,01	R = 0,99 p < 0,01	R = 0,97 p < 0,01	R = 0,98 p < 0,01	R = 0,98 p < 0,01	R = 0,98 p < 0,01			
60	R = 0,60 p = 0,07	R = 0,90 p < 0,01	R = 0,92 p < 0,01	R = 0,89 p < 0,01	R = 0,59 p = 0,07	R = 0,92 p < 0,01			
Up-Verdünner									
0	R = 0,81 p < 0,01	R = 0,94 p < 0,01	R = 0,76 p = 0,01	R = 0,78 p < 0,01	R = 0,90 p < 0,01	R = 0,77 p < 0,01	R = 0,86 p < 0,01	R = 0,86 p < 0,01	R = 0,82 p < 0,01
10	R = 0,75 p = 0,01	R = 0,95 p < 0,01	R = 0,80 p < 0,01	R = 0,78 p < 0,01	R = 0,88 p < 0,01	R = 0,83 p < 0,01	R = 0,90 p < 0,01	R = 0,87 p < 0,01	R = 0,88 p < 0,01
30	R = 0,85 p < 0,01	R = 0,72 p = 0,02	R = 0,88 p < 0,01	R = 0,90 p < 0,01	R = 0,93 p < 0,01	R = 0,92 p < 0,01	R = 0,90 p < 0,01	R = 0,79 p < 0,01	R = 0,97 p < 0,01
60	R = 0,91 p < 0,01	R = 0,81 p < 0,01	R = 0,93 p < 0,01	R = 0,85 p < 0,01	R = 0,42 p = 0,23	R = 0,92 p < 0,01	R = 0,82 p < 0,01	R = 0,85 p < 0,01	R = 0,65 p = 0,06
Canipro™ Freeze A&B Verdünner									
0	R = 0,91 p < 0,01	R = 0,93 p < 0,01	R = 0,98 p < 0,01	R = 0,82 p < 0,01	R = 0,94 p < 0,01	R = 0,98 p < 0,01			
10	R = 0,81 p < 0,01	R = 0,77 p = 0,01	R = 0,99 p < 0,01	R = 0,81 p < 0,01	R = 0,90 p < 0,01	R = 0,96 p < 0,01			
30	R = 0,97 p < 0,01	R = 0,95 p < 0,01	R = 0,97 p < 0,01	R = 0,98 p < 0,01	R = 0,80 p < 0,01	R = 0,98 p < 0,01			
60	R = 0,93 p < 0,01	R = 0,94 p < 0,01	R = 0,97 p < 0,01	R = 0,75 p = 0,01	R = 0,72 p = 0,02	R = 0,87 p < 0,01			

Tab. A5: Durchschnittliche Messwertdifferenz der Progressivmotilität im t-Test (geschätzt – CASA) (%) und p-Wert

Progressivmotilität, geschätzt – CASA Motilität									
	ohne Auftaumedium UpA			mit Auftaumedium UpA			mit Verdünnermedium Up1		
Zeit (Minuten)	Termin 1	Termin 2	Termin 3	Termin 1	Termin 2	Termin 3	Termin 1	Termin 2	Termin 3
TE-Verdünner									
0	5,7 ± 9,5 p = 0,09	11,5 ± 7,5 p < 0,01	11,3 ± 9,9 p < 0,01	6,3 ± 15,0 p = 0,22	17,5 ± 11,1 p < 0,01	14,5 ± 9,7 p < 0,01			
10	6,0 ± 7,8 p = 0,04	9,1 ± 4,3 p < 0,01	8,7 ± 9,4 p < 0,01	4,4 ± 10,6 p = 0,23	10,9 ± 10,6 p = 0,01	8,9 ± 11,3 p = 0,04			
30	2,0 ± 3,6 p = 0,1	1,0 ± 2,1 p = 0,17	1,7 ± 3,4 p = 0,15	1,8 ± 5,3 p = 0,30	1,0 ± 2,2 p = 0,19	2,1 ± 4,4 p = 0,16			
60	-0,2 ± 0,8 p = 0,56	-0,3 ± 0,5 p = 0,06	0,5 ± 2,1 p = 0,50	-0,4 ± 0,7 p = 0,09	-0,3 ± 0,9 p = 0,33	0,2 ± 1,3 p = 0,59			
Up-Verdünner									
0	17,5 ± 13,4 p < 0,01	10,0 ± 7,3 p < 0,01	11,4 ± 11,8 p = 0,01	21,3 ± 11,6 p < 0,01	19,9 ± 6,2 p < 0,01	19,7 ± 12,5 p < 0,01	17,1 ± 9,5 p < 0,01	13,6 ± 7,4 p < 0,01	19,2 ± 9,1 p < 0,01
10	12,2 ± 12,0 p = 0,01	17,0 ± 4,6 p < 0,01	10,2 ± 11,8 p = 0,02	20,2 ± 10,0 p < 0,01	22,2 ± 5,6 p < 0,01	22,0 ± 13,6 p < 0,01	16,0 ± 8,9 p < 0,01	14,6 ± 7,8 p < 0,01	19,1 ± 10,1 p < 0,01
30	8,6 ± 7,7 p < 0,01	13,8 ± 10,1 p < 0,01	9,1 ± 9,7 p = 0,02	18,9 ± 8,1 p < 0,01	19,0 ± 5,0 p < 0,01	16,3 ± 14,7 p < 0,01	11,8 ± 6,1 p < 0,01	12,8 ± 6,8 p < 0,01	10,5 ± 9,0 p < 0,01
60	1,6 ± 6,1 p = 0,44	-0,7 ± 4,8 p = 0,65	-0,7 ± 4,2 p = 0,62	7,9 ± 8,1 p = 0,01	6,4 ± 9,1 p = 0,06	7,6 ± 10,9 p = 0,06	4,6 ± 5,9 p = 0,04	1,1 ± 3,2 p = 0,32	2,1 ± 10,6 p = 0,57
Canipro™ Freeze A&B Verdünner									
0	21,9 ± 9,8 p < 0,01	20,9 ± 9,5 p < 0,01	16,9 ± 10,7 p < 0,01	16,6 ± 8,9 p < 0,01	16,8 ± 12,2 p < 0,01	11,1 ± 11,1 p = 0,01			
10	25,2 ± 10,5 p < 0,01	28,0 ± 9,3 p < 0,01	17,2 ± 9,6 p < 0,01	24,0 ± 10,5 p < 0,01	24,6 ± 11,9 p < 0,01	17,1 ± 11,6 p < 0,01			
30	10,6 ± 10,4 p = 0,01	12,9 ± 10,0 p < 0,01	11,4 ± 8,4 p < 0,01	7,2 ± 8,1 p = 0,02	7,8 ± 9,0 p = 0,02	10,2 ± 9,1 p < 0,01			
60	1,0 ± 2,5 p = 0,24	3,3 ± 4,5 p = 0,04	2,1 ± 5,4 p = 0,25	0,3 ± 1,5 p = 0,55	0,8 ± 2,0 p = 0,24	3,1 ± 8,1 p = 0,26			

Tab. A6: Pseudoreplikation (n = 30) bezüglich der Korrelationen der subjektiv geschätzten und im CASA ermittelten Gesamt- und Progressivmotilität (angegeben mit R- und p-Wert)

Zeit (Minuten)	Gesamtmotilität, geschätzt Versus CASA			Progressivmotilität, geschätzt Versus CASA		
	ohne Auftaumedium	mit Auftaumedium	mit Up1 Verdünnermedium	ohne Auftaumedium	mit Auftaumedium	mit Up1 Verdünnermedium
TE-Verdünner						
0	R = 0,61 p < 0,01	R = 0,70 p < 0,01		R = 0,88 p < 0,01	R = 0,72 p < 0,01	
10	R = 0,74 p < 0,01	R = 0,66 p < 0,01		R = 0,89 p < 0,01	R = 0,89 p < 0,01	
30	R = 0,26 p = 0,16	R = 0,57 p < 0,01		R = 0,96 p < 0,01	R = 0,96 p < 0,01	
60	R = 0,11 p = 0,58	R = 0,35 p = 0,06		R = 0,79 p < 0,01	R = 0,69 p < 0,01	
Up-Verdünner						
0	R = 0,82 p < 0,01	R = 0,76 p < 0,01	R = 0,79 p < 0,01	R = 0,81 p < 0,01	R = 0,81 p < 0,01	R = 0,83 p < 0,01
10	R = 0,73 p < 0,01	R = 0,82 p < 0,01	R = 0,75 p < 0,01	R = 0,81 p < 0,01	R = 0,81 p < 0,01	R = 0,88 p < 0,01
30	R = 0,68 p < 0,01	R = 0,84 p < 0,01	R = 0,77 p < 0,01	R = 0,81 p < 0,01	R = 0,91 p < 0,01	R = 0,93 p < 0,01
60	R = 0,47 p < 0,01	R = 0,78 p < 0,01	R = 0,42 p = 0,03	R = 0,91 p < 0,01	R = 0,81 p < 0,01	R = 0,71 p < 0,01
Canipro™ Freeze A&B Verdünner						
0	R = 0,88 p < 0,01	R = 0,73 p < 0,01		R = 0,94 p < 0,01	R = 0,89 p < 0,01	
10	R = 0,91 p < 0,01	R = 0,83 p < 0,01		R = 0,85 p < 0,01	R = 0,87 p < 0,01	
30	R = 0,79 p < 0,01	R = 0,75 p < 0,01		R = 0,96 p < 0,01	R = 0,94 p < 0,01	
60	R = 0,69 p < 0,01	R = 0,34 p = 0,07		R = 0,94 p < 0,01	R = 0,84 p < 0,01	

Tab. A7: Pseudoreplikation (n = 30) bezüglich der durchschnittlichen Methodenunterschiede der subjektiv geschätzten und im CASA ermittelten Gesamt- und Progressivmotilität im t-Test (angegeben als p-Wert)

Zeit (Minuten)	Gesamtmotilität, geschätzt Versus CASA			Progressivmotilität, geschätzt Versus CASA		
	ohne Auftaumedium	mit Auftaumedium	mit Up1 Verdünermedium	ohne Auftaumedium	mit Auftaumedium	mit Up1 Verdünermedium
TE-Verdüner						
0	0,01	p < 0,01		p < 0,01	p < 0,01	
10	0,01	0,02		p < 0,01	0,02	
30	0,58	0,20		0,06	0,19	
60	0,02	0,14		0,98	0,28	
Up-Verdüner						
0	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
10	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
30	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01
60	0,03	p < 0,01	0,01	0,95	p < 0,01	0,15
Canipro™ Freeze A&B Verdüner						
0	p < 0,01	p < 0,01		p < 0,01	p < 0,01	
10	p < 0,01	p < 0,01		p < 0,01	p < 0,01	
30	p < 0,01	p < 0,01		p < 0,01	p < 0,01	
60	0,03	0,04		0,08	0,16	

Tab. A8: Durchschnittliche Abnahme der einzelnen Motilitätsparameter des Sonderfalls im SpermVision® im Vergleich zum Nativsperma

Verdüner und Zeit (Minuten)	DAP	DCL	DSL	VAP	VCL	VSL	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
TE-Verdüner											
0	-0,8	-17,2	5,9	-3,9	-42,6	11,5	0,2	0,3	0,2	-2,7	12,6
10	-4,7	-20,4	1,5	-7,7	-42,0	6,1	0,2	0,2	0,1	-1,9	8,2
30	-8,8	-22,2	-4,1	-20,9	-52,8	-9,7	0,1	0,1	0,1	-2,0	-4,6
60	-10,4	-29,3	-3,9	-23,2	-66,2	-8,5	0,2	0,2	0,2	-2,0	0,0
Up-Verdüner											
0	-4,0	-17,2	-0,6	-6,9	-36,0	0,5	0,1	0,1	0,1	-0,7	-0,4
10	-4,2	-16,6	-0,7	-7,4	-34,5	0,1	0,1	0,1	0,1	-0,9	-0,3
30	-6,6	-17,5	-3,1	-12,6	-35,8	-5,0	0,1	0,1	0,1	-0,7	-2,1
60	-7,9	-22,2	-3,6	-14,5	-44,9	-5,6	0,1	0,1	0,1	-0,7	-1,9
Canipro™ Freeze A&B Verdüner											
0	2,4	-8,0	8,2	3,8	-21,5	17,2	0,2	0,2	0,1	-1,6	4,8
10	-0,9	-17,9	4,9	-1,5	-39,9	11,6	0,2	0,3	0,2	-2,0	2,9
30	-2,3	-11,9	2,0	-5,9	-29,2	4,4	0,1	0,1	0,1	-1,5	2,8
60	-9,5	-22,4	-4,5	-20,8	-51,5	-9,3	0,1	0,1	0,1	-1,4	-2,9

Tab. A9: Durchschnittliche Abnahme der einzelnen Motilitätsparameter des Sonderfalls im SpermVision® im Vergleich zum Nativsperma mit Zusatz von Auftaumedium (UpA)

Verdüner Zeit (Minuten)	DAP	DCL	DSL	VAP	VCL	VSL	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
TE-Verdüner mit UpA											
0	-4,1	-21,4	1,5	-10,1	-49,1	2,5	0,2	0,2	0,2	-1,2	5,7
10	-4,8	-16,2	0,9	-15,3	-44,2	-1,6	0,2	0,2	0,1	-2,3	8,6
30	-11,2	-18,6	-7,0	-27,4	-48,0	-17,5	0,0	0,0	-0,1	-1,8	9,4
60	-19,7	-45,0	-15,2	-47,0	-105,4	-35,9	-0,5	-0,2	-0,3	-4,0	-12,1
Up-Verdüner mit UpA											
0	-0,1	-9,7	3,7	1,0	-19,9	9,7	0,1	0,2	0,1	-0,8	1,4
10	-0,9	-10,1	2,6	-1,9	-22,8	6,1	0,1	0,1	0,1	-0,9	0,2
30	-2,8	-8,2	0,5	-5,7	-17,9	1,7	0,1	0,1	0,0	-0,4	1,0
60	-5,0	-14,8	-1,1	-10,5	-31,9	-2,0	0,1	0,1	0,1	-0,7	-1,1
Canipro™ Freeze A&B Verdüner mit UpA											
0	-8,8	-24,9	-3,9	-20,9	-58,5	-9,3	0,1	0,1	0,1	-2,5	-0,2
10	-1,4	-15,5	3,0	-6,0	-39,5	4,5	0,2	0,2	0,1	-2,2	2,8
30	-0,5	0,2	3,1	-4,7	-6,8	4,2	0,1	0,1	0,0	-1,1	3,7
60	-7,2	-12,2	-3,9	-18,7	-33,6	-10,3	0,0	0,0	0,0	-2,1	-0,8

Tab. A10: Durchschnittliche Abnahme der einzelnen Motilitätsparameter des Sonderfalls im SpermVision® im Vergleich zum Nativsperma in Uppsala-Verdünerproben mit Zusatz von Verdünnermedium 1 (Up1)

Motilitätsparameter Zeit (Minuten)	DAP	DCL	DSL	VAP	VCL	VSL	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
0	-2,9	-16,2	1,4	-6,4	-36,6	3,5	0,1	0,2	0,1	-1,4	2,7
10	-3,5	-15,5	0,5	-7,8	-35,3	1,3	0,1	0,1	0,1	-1,5	2,1
30	-4,9	-14,1	-1,3	-10,6	-31,7	-2,4	0,1	0,1	0,1	-1,0	-0,7
60	-6,6	-17,5	-1,8	-13,3	-37,8	-2,4	0,1	0,1	0,1	-1,2	-1,9

11 Literaturverzeichnis

Abe, Y., Lee, D.S., Sano, H., Akiyama, K., Yanagimoto-Ueta, Y., Asano, T., Suwa, Y., Susuki, H. (2008)

Artificial insemination with canine Spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender

J. Reprod. Develop. 54(4), 290 - 294

Alhaider, A.K., Watson, P.F. (2006)

Cryopreservation of dog semen: The use of Equex STM Paste and its effect on plasma membrane fluidity

Abstracts/Cryobiology 53, 420 – 421

Alhaider, A.K., Watson, P.F. (2009)

Cryopreservation of dog semen: The effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium

Anim. Rep. Sc. 110, 147 – 161

Alves, A.E., Apparicio, M.F., Mostachio, G.Q., Motheo, T.F., Vicente, W.R.R. (2008)

Comparison between Ethylenglycol and different concentrations of Glycerol, and pre-freezing equilibrium time, during canine semen freezing

Proceed. 12 th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction, S. 53

Anton, M., Martinet, V., Dalgalarrodo, M., Beaumal, E., David-Briand, E., Rabesona, H. (2003)

Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk

Food Chem. 83, 175 – 183

Badinand, F., Fontbonne, A., Maurel, M.C., Siliart, B. (1993)

Fertilisation time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears

J. Reprod. Fert., Suppl. 47, 63 – 67

Baltissen, J. (2007)

Zusammenhänge zwischen computergestützt ermittelten spermatologischen Merkmalen und der Fertilität von Bullen

Vet. Med. Diss., Hannover

Barito, L.F., Barth, A.D., Bilodeau-Goeseels, S., Panich, P.L., Kastelic, J.P. (2003)

Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate

Theriogenology 60(8), 1539 – 1551

Battista, M., Parks, J., Concannon, P. (1988)

Canine Sperm post-thaw survival following freezing in straws or pellets using PIEPES, Lactose, Tris or Test extenders

Proc. 11th Int. Congr. on Anim. Reprod. and A.I. (Dublin) 3, 229 – 231

Beccaglia, M., Anastasi, P., Luvoni, G.C. (2009)

Freezing of canine semen in an animal-free protein extender

Vet. Res. Commun. 33, Suppl.1, 77 – 80

Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M.L., Barrière, P., Larrat, M., Tainturier, D. (2008)

The advantage of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen

Theriogenology 70(9), 1478 - 1488

Bencharif, D., Amirat, L., Pascal, O., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M.L., Barrière, P., Larrat, M., Tainturier, D. (2010)

The advantage of combining Low-Density Lipoproteins with Glutamine for cryopreservation of canine semen

Reprod. Dom. Anim. , 45 (2), 189 - 200

Berchtold, M. (1997)

Andrologie

In: Freudiger, U., Grünbaum, E.G., Schimke, E., eds. (Hrsg.): Klinik der Hundekrankheiten
Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, 2. Auflage, 665 – 677

Bergeron, A., Crête, 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(3), 708 - 717

Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D., Youngquist, R.S. (1990)

Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility

Theriogenology 34 (1), 147 – 157

Bueno, R., Costa, E.P., Guimaraes, J.D., Valentim, F.M. (2001)

Spermatozoa quality of cryopreserved canine semen: I-use of extenders

Abstract-Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53(3), 364 – 371

Burgess, C.M., Bredl, J.C.S., Plumme, J.M., England, G.C.W. (2001)

Vital and ultrastructural changes in dog spermatozoa during cryopreservation

J. Reprod. Fert., Suppl. 57, 357 – 363

Busch, W., Waberski, D. (2007)

Entwicklung der künstlichen Besamung

In: Busch, W., Waberski, D. (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren

Verlag Schattauer, Stuttgart, 1 – 3

Cardoso, R.C., Silva, A.R., Silva, L.D., Chirinéa, V.H., Souza, F.F., Lopes, M.D. (2007)

Evaluation of fertilizing potential of frozen-thawed dog spermatozoa diluted in ACP-106 using an in vitro sperm-oocyte interaction assay

Reprod. Dom. Anim. 42(1), 11 – 16

Cardoso, R.C., Silva, A.R., Uchoa, D.C., da Silva, L.D. (2003)

Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations

Theriogenology 59(3 - 4), 743 – 751

Ceylan, A., Serin, I. (2006)

Effect of different extenders on motility, viability and acrosomal integrity of frozen dog semen

Indian Vet. J. 83(12), 1283 – 1285

Chalah, T., Brillard, J. (1998)

Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI)

Theriogenology 50(3), 487 – 493

Chirinéa, H.V.A., Mello Martins, M.I., Ferreira de Souza, F., Tebet, J.M., Ozanan Pap, F., Lopes, M.D. (2006)

Morphofunctional characteristics of canine cooled and frozen semen using two different extenders

Abstract- Ciência Animal Brasileira 7(4), 407 – 415

Comizzoli, P., Mauget, R., Mermillod, P. (2001)

Assessment of in vitro fertility of deer spermatozoa by heterologous IVF with zona-free bovine oocytes

Theriogenology 56(2), 261 – 274

Commin, L., Neto, V., Rosset, E., Pierson, A., Buff, S. (2000)

Use of LDL and optimal combination of different factors in cryopreservation of dog semen
Proc. 6th EVSSAR Conference, Lyon/Frankreich, Seite 63

Crusco dos Santos, S.E., Infantosi Vannucchi, C., Satzinger, S., Ortiz D'Avila Assumpção, Visintin, J.A. (1999)

Comparison of five extenders for canine semen freezing

Braz. J. Vet. Sci. 36(5), 1413 - 9596

De Cássia Soares Cardoso, R., Rodrigues Silva, A., Machado da Silva, L.D. (2006)
Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a
coconut water extender
Anim. Reprod. Sci. 92, 384 – 391

Didion, B.A. (2008)
Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples
Theriogenology 70, 1374

Dobrinski, I., Lulai, C., Barth, A.D., Post, K. (1993)
Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of
dog semen
J. Reprod. Fert., Suppl. 47, 291 – 296

Dott, H.M., Foster, G.C. (1979)
The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area
change frequency with an image analyzing computer
J. Reprod. Fert. 55, 161 - 166

Eilts, B.E. (2005)
Theoretical aspects of canine semen cryopreservation
Theriogenology 64, 692 – 697

England, G.C.W. (1993)
Cryopreservation of dog semen: a review
J. Reprod. Fert., Suppl. 47, 243 – 255

England, G.C. (1999)
Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation
Theriogenology 52(6), 981 – 986

England, G.C.W., Allen, W.E. (1992)
Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood
Theriogenology 37, 373 – 381

England, G.C.W., Millar, K.M. (2008)

The Ethics and Role of AI with Fresh and Frozen Semen in Dogs

Reprod. Dom. Anim. 43, Suppl. 2, 165 – 171

England, G.C.W., Ponzio, P. (1996)

Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen

Theriogenology 46, 165 – 171

Eulenberger, K., Schäfer-Somi, S., Aurich, C. (2009)

Effect of different concentrations of ascorbic acid on motility, membrane integrity and

chromatin status of frozen thawed canine spermatozoa within 6 hours of storage at 37°C

Reprod. Dom. Anim. 44, Suppl. 2, 354 – 358

Farrant, J., Walter, C.A., Heather, L., Mc Gann, L.E. (1977)

Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following freezing and thawing

Cryobiology 14, 273 – 286

Farstad, W. (1996)

Semen cryopreservation in dogs and foxes

Anim. Reprod. Sci. 42, 251 – 260

Farstad, W. (2000)

Assisted reproductive technology in canid species

Theriogenology 53(1), 175 – 186

Farstad, W. (2009)

Cryopreservation of canine semen - New challenges

Reprod. Dom. Anim. 44, Suppl. 2, 336 – 341

Farstad, W., Andersen Berg, K. (1989)

Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog

J. Reprod. Fert., Suppl. 39, 289 – 292

Foote, R.H. (1964)

Extenders for freezing dog semen

Am. J. Vet. Res. Vol.25, Nr.104, 37 – 40

Foxcroft, G.R., Dyck, M.K., Ruiz-Sanchez, A., Novak, S., Dixon, W.T. (2008)

Identifying useable semen

Theriogenology 70, 1324 – 1336

Futino, D.O., Mendes, M.C., Matos, W.N., Mondadori, R.G., Lucci, C.M. (2010)

Glycerol, Methyl-Formamide and Dimethyl-Formamide in Canine Semen Cryopreservation

Reprod. Domest. Anim. 45, 214 – 220

Garner, D. L., Johnson, L. A. (1995)

Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide

Biol. Reprod. 53 (2), 276 – 284

Gil, J., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. (2000)

Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen

Theriogenology 54(1), 93 – 108

Gradil, C.M., Yeager, A., Concannon, P.W. (2006)

Assessment of Reproductive Problems in the Male Dog

In: Concannon, P.W., England, G., Verstegen, J., Linde-Forsberg, C. (Eds.) (Hrsg.): Recent Advances in Small Animal Reproduction

International Veterinary Information Service, Ithaca New York (www.ivis.org)

Graham, J.K., Foote, R.H. (1987)

Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing

Cryobiology 24, 42 – 52

Gröpper, B. (2004)

Einflüsse unterschiedlicher Verfahren zur Sperma-Tiefgefrierkonservierung auf Motilität und Membranintegrität von Hundespermien

Einsatz moderner spermatologischer Analyseverfahren
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

Günzel-Apel, A.R., Günther, C., Terhaer, P., Bader, H. (1993)
Computer-assisted analysis of motility, velocity and linearity of dog spermatozoa
J. Reprod. Fert. Suppl. 47, 271 – 278

Günzel-Apel, A.R., Terhaer, P., Waberski, D. (1994)
Hodendimensionen und Ejakulatbeschaffenheit fertiler Rüden unterschiedlicher
Körpergewichte
Kleintierpraxis 39, 483 – 486

Günzel-Apel, A.R. (2007)
Künstliche Besamung beim Hund
In: Busch, W., Waberski, D. (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren
Verlag Schattauer, Stuttgart, 262 – 272

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J. (1990)
Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive
J. of Andrology 11(1), 73 - 88

Hay, M.A., King, W.A., Gartley, C.J., Leibo, S.P., Goodrowe, K.L. (1997)
Effects of cooling, freezing, and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs
J. Reprod. Fert., Suppl. 51, 99 – 108

Hermansson, U., Linde Forsberg, C. (2006)
Freezing of stored, chilled dog spermatozoa
Theriogenology 65(3), 584 – 93

Hoffmann, B. (2003a)
Künstliche Besamung (KB)
In: Hoffmann, B. (Hrsg.): -Andrologie- Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der
männlichen Fortpflanzung
Verlag Lehmanns Media, Berlin, 85 – 106

Hoffmann, B. (2003b)

Samengewinnung und Beurteilung

In: Hoffmann, B. (Hrsg.): -Andrologie- Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung

Verlag Lehmanns Media, Berlin, 5 – 19

Hoffmann, B. (2003c)

Samenbeurteilung

In: Hoffmann, B. (Hrsg.): -Andrologie- Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung

Verlag Lehmanns Media, Berlin, 19 – 28

Hoffmann, B. (2003d)

Pathomorphologie der Samenzelle

In: Hoffmann, B. (Hrsg.): -Andrologie- Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung

Verlag Lehmanns Media, Berlin, 59 – 63

Hori, T., Kaseki, H., Fukuhara, Y., Oba, H., Mizutani, T., Kawakami, E., Tsutsui, T. (2006)

Effects of addition of sodium lauryl sulfate on frozen-thawed canine spermatozoa

J. Vet. Med. Sci. 68(10), 1125 – 1128

Iguer-Quada, M., Verstegen, J.P. (2001)

Evaluation of the "Hamilton Thorn computer-based automated system" for dog semen analysis.

Theriogenology, 55(3), 733 – 749

Ivanova-Kicheva, M.G., Subev, M.S., Bobadov, N.D., Dacheva, D.P., Rouseva, D.P. (1995)

Effect of thawing regimes on the morphofunctional state of canine spermatozoa

Theriogenology 44, 563 – 569

Ivanova-Kicheva, M.G., Bobadov, N., Somlev, B. (1997)

Cryopreservation of canine semen in pellets and in 5-ml aluminium tubes using three extenders

Theriogenology 48, 1343 – 1349

Januskauskas, A., Johannisson, A., Soderquist, L., Rodriguez-Martinez, H. (2000)
Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in
relation to fertility in Swedish dairy AI bulls
Theriogenology (53), 859 – 875

Johnston, S.D., Kamolpatana, K., Root-Kustritz, M.V., Johnston, G.R. (2000)
Prostatic disorders in the dog
Anim. Reprod. Sc. 60 - 61, 405 - 415

Koderle, M., Aurich, C., Schäfer-Somi, S. (2009)
The influence of cryopreservation and seminal plasma on the chromatin structure of dog
spermatozoa
Theriogenology 72(9), 1215 – 1220

Kumi-Diaka, J. (1993)
Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test
Theriogenology 39, 1279 – 1289

Layne, S.E., Pinto, C.R.F., Kozink, D.M., Holland, D.M. (2008)
Post-thaw quality of canine semen cryopreserved with commercial canine and equine
extenders
Therionology 70, 580 – 581

Leblond, E., Desnoyers, L., Manjunath, P. (1993)
Phosphorylcholine-binding proteins from the seminal fluids of different species share
antigenic determinants with the major proteins of bovine seminal plasma
Molecular Reprod. Develop. 34 (4), 443 – 449

Lévy, X., Frontbonne, A. (2007)
Canine Semen Banking: sanitary and ethical aspects
Legislation Rev. Reprod. Anim. Belo. Horizonte 31, 92 - 107/ www.cbpa.org.br.

Linde-Forsberg, C. (2001)

Regulations and Recommendations for International Shipment of Chilled and Frozen Canine Semen

In: Recent Advances in Small Animal Reproduction

Concannon, P.W., England, G., Verstegen, J. (Eds.)

Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.

Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. (1989)

Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and side of insemination with fresh and frozen semen

J. Reprod. Fert., Suppl. 39, 299 – 310

Linde-Forsberg, C., Forsberg, M. (1993)

Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs

J. Reprod. Fert., Suppl.47, 313 – 323

Lopes, K.R.F., Costa, L.L.M., Lima, G.L., Souza, A.L., Silva, A.R. (2009a)

Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen

Theriogenology 72(5), 650 – 654

Lopes, B.V., Chirinea, V.H., Derussi, A.A.P., Araujo, G.H.M., Arduino, F., Lopes, M.D. (2009b)

Use of Ascorbic Acid for Freezing of Canine Semen of Fertile and Sub-fertile Dogs

Conference Information: 13th Annual Conference of the European-Society-of-Domestic-Animal-Reproduction, Ghent Belgium

Reprod. Dom. Anim. 44, 88 – 88

Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Ménard, M. (2002)

Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk

Biol. Reprod. 67(4), 1250 – 1258

Martin, I.C.A. (1963)

The deep-freezing of dog spermatozoa in diluents containing skim-milk

Res. Vet. Sci. 4, 315 – 325

Martínez, A.I. (2004)

Canine fresh and cryopreserved semen evaluation

Anim. Reprod. Sci. 82 - 83, 209 – 224

Martins-Bessa, A., Rocha, A., Mayenco-Aguirre, A. (2006)

Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders

Theriogenology 66(9), 2047 – 2055

Martins-Bessa, A., Rocha, A., Mayenco-Aguirre, A. (2007)

Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex 2 extender for dog semen freezing

Theriogenology 68, 1088 – 1096

Mazur, P. (1963)

Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing

J. General Physiology 47, 347-369

Mazur, P. (1965)

The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells

Ann. N.Y. Acad. Sci. 125(2), 658 – 676

Mazur, P. (1984)

Freezing of living cells: mechanisms and implications

Am. J. Physiol. 247 (Cell Physiol. 16), C125 - C142

Memon, M.A. (2007)

Common causes of male dog infertility

Theriogenology 68(3), 322 – 328

- Merkies, K., Chenier, T., Plante, C., Buhr, M.M. (2000)
Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis
Theriogenology 54, 1215 – 1224
- Michael, A., Alexopoulos, C., Pontiki, E., Hadjipavlou-Litina, D., Saratsis, P., Boscós C. (2007)
Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa
Theriogenology 68(2), 204 - 212
- Möller, G., Azevedo, L.R., Trein, C.R., Neves, A.P., Garbade, P., Mattos, R.C. (2005)
Effects of haemospermia on seminal quality
Anim. Reprod. Sci. 89(1 - 4), 264 – 267
- Monteiro, J.C., Gonçalves, J.S.A., Rodrigues, J.A., Lúcio, C.F., Silva, L.C.G. Assumpção, M.E.O.A., Vannucchi, C.I. (2009)
Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen
Rep. Dom. Anim. 44, Suppl. 2, 359 – 362
- Morton, D.B., Bruce, S.G. (1989)
Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs
J. Reprod. Fert. Suppl. 39, 311 – 316
- Nair, S.R., Mohanchandran, F., Chandramohan, A., Sudararaj, A., Kalatharan, J., Rajasekaran, J. (1998)
Ultra structural changes in frozen dog spermatozoa
Indian. Vet. J. 75, 621 – 623
- Nizanski, W., Dubiel, A., Birger, M., Bielas, W. (1997)
In vitro evaluation of dog semen extended in two TRIS-buffered diluents and frozen in pellets
Conference Information: 30th Conference on Physiology and Pathology of Reproduction,
Date: Feb 20 - 21, 1997 Vienna Austria

Reprod. Dom. Anim. 32(1 - 2), 102 – 102

Nizanski, W., Dubiel, A., Bielas, W., Dejneka, G.J. (2001)

Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing

J. Reprod. Fert. Suppl. 57, 365 – 369

Nizanski, W., Klimowicz, M. (2005)

Use of fluorescent staining SYBR-14/propidium iodide, and flow cytometry in evaluating the quality of chilled dog semen

Medycyna Weterynaryjna 61(9), 1022 – 1028

Nöthling, J.O., Shuttleworth, R. (2005)

The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen

Theriogenology 63(5), 1469 – 1480

Nöthling, J.O., Gerber, D., Colenbrander, B., Dijkstra, M., Bakker, T., De Cramer, K. (2007)

The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed

Theriogenology 67(2), 264 – 75

Oettlé, E.E. (1986)

Changes in acrosom morphology during cooling and freezing of dog semen

Anim. Reprod. Sci. 12, 145 – 150

Olar, T. T., Amann, R. P., Pickett, B.W. (1983)

Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog

Biol. Reprod. 29(5), 1114 – 1120

Olar, T.T., Bowen, R.A., Pickett, B.W. (1989)

Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws.

Theriogenology 31(2), 451 – 461

Oliveira, E.C.S., Juliani, G.C., Marques, A.P., Henry, M. (2006)

In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 58(6), 1116 – 1122

Palomo, M.J., Fernández-Novell, J.M., Peña, A., Guinovart, J.J., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J. E. (2003)

Glucose- and Fructose-Induced Dog-Sperm Glycogen Synthesis Shows Specific Changes in the Location of the Sperm Glycogen Deposition

Mol. Reprod. Dev. 64, 349 - 359

Peña, A.I., Barrio, F., Quintela, L.A., Herradón, P.G. (1998a)

Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity

Theriogenology 50, 163 – 174

Peña, A.I., Barrio, F., Quintela, L.A., Herradón, P.G. (1998b)

Proline and Glycine Betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa

Reprod. Dom. Anim. 33, 5 – 9

Peña, A., Barrio, F., Quintela, L.A., Herradon, P.G. (1998c)

Effects of Sodium Dodecyl Sulphate on Post-thaw Dog Semen Quality during in vitro Incubation at 39°C and 22°C

Reprod. Dom. Anim. 33, 393 – 398

Peña, A., Johannisson, A., Linde-Forsberg, C. (1999)

Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry

Theriogenology 52, 965 - 980

Peña, A., Linde-Forsberg, C. (2000a)

Effects of Equex one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa

Theriogenology 54, 859 – 875

Peña, A., Linde-Forsberg, C. (2000b)

Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa

Theriogenology, 703 – 718

Peña, A.I., López-Lugilde, L., Barrio, M., Becerra, J.J., Quintela, L.A., Herradón, P.G. (2003a)

Studies on the intracellular Ca²⁺ concentration of frozen-thawed dog spermatozoa:

Influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitation conditions

Reprod. Dom. Anim. 38, 27 – 35

Peña, A.I., Lugilde, L.L., Barrio, M., Herradón, P.G., Quintela, L.A. (2003b)

Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa

Theriogenology 59(8), 1725 – 1739

Peña, F.J., Núñez-Martínez, I., Morán, J.M. (2006)

Semen Technologie in Dog Breeding: an Update

Reprod. Dom. Anim. 41, Suppl. 2, 21 – 29

Pesch, S., Schuler, G., Wilhelm, E., Hoffmann, B. (2007)

Samengewinnung, -konservierung und künstliche Besamung beim Hund

Tierärztliche Praxis, Kleintiere, 35 (2), 81 – 90

Peter, A.T., Linde-Forsberg, C. (2003)

Efficacy of the anticaspase agent zVAD-fmk on post-thaw viability of canine spermatozoa

Theriogenology 59, 1525 – 1532

Petrunkina, A.M., Gröpper, B., Töpfer-Petersen, E., Günzel-Apel, A.R. (2005)

Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender

Theriogenology 63(5), 1390 – 1406

- Phillips, T., Dhaliwal, G., Verstegen, J. (2008)
Separation of viable, motile sperm from red blood cells and dead spermatozoa: A comparison of four density gradient centrifugation media in the dog
Theriogenology 70(3), 578 - 579 [Abstract]
- Platz, C.C., Seager, S.W.J. (1977)
Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen
Laboratory Animal Science 27 (6), 1013 – 1016
- Ponglowhapan, S., Chatdarong, K. (2008)
Effect of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa
Theriogenology 69, 666 – 672
- Quinn, P.J., Chow, P.Y.W., White, I.G. (1980)
Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site
J. Reprod. Fert. 60, 403 – 407
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E. (2004)
Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis
Theriogenology 61, 673 – 690
- Riesenbeck, A., Volger, D., Hoffmann, B. (2001)
Praxisnahe Bestimmung von Vitalitätsparametern zur Beurteilung von Rüdensperma
Tierärztliche Praxis, Kleintiere und Heimtiere, 29(2), 116 – 120
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., De Kruif, A. (2003)
Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer
Theriogenology 60, 1553 – 1568
- Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., Verberckmoes, S., de Kruif, A. (2004)
Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine

spermatozoa

Theriogenology 61(7 - 8), 1589 – 1602

Rijsselaere, T., Van Soom, A., Tanghe, S., Coryn, M., Maes, D., de Kruif, A. (2005)

New techniques for the assessment of canine semen quality: a review

Theriogenology 64(3), 706 – 719

Rijsselaere, T., Maes, D., Hoflack, G., de Kruif, A., Van Soom, A. (2007)

Effect of body weight, age and breeding history on canine sperm quality parameters measured by the Hamilton-Thorne analyser

Reprod. Dom. Anim. 42(2), 143 – 148

Rodriguez-Martinez, H., Ekwall, H., Linde-Forsberg, C (1993)

Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog semen

J. Reprod. Fert. Suppl. 47, 279 – 285

Rohloff, D., Laibli, C.H., Heidrich, S. (1978)

Untersuchung über die Gefrierschutzwirkung von Glycerin und DMSO bei der Tiefgefrierung von Rüdensperma

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 91, 31 – 33

Root Kustritz, M.V. (2007)

The value of canine semen evaluation for practitioners

Theriogenology 68, 329 – 337

Rota, A., Ström, B., Linde-Forsberg, C., Rodriguez-Martinez, H. (1997)

Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro Incubation at 38°C

Theriogenology 47(5), 1093 – 1101

Rota, A., Linde-Forsberg, C., Vannozzi, J., Romagnoli, S., Rodriguez-Martinez, H. (1998)

Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates

Reprod. Dom. Anim. 33, 355 – 361

- Rota, A., Frishling, A., Vannozzi, I., Camillo, F., Romagnoli, S. (2001)
Effects of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing
J. Reprod. Fert. Suppl. 57, 377 – 381
- Rota, A., Mollo, A. (2005)
Post-thaw quality of dog semen frozen over nitrogen vapours or in a biological freezer after single or two-step glycerol addition
Reprod. Dom. Anim. 40(4), 406 – 406
- Rota, A., Milani, C., Cabianca, G., Martini, M. (2006)
Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation
Theriogenology 65(9), 1848 – 1858
- Schäfer-Somi, S., Kluger, S., Knapp, E., Klein, D., Aurich, C. (2006)
Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa
Theriogenology 66(2), 173 – 182
- Schäfer-Somi, S., Aurich, C. (2007)
Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution
Anim. Reprod. Sci. 102, 1 – 13
- Seager, S.W.J. (1969)
Successful pregnancies utilizing frozen dog semen
A. I. Dig. 17(6), 16
- Silva, A.R., De Cássia Soares Cardoso, R., Uchoa, D.C., Machado da Silva, L.D. (2002)
Short communication/ Effects of Tris-buffer, egg-yolk and glycerol on canine semen freezing
The Veterinary Journal 164, 244 – 246
- Silva, L.D.M., Verstegen, J.P. (1995)
Comparison between three different Extenders for canine intrauterin insemination with

frozen-thawed spermatozoa

Theriogenology 44, 571 – 579

Smith, F.O. (1984)

Cryopreservation of canine semen: technique and performance

PhD Thesis, University of Minnesota

Smith, J. (2008)

Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment

Theriogenology 70(3), 375 – 383

Smith, S.C., England, G.C. (2001)

Effect of technical settings and semen handling upon motility characteristics of dog spermatozoa measured using computer-aided sperm analysis

J. Reprod. Fertil. Suppl. 57, 151 – 159

Smith, F.O., Graham, E.F. (1984)

Cryopreservation of canine semen: technique and performance

Xth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination

Soares, M.P., Rossi, C.A.R., Mezzalana, A., Cecim, M. (2002)

Ethylene glycol on canine semen cryopreservation

Ciência Rural 32, 649 – 655

Songsasen, N., Yu, I., Murton, S., Paccamonti, D.L., Eilts, B.E., Godke, R.A., Leibo, S.P.

(2002)

Osmotic sensitivity of canine spermatozoa

Cryobiology 44, 79 – 90

Stornelli, M.A., Savignone, M.C., Stornelli, M.C., Tittarelli, C., Jurado, S., Giménez, F., de la Sota, R.L. (2006)

Fertility and ultrastructural analysis of frozen-thawed dog spermatozoa with different concentrations of Equex STM Paste

Theriogenology 66, 664 – 665

Ström, B., Rota, A., Linde-Forsberg, C. (1997)

In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation
Theriogenology 48, 247 – 256

Szász, F., Gábor, G., Solti, L. (2000)

Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions

Acta Veterinaria Hungarica 48(3), 325 – 333

Thomas, P.G.A., Surman, V., Myers-Wallen, V.N., Concannon, P.W., Ball, B.A. (1992)

Addition of sodium dodecylsulphate to the Tris-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa

Proc. 12th Int. Cong. Anim. Reprod. A.I.

The Hague 4, 1823 – 1825

Thomas, P.G.A., Larsen, R.E., Burns, J.M., Hahn, C.N. (1993)

A comparison between three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen

Theriogenology 40, 1199 – 1205

Thomassen, R., Farstad, W. (2009)

Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation

Theriogenology 71(1), 190 – 199

Tosun, H., Uysal, O. (2007)

Effect of different extenders and individuals in freezing of dog semen

Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi 54(1), 23 – 28

Tsutsui, T., Hase, M., Hori, T., Ito, T., Kawakami, E. (2000a)

Effects of orvus ES paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing

J. Vet. Med. Sci. 62(5), 533 – 535

- Tsutsui, T., Hase, M., Hori, T., Komoriya, K., Shimizu, N., Nagakubo, K., Kawakami, E. (2000b)
Effect of addition of Orvus ES-paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes
J. Vet. Med. Sci. 62(5), 537 – 538
- Tsutsui, T., Hase, M., Tanaka, A., Fujimura, N., Hori, T., Kawakami, E. (2000c)
Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of orvus ES paste-supplemented egg yolk tris-fructose citrate
J. Vet. Med. Sci. 62(6), 603 – 606
- Van den Berg, L., Soliman, F.S. (1969)
Effect of glycerol and dimethylsulfoxid on changes in composition and pH of Buffer salt solutions during freezing
Cryobiology 6(2), 93 – 97
- Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Ulguim, R.R., Alvarenga, M.V., Bianchi, I., Corrêa, M.N, Lucia, T. Jr., Deschamps, J.C. (2009)
Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen
Anim. Reprod. Sci. 115, 323 – 327
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K. (2002)
Computer assisted semen analyzers in andrology research and Veterinary practice
Theriogenology 57, 149 – 179
- Verstegen, J., Jolin, E., Phillips, T., Onclin, K. (2006)
Evaluation of the „Minitube SpermVision computer-based automated system“ for dog semen analysis
Theriogenology 66, 671
Annual Conference of the Society-for-Theriogenology, Aug 22 - 26, 2006 St. Paul, MN
- Weitze, K.F. (2001)
Assistierte Techniken
In: Busch, W., Holzmann, A. (Hrsg.): Andrologie-Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren

Verlag Schattauer, Stuttgart, 511 – 517

Weitze, K.F., Petrunkina, A.M. (2007)

Samenkonservierung, biochemische Grundlagen und Prinzipien der Einfrier- und Auftautechniken

In: Busch, W.; Waberski, D. (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren

Verlag Schattauer, Stuttgart, 119 – 131

Wildt, D.E. (1992)

Genetic resource banking for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis

Anim. Reprod. Sci. 28, 247 – 257

Witte, T.S., Schäfer-Somi, S., Kuchar, A., Möstl, E., Iben, C., Aurich, C. (2009)

Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa

Anim. Reprod. Sc., 110, 293 – 305

Woelders, H., Matthijis, A., Engel, B. (1997)

Effect of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing

Cryobiology 35, 93 – 105

Yamashiro, H., Narita, K., Sugimura, S., Han, Y.J., Sugawara, A., Morohaku, K., Nakazato, F., Konno, T., Yoshida, M., Sato, E. (2007)

Trehalose enhanced the freezability of Poodle dog sperm collected by an artificial vagina (AV)

Anim. Reprod. Sci. 102(1 - 2), 165 – 171

Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., Tekeli, T. (2000)

Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing

Theriogenology 54(4), 579 – 585

Zindl, C., Asa, C.S., Günzel-Apel, A.R. (2006)

Influence of cooling rates and addition of Equex paste on cooled and frozen-thawed semen of generic gray (*Canis lupus*) and Mexican gray wolves (*C.l. baileyi*)

Theriogenology 66, 1797 – 1802

12 Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die hilfreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit, sowie für die wertvollen Anregungen und das entgegengebrachte Vertrauen möchte ich mich bei Prof. Dr. A. Wehrend bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Sandra Goericke-Pesch von der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen für die hervorragende Unterstützung während aller Phasen der Dissertation, insbesondere aber für die Hilfestellung, die sie mir im Labor und während der Anfertigung der Dissertationsschrift gab. Vor allem möchte ich mich für die jederzeit umgehend durchgeführten Korrekturen bedanken, die einen großen Anteil am steten Voranschreiten dieser Arbeit hatten.

Vielen Dank an Dr. K. Failing und Frau Sparrenberg von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung für ihre Mithilfe bei der statistischen Auswertung meiner Untersuchungsergebnisse.

Ganz besonderer Dank gilt auch den Beaglen, v.a. Biene, der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie für die zuverlässige und freundliche Mitarbeit während der Vorversuche zu dieser Arbeit und der Animation der Rüden. Auch möchte ich mich ganz herzlich bei den Besitzern der Rüden für die Mitarbeit an dieser Arbeit und die aufgebrachte Geduld bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern danke ich für ihre immerwährende einzigartige Unterstützung in allen Bereichen, die es mir ermöglicht haben, ohne Sorge und mit dem Wissen, dass immer alles gut wird, jede Aufgabe anzugehen.

Bei meiner Schwester Yvonne und meinen Freunden möchte ich mich für ihre immerwährende zuverlässige Unterstützung und ihr Verständnis ganz herzlich bedanken.

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5910-1



9 783835 195910 1