

Kryokonservierung von epididymalem Alpakasperma



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

Marlen Kathrin Auer

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über
<http://dnb.ddb.de>

© 2021 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

Foto Titelseite:

© iStock.com/GlobalP

ISBN 978-3-86345-563-7

1. Auflage 2021

Verlag:

DVG Service GmbH

Friedrichstraße 17

35392 Gießen

Tel.: 0641/24466

info@divg.de

www.divg.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

Kryokonservierung von epididymalem Alpakasperma

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

eingereicht von

Marlen Kathrin Auer

Tierärztin aus Speyer

Gießen 2020

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

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

Gutachter: Prof. Dr. A. Wehrend
PD Dr. habil. M. Sickinger

Tag der Disputation: 09.12.2020

pura vida

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	VII
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Spermagewinnung beim Alpaka	3
2.1.1	Gewinnung post ejaculationem	4
2.1.2	Gewinnung prae ejaculationem	7
2.2	Konfektionierung Alpakasperma	10
2.2.1	Flüssigkonservierung Alpakasperma	12
2.2.1.1	Flüssigkonservierung von ejakuliertem Sperma	13
2.2.1.2	Flüssigkonservierung von Nebenhodensperma	15
2.2.2	Kryokonservierung Alpakasperma	16
2.2.2.1	Kryokonservierung von ejakuliertem Sperma	19
2.2.2.2	Kryokonservierung von Nebenhodensperma	22
3	Material und Methoden	30
3.1	Probanden	30
3.2	Kastration	30
3.3	Vermessung Hoden mit Nebenhoden	32
3.4	Gewinnung Nebenhodensperma	33
3.5	Spermatologische Untersuchung	36
3.5.1	Mikroskopische Untersuchung	36
3.5.1.1	Supravitalfärbung	36
3.5.1.2	Plasmamembranintegrität	36
3.5.1.3	Pathomorphologie	37
3.5.2	Computer assisted sperm analysis (CASA)	38
3.5.2.1	Probenvorbereitung und Befüllung der Messkammer	40
3.5.2.2	Aufbau und Funktionsweise des SpermVision® und AndroVision® Analysesystems	41
3.6	Kryokonservierung	42
3.7	Auftauen	42
3.8	Histologie	43
3.8.1	Fixierung	43
3.8.2	Dehydrierung der Proben	43

3.8.3	Einbettung	43
3.8.4	Anfertigung der histologischen Präparate	44
3.8.5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	44
3.8.6	Lichtmikroskopische Untersuchung	44
3.9	Statistische Methoden	45
4	Ergebnisse	47
4.1	Hodenmaße	47
4.2	Erfolgsquote	47
4.3	Mikroskopische Untersuchung vor Kryokonservierung	48
4.3.1	Supravitalfärbung	48
4.3.2	Spermienmembranintegrität	49
4.3.3	Pathomorphologie	50
4.4	Computer assisted sperm analysis (CASA) vor Kryokonservierung	52
4.4.1	Dichte	52
4.4.2	Motilität	53
4.5	Histologie	54
4.6	Mikroskopische Untersuchung nach Kryokonservierung	56
4.6.1	Supravitalfärbung	56
4.6.2	Spermienmembranintegrität	56
4.6.3	Pathomorphologie	57
4.7	Computer assisted sperm analysis (CASA) nach Kryokonservierung	59
4.7.1	Motilität	59
4.8.	Wirksamkeit der Faktoren Verdünner, Kryokonservierung und Hodenvolumen	59
4.8.1.	Auswirkungen von Verdünner und Kryokonservierung auf die Motilität	59
4.8.2	Auswirkungen von Verdünner und Kryokonservierung auf Eosin-G- Färbung und hypoosmotischen Schwelltest	61
4.8.3	Auswirkungen von Verdünner und Kryokonservierung auf die Pathomorphologie	62
4.9	Effekte des Hodenvolumens	65
5	Diskussion	66

5.1	Diskussion der Fragestellung	66
5.2	Diskussion der Methodik	67
5.2.1	Auswahl der Probanden	67
5.2.2	Spermagewinnung	68
5.2.3	Mikroskopische Untersuchungsmethoden	69
5.2.4	Computer assisted sperm analysis (CASA)	72
5.2.5	Histologie	74
5.3	Diskussion der Ergebnisse	75
5.3.1	Erfolgsquote	75
5.3.2	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung	76
5.3.3	Ergebnisse der Computer assisted sperm analysis (CASA)	80
5.3.4	Histologie	85
5.3.5	Auswirkungen von Kryokonservierung, Verdüner und Hodenvolumen	86
5.4	Schlussbetrachtung	92
6	Zusammenfassung	93
7	Summary	96
8	Literaturverzeichnis	99
9	Anhang	120
9.1	Einstellungen des SpermVision®- und AndroVision®-Analysesystems	120
9.2	Rezepte	120
9.2.1	Eosin-Färbelösung	120
9.2.2	Hypoosmotische Lösung (150 mosmol)	121
9.2.3	Materialien und Durchführungen zur histologischen Aufbereitung	121
9.3	Ergebnistabellen	124
9.4	Abbildungsverzeichnis	131
9.5	Tabellenverzeichnis	132
10	Danksagung	134
	Erklärung	135

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALH	Amplitude of lateral head displacement (Seitliche Kopfauslenkung) in μm
APES	3-Aminopropyltrimethoxysilan
BCF	Beat cross frequency (Kopfauslenkungsfrequenz) in Hz
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CASA	computer assisted sperm analysis (computer-assistierte Spermiennalyse)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EG	Ethylenglykol
Fa.	Firma
fL	Femtoliter
GL	Glycerol
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
KGGA	Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen
ICSI	intracytoplasmatic sperm injection (intrazytoplasmatische Spermieninjektion)
IVF	in vitro Fertilisation
KB	Künstliche Besamung
KV	Künstliche Vagina
LIN	Linearität
mol/ molar	Molarität = Stoffmengenkonzentration, Einheit mol/ l
m-TESE	microdissection-TESE (testikuläre Spermienextraktion unter Sichtkontrolle durch ein Operationsmikroskop)
Max.	Maximum
Med.	Median
MESA	microsurgical epididymal sperm aspiration (mikrochirurgische epididymale Spermienaspiration)

Min.	Minimum
Mio.	Million/ Millionen
n	Probenzahl
OIF	Ovulation induzierender Faktor
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PESA	percutaneous epididymal sperm aspiration (perkutan epididymale Spermien Aspiration)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SAC	South American Camelids (Neuweltcameliden)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumlaurylsulfat)
Sek	Sekunden
sog.	Sogenannt
STR	Straightness (Geradlinigkeit)
Tab.	Tabelle
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TESE	Testicular sperm extraction (testikuläre Spermienextraktion)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v. a.	vor allem
VAP	Velocity average path (Pfadgeschwindigkeit: Geschwindigkeit über die gemittelte Bahn) in $\mu\text{m/s}$
VCL	Velocity curve line (Spurgeschwindigkeit: Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn) in $\mu\text{m/s}$
VSL	Velocity straight line (Progressivgeschwindigkeit) in $\mu\text{m/s}$
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

1 Einleitung

Zur Wollgewinnung und als Freizeittier gewinnen Alpakas in der Bundesrepublik an Bedeutung und es wird die Zucht qualitativ hochwertiger Tiere angestrebt. Um einen entsprechenden Zuchtfortschritt zu bewirken, wird bei der Selektion auf Körperbau, Faser, Gesundheit und züchterische Qualität der Tiere geachtet. Aufgrund der ökonomischen Bedeutung einzelner Vatertiere, tierschutzrechtlicher Aspekte bei Transporten und Krankheitsverbreitung steigt die Nachfrage nach Reproduktionstechnologien.

Die Besamung gewinnt im Zuge der selektiven Verpaarung zunehmend an Bedeutung. Die Erfolgsraten dieser Methode bei Alpakas sind im Vergleich zu anderen Haustierarten mäßig (Abraham et al. 2017; Morton et al. 2007; Terreros et al. 2015). Dies ist unter anderem darin begründet, dass keine optimierten und zuverlässigen Protokolle zur Kryokonservierung von Alpakasperma bis dato vorliegen (Terreros et al. 2015; Santiani et al. 2005).

Die Kryokonservierung von Spermia stellt die älteste etablierte Methode zur Keimzell-Aufbewahrung dar, die seit über 50 Jahren bei Nutztieren eingesetzt wird (Choez et al. 2017; Gómez-Quispe et al. 2016a; Gomez-Quispe et al. 2016b; Kershaw-Young und Maxwell 2012; Durand et al. 2016; Kershaw-Young und Maxwell 2011; Morton et al. 2007; Morton et al. 2010b; Morton et al. 2010a; Meza et al. 2018; Mamani-Mango et al. 2019; Santiani et al. 2016; Terreros et al. 2015; Vasquéz et al. 2012). Der Vorteil von Samenzellen ist, dass sie zahlreich vorliegen und einfacher zu gewinnen sind als Eizellen (Morrell und Mayer 2017). Im Laufe der Jahre haben sich daher bei schätzungsweise 300 Spezies Protokolle zur Kryokonservierung von Spermien etabliert (Morrell und Mayer 2017).

Das Tiefgefrieren von Alpakasperma ist noch keine gängige Praxis. Die Gründe hierfür sind vielfältig (Choez et al. 2014; Bravo et al. 2000a). Einerseits ist die Gewinnung von Alpakasperma post ejaculationem mithilfe eines sog. Mannequins und einer künstlichen Vagina zeitintensiv und erfordert entsprechende Ausrüstung. Zum anderen hat ejakuliertes Alpakasperma eine ausgesprochen zähflüssige Konsistenz, was die weitere Verarbeitung erschwert. Ferner hat nicht jedes gewonnene Ejakulat ausreichende Qualität um konserviert oder zur Besamung eingesetzt zu werden. Aufgrund zu geringer Konzentration und Motilität der Spermien kann es unter anderem dazu kommen,

dass entsprechende Proben und Spendertiere bei Untersuchungen aussortiert werden (Durand et al. 2016; Flores et al. 2002; Gómez-Quispe et al. 2016a). Alle bisherigen Versuche der Kryokonservierung führten zu minderer Samenqualität, da Alpaka-sperma stark unter den Einfrier- und Auftauvorgängen leidet (Morton et al. 2010b; Santiani et al. 2005).

Eine Alternative stellt die Kryokonservierung von Nebenhodensperma dar. Das Sperma kann dabei post castrationem, aber auch post mortem gewonnen werden. Besonders interessant ist diese Gewinnungsmethode daher zur Erhaltung wertvollen genetischen Materials von nicht deckfähigen oder verstorbenen Vatertieren.

Ziel dieser Arbeit war es, folgende Fragen zu beantworten:

- Lässt sich Sperma aus dem Nebenhoden des Alpakas durch Anschneiden gewinnen?
- Lässt sich ein Protokoll zur Kryokonservierung von Nebenhodensperma etablieren?
- Wie werden Nebenhodenspermien durch Gefrier- und Auftauvorgänge beeinflusst?

2 Literaturübersicht

2.1 Spermagewinnung beim Alpaka

Das Paarungsverhalten der Alpakas weist einige Besonderheiten auf, was die Spermengewinnung im Vergleich zu anderen Haussäugetierarten erschwert. Alpakahengste erreichen mit erst 30 bis 36 Monaten die Zuchtreife, wenn die Verwachsungen von Penis und Präputium vollständig gelöst sind (Knauf et al. 2008). Das Lösen der Verwachsungen beginnt im Alter von ca. 13 bis 15 Monaten und geht mit Anstieg des Plasmatosteronspiegels der Tiere einher (Bravo et al. 2000a; Tibary et al. 2005). Andere Quellen räumen ein, dass die Spermaproduktion bereits im Alter von 10 bis 12 Monaten einsetzen kann (Smith et al. 1994), eine vollständige Reife aber erst mit fünf Jahren erreicht wird (Stelletta et al. 2011).

In unseren Breitengraden zeigen Neuweltcameliden zu jeder Jahreszeit sexuelle Aktivität und gebären somit auch das gesamte Jahr über (Smith et al. 1994; Abraham et al. 2017). Dagegen zeigt sich in Südamerika eine Saisonalität von November (Frühjahr) bis Mai (Herbst) (Flores et al. 2002). Bis dato ungeklärt ist, ob diese Saisonalität auf das Nahrungsangebot oder die klimatischen Verhältnisse zurückzuführen ist (Abraham et al. 2017). Das traditionelle Zuchtmanagement basiert auf der optimalen Nutzung der saisonal variierenden Umweltbedingungen. Interessanterweise sind Alpakas in Südamerika, die nach Geschlechtern getrennt gehalten und nur unregelmäßig zur Paarung zusammengeführt werden, auch das ganze Jahr über sexuell aktiv (Flores et al. 2002). Generell sinkt ca. zwei Wochen nach der Einführung eines Hengstes in eine Herde rezeptiver Stuten die sexuelle Aktivität enorm (Smith et al. 1994).

Das Paarungsverhalten der Alpakas lässt sich in Balz- und Kopulationsphase unterteilen. Nachdem der Hengst die Stute gejagt oder durch mehrmaliges Aufreiten zum Niederlegen in Brust-Bauch-Lage gebracht hat, beginnt die Kopulation. Dabei liegt das männliche Tier mit erhobenem Kopf und Rumpf auf der Stute, sodass seine Ellbogen über ihren Schultern platziert sind und seine Hinterbeine flach auf dem Boden liegen (Novoa 1970). Auf die Suchbewegungen des erigierten Penis folgt die sog. Intromissio, wobei die Hengste mit Ohrenzittern, Schwanzschlagen, Blähen der Nüstern und v.a. Vokalisation ihre Erregung zum Ausdruck bringen (Novoa 1970). Die Paarungsdauer variiert zwischen 3 und 65 Minuten, wobei die Durchschnittsdauer 20 Minuten beträgt

(Knauf et al. 2008). Diese Zeitspanne ist abhängig von Rasse, Alter der Tiere, Jahreszeit und Anzahl der täglichen Paarungen pro Hengst (Tibary und Vaughan 2006). Zusätzlich spielt die Herdenzusammensetzung eine wichtige Rolle. So ist die durchschnittliche Kopulationsdauer in Herden mit mehreren Hengsten wesentlich kürzer, da die Gefährdung durch Angriffe anderer Vatertiere für das männliche Tier hier während des Paarungsaktes erhöht ist (Smith et al. 1994). Trächtigkeitsrate und Länge der Paarung korrelieren nicht (Tibary und Vaughan 2006).

Während der Kopulation kommt es zu ca. 40 Kontraktionen der Urethra, die über die gesamte Dauer gleichmäßig verteilt sind (Bravo et al. 2002). Bei mehrmaligen Ejakulationen wird tropfenweise Sekret abgegeben. Der Samen wird tief intrauterin, in beiden Gebärmutterhörnern, deponiert (Morton et al. 2008e). Die multiplen Ejakulationen wirken sich auch auf einige Spermaparameter aus. So nimmt die Spermiedichte mit zunehmender Kopulationsdauer ab, hingegen werden Beweglichkeit, Anteil lebender Spermien und der Anteil morphologisch veränderter Spermatozoen nicht signifikant beeinflusst (Bravo et al. 1997b).

2.1.1 Gewinnung post ejaculationem

Die Gewinnung von ejakuliertem Alpakasperma ist schwierig, aufgrund des Paarungsverhaltens der Alpakas in liegender Position mit langer Paarungsdauer, der intrauterinen Deponierung und der viskösen Konsistenz des Samens (Morton et al. 2010a; Adams et al. 2009). Deshalb wurden im Laufe der Zeit verschiedene Methoden hierzu erprobt.

Mithilfe intravaginaler Kondome und Schwämme konnte kein Sperma in befriedigender Menge und Qualität gewonnen werden (San-Martin et al. 1968). Diese Hilfsmittel beeinflussten negativ die Kopulationsdauer, das Verhalten der Hengste und die Qualität des Spermas (Morton et al. 2008a). Bei Aspiration des Ejakulates aus der Vagina nach der Paarung weist das gewonnene Material oft Verunreinigungen mit Urin, Blut und Zellen auf. Zudem befindet sich der größte Teil des Samens im Uterus, weshalb diese vaginal gewonnene Portion nicht als repräsentativ für die gesamte Probe angesehen werden kann (Morton et al. 2008a). In der Literatur liegen des Weiteren Messwerte von Sperma aus Elektroejakulation vor (Rodriguez et al. 2014). Im Vergleich mit Ejakulat anderer Gewinnungsmethoden war das Sperma hier qualitativ minderwertig, von erniedrigter Spermienzahl und wies Verunreinigungen durch Urin auf

(Lichtenwalner et al. 1996). Überdies ist die Elektroejakulation tierschutzrechtlich bedenklich, da eine Sedation oder Narkose zur Analgesie vonnöten ist (Morton et al. 2010a). Das Anlegen einer Fistel in Urethra oder Samenstrang zur Spermagewinnung ist aufgrund des Narkose- und Operationsrisikos kritisch zu beurteilen.

Die am weitesten verbreitete Methode ist die Nutzung einer künstlichen Vagina (KV) zur Samengewinnung post ejaculationem. In den vergangenen Jahren wurden daher viele Modifikationen zur Optimierung dieser Vorgehensweise entwickelt. Das mithilfe der KV gewonnene Ejakulat entspricht in Zusammensetzung und Qualität am ehesten dem im natürlichen Deckakt ejakulierten Sekret (Vaughan et al. 2003c). Als Komplikation traten bei Untersuchungen zur Kryokonservierung von ejakuliertem Lamasperma Verunreinigungen mit Urin auf (Aller et al. 2003). Die Kontamination war zum Teil (bei 9 von 90 Absamversuchen) eine Ursache für die Unbrauchbarkeit von Proben (Aller et al. 2003). Vorteilhaft bei Benutzung der KV ist, dass bei dieser Methode auch Libido, Sexualverhalten und Kopulationsdauer beurteilt werden können (Morton et al. 2010a; Morton et al. 2008a). Diese drei Aspekte können umgekehrt auch Probleme bei der Probensammlung bedingen. Bei Aller et al. (2003) stellten sich fehlende Libido (14 von 90 Versuchen) und in fünf Fällen unvollständige Teilejakulationen als Problem der Samengewinnung dar. Aus diesem Grund konnten bei 90 Absamversuchen nur 62 verwertbare Proben gewonnen werden (Aller et al. 2003).

Die KV kann zusammen mit einer aufnahmefähigen Stute, in einem Dummy oder in einem Surrogat hinter einer Stute in Brust-Bauch-Lage eingesetzt werden. Es wurden bereits künstliche Vaginen aus unterschiedlichen Materialien eingesetzt. Zudem wurden Modelle ohne und mit Imitation der Cervix durch Einengung des Lumens erprobt. Das manuelle Absamen von Lamas in eine KV erwies sich als nicht praktikabel (Lichtenwalner et al. 1996). In der Anwesenheit eines rezeptiven weiblichen Tieres ist es hingegen möglich den Penis des aufgerittenen Hengstes manuell in die KV zu lenken und so das Ejakulat aufzufangen (Adams et al. 2009). Beim Lama ist die Anwendung der KV in einem Surrogat beschrieben, vor dem sich wiederum eine empfängliche Stute befand (Lichtenwalner et al. 1996). Die Platzierung der Tiere und des Surrogats auf einem geschlossenen Podest ermöglichte jederzeit Zugang zur KV. So war die Fraktionierung des Ejakulates durch Wechsel der Auffanggefäße während des Absamens möglich und durch permanenten Austausch des Wassers der KV wurde deren Temperatur und Druck über die gesamte Kopulationsdauer konstant gehalten.

Die am häufigsten angewandte und praktikablere Methode, stellt die Verwendung einer Imitation der Stute dar. Der eingesetzte Dummy besteht aus einem Holzrahmen in Form eines in Brust-Bauch-Lage liegenden Alpakas, der mit Fell bespannt ist. Eine Aussparung in der Rückseite bietet Zugang zur KV, die unter dem Dummy positioniert wird. Ergänzend kann noch ein Wärmekissen eine physiologische Körpertemperatur des Dummys simulieren. Die Absamung des Hengstes kann in natürlicher Körperhaltung erfolgen (Lichtenwalner et al. 1996; Garnica et al. 1993). Essentiell ist die initiale Gewöhnung des Hengstes an die KV und das Trainieren des Absamens an dieser. Neben paarungswilligen Stuten dienen auch kopulierende Artgenossen in unmittelbarer Nähe der Stimulation des Hengstes (Adams et al. 2009). Diese Stimuli sind nicht nur beim Absamen an Stuten, sondern auch in Kombination mit Dummys und Surrogaten bedeutsam (Garnica et al. 1993; Lichtenwalner et al. 1996).

Die beim Alpaka benutzte KV gleicht den bei Schafen eingesetzten Modellen. Ein Rohr, zumeist aus PVC, von ca. 30 bis 50 cm Länge und ca. 5 bis 7 cm Durchmesser wird mit einem Schlauch aus Latex oder Silikon ausgekleidet. An einem Ende schließt sich ein Sammelgefäß an, so dass dieser Übergang konisch zuläuft (Morton et al. 2008a). Zur bestmöglichen Imitation der natürlichen Vagina wird die KV erwärmt. Hierzu kann warmes Wasser in die KV gefüllt werden, wobei sich in der Literatur Empfehlungen von 40 °C (Baer und Hellemann 1999), 60 °C (Morton et al. 2008a), 45 °C (Garnica et al. 1993), 48 bis 52 °C (Vaughan et al. 2003a) und 37 bis 39 °C beim Lama (Schwalm 2006) finden. Durch zusätzliche Isolierung der KV kann der Wärmeverlust des Wassers auf ein Minimum reduziert werden (Morton et al. 2008a). Eine andere Möglichkeit stellt die Verwendung eines Heizkissens dar, das die KV umhüllt und somit ebenfalls für konstante Temperaturen sorgt (Morton et al. 2010a; Adams et al. 2009).

Es finden sich widersprüchliche Angaben und Ergebnisse in der Literatur über die Nachahmung der Cervix und die daraus resultierenden Auswirkungen. So beschreiben Bravo et al. (1997a) den erfolgreichen Einsatz einer künstlichen Cervix. Im Gegensatz dazu wurde vom Abbruch der Kopulation und ausbleibender Ejakulation bei deren Einsatz berichtet (Morton et al. 2008a).

Zudem wurden verschiedene Auffanggefäße erprobt. Neben Glasbehältnissen für die Ejakulatgewinnung bei Kamelen, kamen auch Kunststoffröhrchen verschiedener Größen zum Einsatz. Diese befanden sich in einem wassergefüllten Behälter, der das

Gefäß dauerhaft auf ca. 35 bis 37 °C erwärmt. Im Vergleich wiesen die Alpakaspermien im Glasgefäß weniger pathomorphologische Veränderungen auf (Morton et al. 2008a). Das Samenauffangbehältnis wurde trocken oder bereits mit Verdünner befüllt verwendet, wobei Verdünner mit und ohne Katalasezusatz zum Einsatz kamen (Morton et al. 2010a). Hierbei hatte sich TRIS-Puffer als Medium bewährt, da es die Viskosität reduzierte und die Spermaqualität verbesserte (Morton et al. 2010a). Typischerweise ist das mit der KV gewonnene Ejakulat größtenteils schaumig (Aller et al. 2003), was auf die Bewegungen des Penis in der KV zurückzuführen ist. Die Anwesenheit weiblicher Tiere wirkte sich nicht auf Kopulationsdauer und Spermaparameter aus (Morton et al. 2010a).

2.1.2 Gewinnung prae ejaculationem

Zur Gewinnung von Nebenhodensperma können die bei Kastration oder Schlachtung männlicher Tiere entfernten Hoden mit Nebenhoden verwendet werden. Dies ist ökonomisch und hinsichtlich tierschutzrechtlicher Aspekte interessant, da die als „Abfallprodukte“ anfallenden Organe verwertet werden können.

Es finden sich Angaben in der Literatur über den Transport in PBS getränkten Gazetupfern und unter permanenter Kühlung auf ca. 4 °C (Abraham et al. 2016; Kershaw-Young und Maxwell 2011; Morton et al. 2007; Morton et al. 2010a; Morton et al. 2010b; Vasquéz et al. 2012), sowie in Kochsalzlösung (0,9 %) bei 5 °C (Choez et al. 2017). Bei einer Untersuchung erfolgte der Transport ins Labor über 3 Stunden bei 25 bis 30 °C (Mamani-Mango et al. 2019). Zum Teil blieben Angaben über die Bedingungen des Transportes aus (Terrerros et al. 2015).

Am Verarbeitungsort angelangt, präparierten Morton et al.; Morton et al. (2010a; 2007) und Kershaw-Young und Maxwell (2011) initial stets die Nebenhoden frei und reinigten diese. Teilweise wurden oberflächliche Blutgefäße punktiert und das abgelassene Blut entfernt (Morton et al. 2010b). Zum Ausschwimmenlassen der Spermien wurden die Nebenhoden mit einer Skalpellklinge in feine Stücke zerkleinert. Die Nebenhodenstücke wurden in 4 ml eines geeigneten Mediums verbracht, um die Spermien, z. B. in einer Petrischale, ausschwimmen zu lassen. Zu diesem Zweck kamen bereits Androhep® (Morton et al. 2010a; Morton et al. 2007) und PBS-BSA (Kershaw-Young und Maxwell 2011) zum Einsatz. Die Organteile wurden hierzu

30 Minuten in der jeweiligen Flüssigkeit bei 37 °C belassen. Ein sich anschließender Zentrifugationsschritt bei 300 g führte zur Sedimentation der Spermien, welche dann in einem geringeren Volumen des jeweils verwendeten Verdünners resuspendiert wurden um damit weiter zu arbeiten.

In peruanischen Arbeiten finden sich analoge Vorgehensweisen (Choez et al. 2014; Terreros et al. 2015). 2,50 ml (Terreros et al. 2015) bzw. 4 ml (Choez et al. 2014) eines Verdünners aus Magermilch, Eigelb und Fruktose wurden zum Ausschwimmenlassen der Spermien eingesetzt und weiter verarbeitet. Letztgenannter Arbeitsschritt wurde bei Terreros et al. (2015) bei 37 °C über 5 Minuten ausgeführt. Dem entgegen betrug die Temperatur in der zweiten peruanischen Studie 35 °C und es wurden keine Zeitangaben gemacht (Choez et al. 2014).

Abraham et al. (2017) gewannen von kastrierten und verstorbenen Tieren Nebenhoden mit Hoden und Skrotum. Die Organe wurden in Tüten verpackt ins Labor verbracht. Dies erfolgte bei den Nebenhoden aus Kastrationen bei 4 °C und unter Zusatz von PBS-Puffer, wobei der Transport zum Labor 24 bis 48 Stunden dauerte. Bei den Nebenhoden der verstorbenen Tiere wurden keine Angaben zu den Bedingungen des Transports gemacht. Im Labor erfolgte die Vermessung der Hoden und anschließend die Präparation und Zerkleinerung des Nebenhodenschwanzes in vier bis fünf Teile. Die Nebenhodenstücke wurden in eine Petrischale mit jeweils 1 ml vorerwärmtem Verdünnung gegeben. Bei den Nebenhoden post castrationem wurden AndroMed® und INRA96®, und bei den Nebenhoden der verstorbenen Tiere PBS-Puffer eingesetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ über 10 Minuten. Das Vorhandensein von Spermien wurde im Phasenkontrastmikroskop mittels 20er und 40er Objektiv beurteilt.

Mamani-Mango et al. (2019) bestimmten initial Gewicht, Länge und Umfang von Alpakahoden nach Schlachtung. Die Spermagewinnung erfolgte mittels retrograder Spülung des Ductus deferens mitsamt Nebenhodenschwanzes und durch Zerkleinern der Nebenhoden (Mamani-Mango et al. 2019). Zur Spermagewinnung wurde jeweils 1 ml Tris-Eigelb- oder Bioxcell®-Verdünnung eingesetzt. Es wurden keine Angaben zur Dauer des Ausschwimmenlassens nach Zerkleinern der Nebenhoden gemacht.

In südamerikanischen Studien wurden Proben aus dem Vas deferens gewonnen (Durand et al. 2016; Gómez-Quispe et al. 2016a; Meza et al. 2018; Pacheco et al.

2017; Pacheco-Curie et al. 2014). Unter allgemeiner und lokaler Anästhesie wurden die Samenleiter dabei subkutan umgelenkt. An der Innenseite der Oberschenkel wurden die Samenleiter an der Haut fixiert und Fisteln angelegt, um die Probenentnahme zu ermöglichen. Meist wurde dazu die Haut über dem Penis auf ca. 4 cm Länge eröffnet und lateral davon ausgehend die Samenleiter präpariert (Pacheco-Curie et al. 2014; Gómez-Quispe et al. 2016a; Durand et al. 2016). Meza et al. (2018) setzten kleine laterale Schnitte am Skrotum zur Darstellung und Präparation der Samenleiter. Die geschaffenen Fistelöffnungen wurden postoperativ (Meza et al. 2018) und vor Probengewinn gereinigt (Gómez-Quispe et al. 2016a). Durch manuelle Massage der Samenleiter wurde der Transport der Spermien in Richtung Fistel herbeigeführt. Traten erste Tropfen aus der Fistel aus, wurden die Proben abgesaugt. Meza et al. (2018) nutzten hierzu eine auf 37 °C vorgewärmte Spritze und überführten das gewonnene Material unverzüglich in 0,40 ml TRIS-Verdünner (37 °C). Bei den restlichen genannten Quellen erfolgte das Absaugen analog zu Perez et al. (2014) mit Tuberkulinspritzen, die 0,50 ml des jeweiligen Verdünners enthielten.

In der Humanmedizin sind verschiedene chirurgische Methoden zur Samengewinnung etabliert, die ohne Entfernung von Hoden und Nebenhoden auskommen (Cha et al. 1997). So gibt es die Mikroepididymale Spermien Aspiration (MESA), bei der nach Eröffnung des Skrotums und Präparation des Nebenhodens mithilfe eines Operationsmikroskopes der Ductus epididymis eröffnet und die darin enthaltene Flüssigkeit gewonnen wird (Cha et al. 1997). Alternativ kann eine Perkutane Spermien Aspiration (PESA) durchgeführt werden, bei der blind Inhalt aus dem Nebenhoden aspiriert wird, wobei eine mehrmalige Punktion von Nöten sein kann (Meniru et al. 1998). Bei der sogenannten modified PESA wird durch Eröffnung des Skrotums vor der Punktion des Nebenhodens ein Operationsfeld geschaffen (Cha et al. 1997). Die derart gewonnene Nebenhodenflüssigkeit wird mit einer verdünnergefüllten Spritze gesammelt und nach einmaligem Waschen im gleichen Medium resuspendiert.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Gewinnung testikulären Samens. Hier gibt es neben der Punktion des Hodengewebes ohne Sichtkontrolle die Möglichkeit der Biopsie. Die Entnahme der Biopsie kann blind erfolgen, dann wird das angewandte Verfahren TESE (testicular sperm extraction) genannt. Die Hodenbiopsie kann auch unter Sichtkontrolle eines Operationsmikroskopes erfolgen (m-TESE:

microdissection-TESE), bei der die Gewebentnahme aus unterschiedlichen Lokalisationen nach vorheriger Eröffnung des Skrotums und der Tunica albuginea erfolgt (Karacan et al. 2014). Das gewonnene Gewebe wird mit dem Skalpell zerkleinert, eine kleine Menge Medium zugegeben und anschließend schwimmen die Spermien aus. Bei den beschriebenen Methoden kann es bei den Patienten zu Entzündungsreaktionen und Hämatombildung an Hoden und Nebenhoden kommen, wobei die Verfahren unter Sichtkontrolle den Vorteil der Möglichkeit der Blutstillung intra operationem bieten.

Das Sperma von Patienten mit obstruktiver und nichtobstruktiver Azoospermie war von schlechter Qualität, Quantität und Motilität (Cha et al. 1997). In Kombination mit Intra-zytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI) erzielte der gewonnene Samen dieser Patienten dennoch gute Befruchtungsraten (Cha et al. 1997; Karacan et al. 2014). Beim Nebenhodensperma bestand zudem keinerlei Unterschied in den Befruchtungsraten zwischen kryokonserviertem und frisch verarbeitetem Material (Cha et al. 1997). Generell wird die Gewinnung von Nebenhodensperma bei obstruktiver Azoospermie empfohlen, PESA insbesondere bei Obstruktionen caudal des Nebenhodens und MESA bei irreparablen Verlegungen im Bereich des Nebenhodens (Lin et al. 2000). Bei nicht obstruktiver Azoospermie ist die Spermengewinnung aus dem Hoden, v. a. das Verfahren der m-TESE, sehr effektiv (Karacan et al. 2014).

2.2 Konfektionierung Alpakasperma

Das Hauptproblem der Konfektionierung von Alpakasperma besteht in der vergleichsweise geringen Dichte des Ausgangsmaterials. So können pro Vatertier und Zeiteinheit nur wenige Besamungsportionen gewonnen werden, was die KB beim Alpaka derzeit unökonomisch macht (Gauly 2011). Aus diesem Grund findet die KB bei den Neuweltcameliden nur vereinzelt Einsatz und ist kein Standard in der Zucht wie bei anderen Haustierarten. Zur Flüssig- und Kryokonservierung von Neuweltcamelidensamen wurden bisher v. a. Verdüner eingesetzt, die sich bei der Konservierung von Bullen- und Schafbocksamen bewährt hatten.

Hauptunterschied in der Verarbeitung ist die enorme Zähflüssigkeit ejakulierten Alpakaspermas im Vergleich zu epididymalem Samen. Bis dato liegt kein eindeutiger Beweis für die Ursache der viskösen Natur von Camelidensamen vor

(El-Bahrawy et al. 2017). Mucopolysaccharide im Seminalplasma, welches der Hauptbestandteil des Ejakulates ist (Garnica et al. 1993), wurden in den vorliegenden Quellen übereinstimmend als Verursacher der Konsistenz vermutet (Garnica et al. 1993; El-Bahrawy et al. 2017). Stand das Ejakulat bei 37 °C, kam es durchschnittlich innerhalb von 24 Stunden zur Verflüssigung. In der Literatur wurden Varianzen dieser Zeitdauer von 8 bis 48 Stunden angegeben (Tibary und Vaughan 2006). Bei Raumtemperatur benötigte die Liquefaktion beim Alpaka 24 bis 48 Stunden (Trasorras et al. 2017). Trasorras et al. (2017) werteten dies als zu lange für die weitere Nutzung des verflüssigten Spermas. Einige Quellen erwähnten das teilweise Ausbleiben der Liquefaktion (Trasorras et al. 2017; Carretero et al. 2015).

Mechanisch wurde versucht die Verflüssigung durch pipettieren (Morton et al. 2008c) und zentrifugieren (El-Bahrawy et al. 2017) zu beschleunigen. Hochleistungs-Niederfrequenz-Ultraschall kam bei den jüngsten vielversprechenden Versuchen zur Liquefaktion von Camelidensamen zum Einsatz (El-Bahrawy et al. 2017). Des Weiteren kann durch Zusatz von Enzymen wie Katalase, Amylase, Papain, Bromelain, Trypsin, Collagenase, Fibrolysin und Hyaluronidase die Viskosität reduziert werden (El-Bahrawy et al. 2017; Tibary und Vaughan 2006; Trasorras et al. 2017). Entscheidend war hierbei Dosierung und Einwirkdauer so zu wählen, dass negative Effekte auf die Spermien minimiert werden (Tibary und Vaughan 2006). Katalase zeigte in Vergleichsstudien die höchste Wirksamkeit mit den geringsten Auswirkungen auf die Spermaqualität (Bravo et al. 2000b).

Die Nutzung epididymalen Spermas vereinfacht die Verarbeitung dahingehend, dass direkt die Verdünnung und weitere Verarbeitung durchgeführt werden kann.

Tibary und Vaughan (2006) und Garnica et al. (1993) vermuteten, dass die weiteren Bestandteile des Ejakulates Lipide, Phospholipide und Proteine wahrscheinlich eine Rolle bei der Maturation und dem Schutz der Plasmamembranintegrität der Spermien spielen. Kalzium und Chlorid waren die in höchster Konzentration vorliegenden Ionen. Eine Besonderheit war das Vorkommen von Fructose und Zitronensäure in nur geringen Mengen, was Bravo et al. (2000a) auf das Fehlen einer Samenblasendrüse (Glandula vesicularis) zurückführten.

Neuere Studien belegten zudem die Existenz eines Ovulationsauslösenden Faktors (OIF), der systemisch verabreicht im weiblichen Organismus zur Erhöhung des LH-Spiegels, in über 90% der Fälle zur Ovulation und anschließend zur Bildung großer

Gelbkörper führte (Adams et al. 2005). Dieser Effekt konnte auch in artübergreifenden Experimenten nachgewiesen werden (Bogle et al. 2011). Der Nachweis von OIF im Seminalplasma erfolgte sowohl bei Arten mit induzierter Ovulation, als auch bei spontan ovulierenden Tieren (Ratto et al. 2006). Im Vergleich zu anderen Haussäugetierarten wies Alpakasperma eine geringe Dichte auf, die bei Bravo et al. (2000a) mit 82 bis 250 Mio./ ml Samenzellen, und bei australischen Autoren mit durchschnittlich 30 bis 205 Mio./ml angegeben wurde (Morton et al. 2010a). Eine hohe Varianz zwischen den Hengsten zeigte sich unabhängig von der Gewinnungsmethode, sowohl bei Ejakulaten, als auch bei epididymalem Samen (Morton et al. 2007; Morton et al. 2010a).

Bei Ejakulaten konnte je nach Viskosität nur oszillatorische Bewegung festgestellt und erst mit zunehmender Verflüssigung, wie bei epididymalem Sperma, Vorwärtsbeweglichkeit gemessen werden.

Der Anteil pathomorphologischer Spermien bei Cameliden ist im Allgemeinen höher als bei anderen Nutztierarten, wobei sämtliche Veränderungen gefunden werden konnten, die auch bei anderen dieser Tierarten auftreten (Tibary und Vaughan 2006). Ebenso diesen Parameter betreffend gab es Unterschiede in den vorliegenden Studien. So wurde von einem Anteil physiologischer Spermien von bis zu 84,10 % berichtet (Bravo et al. 2000a). Dagegen fanden sich in anderen Quellen deutlich mehr pathologisch veränderte Spermatozoen, wie z. B. beim Lama 60,30 % abnormale Spermien (Lichtenwalner et al. 1996).

2.2.1 Flüssigkonservierung Alpakasperma

Camelidensamen zeigte sich höchst anfällig für Schäden durch Gefrier- und Auftauvorgänge weshalb bisher keine optimalen Protokolle etabliert werden konnten (Morton et al. 2010b). Dies machte die Flüssigkonservierung von Alpakasperma für die Weiterentwicklung der künstlichen Besamung bei dieser Tierart bedeutsam.

In den bisher durchgeführten Studien zu Flüssigkonservierung konnten nur wesentlich schlechtere Trächtigkeitsraten erzielt werden als beim Einsatz von unverdünntem Frischsamen (Adams et al. 2009; Morton et al. 2008d).

Aller et al. (2003) berichteten beim Lama von einer Trächtigkeitsrate von 7,90 % bei Stuten, die mit kryokonserviertem Sperma besamt wurden. Demgegenüber stand eine deutlich höhere Trächtigkeitsrate von 21,70 % nach Versamung von Frischsperma, welches mit demselben Verdünner, allerdings ohne Zusatz von Kryoprotektoren, versetzt worden war.

Die metabolische Aktivität der Spermien bei der Flüssigkonservierung wird durch erniedrigte Temperaturen, leicht saures Milieu und anaerobe Bedingungen herabgesetzt und dadurch die Haltbarkeit erhöht (Morton et al. 2008d).

Vaughan et al. (2003e) führten als Vorteil der Flüssigkonservierung auf, dass weniger Spermien pro Besamungsdosis notwendig sind als bei Verwendung gefrorenen Samens. Der Grund dafür ist, dass nur geringe Auswirkungen der Flüssigkonservierung auf die Spermaqualität nachgewiesen wurden. Zudem war die Lagerung günstig und flüssigkonserviertes Sperma unter Feldbedingungen praktisch anzuwenden (Vaughan et al. 2003d). Nachteil stellte die auf einige Tage begrenzte Haltbarkeit dar. Weil der Stoffwechsel der Spermatozoen bei dieser Vorgehensweise nur reduziert ist, kommt er nach einiger Zeit zum Erliegen.

2.2.1.1 Flüssigkonservierung von ejakuliertem Sperma

In einer Untersuchung, bei der fünfzehn verschiedene Verdünner zur Flüssigkonservierung von Ejakulat verglichen wurden, lieferte Triladyl® in einer Verdünnungsrate von 4:1 die besten Ergebnisse. Nach 24 Stunden war die Spermienmotilität der triladylbehandelten Proben bei 50 % und nach 48 Stunden lediglich auf 45% gesunken. Alle Verdünner waren zuvor erfolgreich bei der Flüssigkonservierung von Cameliden- oder Haussäugetiersamen erprobt worden. Insgesamt wiesen die mit eigelb- und glycerolhaltigen Medien (Sheep Red Extender, Camel Green Extender, Triladyl® und Biladyl®) versetzten Proben die höchsten Aktivitätsraten auf. Die Messungen erfolgten jeweils nach 24 und 48 Stunden Lagerung bei 4 °C. Zur Verlustrate bezüglich der Motilität trafen die Autoren keine Aussage, da keine Messungen direkt nach Zusatz des Verdünners durchgeführt wurden. Bei Verdünnern mit Casein (Bovine Extender, Kenney Plain und Texas A&M) und ohne tierische Produkte (Biociphos Plus, Bioxell® und Andromed®) war der Anteil lebender Spermien und deren Motilität nach 24 Stunden deutlich reduziert. Andromed®-konservierter Samen wies nach 24 Stunden 35 bis 40 % Motilität auf, die nach 48 Stunden auf 15 % sank.

Zusätzlich wurden in dieser Studie unterschiedliche Kühlmethoden verglichen. Dabei wurde die gleichmäßigste Abkühlung auf 4 °C durch Verbringen der Proben in ein Wasserbad gleicher Temperatur erzielt, welches dann im Kühlschrank gekühlt wurde. Das langsame und gleichmäßige Absinken der Proben temperatur auf 4 °C über 1,5 bis 2 Stunden war am schonendsten, was sich in der Spermaaktivität widerspiegelte. Die Entfernung des Seminalplasma durch Zentrifugation erwies sich aufgrund massiver Reduktion des Anteils lebender und motiler Spermien als nicht praktikabel (Vaughan et al. 2003a).

In weiteren Versuchen wurden neben verschiedenen Verdünnern und Verdünnungsraten die Lagerung bei 4 und 15 °C untersucht (Morton et al. 2008d). Hierbei wurden die Medien Biladyl®, Salamon´s, Adrohep® und Triladyl® verwendet, wobei die beiden letztgenannten in unterschiedlichen Mengenverhältnissen zum Sperma eingesetzt wurden. Die Analyse der Spermaparameter erfolgte direkt, sowie 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Verdünnung. Bei allen eingesetzten Medien kam es nach 72 Stunden zu einem Abfall der Akrosomenintegrität. Hinsichtlich der Motilität erzielte Biladyl® in einer Verdünnung von 1:4 die besten Ergebnisse. Bis zu einer Lagerungsdauer von 72 Stunden waren die Ergebnisse bei 4 und 15 °C gleich. Für längere Lagerung empfehlen die Autoren die kühlere Temperatur von 4 °C. Temperaturunabhängig wies das analysierte Sperma nach einer Lagerungsdauer von 48 Stunden verminderte Qualität auf. Es kam zu einer Reduktion der Motilität um 15 % zwischen 24 und 48 Stunden Lagerung. Die Entfernung des Seminalplasma hatte keine signifikanten Auswirkungen (Morton et al. 2008d).

Des Weiteren sind in der Literatur Angaben zum Einsatz von Eigelb-Glucose-Citrat-Verdünner mit Zusätzen von Trypsin und Collagenase zu finden, die bei der Spermienaufbereitung zur künstlichen Befruchtung eingesetzt wurden (Adams et al. 2009). Auch TRIS-Glucose-Eigelb Verdünner wurden zu diesem Verwendungszweck eingesetzt, wobei eine mechanische Verflüssigung des Samens vonnöten war, um die Motilität zu erhöhen (Adams et al. 2009).

Bei Bravo et al. (2000a) erzielte Eigelb-Citrat-Verdünner unter Berücksichtigung der Viabilität die besseren Ergebnisse im Vergleich zu Verdünnern mit PBS und Magermilchzusatz.

Darüber hinaus sind Konservierungsversuche von Lamasperma mit Lactose-Eigelb-, TRIS-Zitronensäure-Fructose-Eigelb-, Lamablutserum-PBS- und Magermilch-Glucose-

Verdünner beschrieben (Giuliano et al. 2012). Die verwendeten Ejakulate wurden mittels künstlicher Vagina und Elektroejakulation gewonnen. Direkt nach Gewinnung zeigten sich in der Spermauntersuchung keine signifikanten Unterschiede zwischen nativem und verdünntem Ejakulat. Nach einer Lagerung bei 5 °C über 24 Stunden wiesen lediglich die mit Lactose-Eigelb-Verdünner versetzten Spermien eine hohe Motilität und Viabilität auf, die mit den bei Frischsamen erhobenen Werten vergleichbar waren. Das derart konservierte Sperma führte lediglich bei Insemination innerhalb von zwei Stunden post ovulationem zu einer Befruchtung der Eizelle. Das Lactose-Eigelb verdünnte Sperma erzielte somit weitaus niedrigere Trächtigkeitsraten als Frischsamen (Giuliano et al. 2012).

2.2.1.2 Flüssigkonservierung von Nebenhodensperma

Epididymales Sperma zeigte nach Flüssigkonservierung mit Biladyl® bei 4 °C nur minimale Verluste bezüglich Akrosomenintegrität und Motilität (Morton et al. 2008d). So waren die bestimmten Parameter direkt nach Gewinnung, sowie nach 18 bis 24 Stunden Aufbewahrung fast identisch ($p > 0,05$).

Bei der Untersuchung von lactosekonserviertem Sperma, das bei 4 °C über 24 Stunden gelagert wurde, bestand ebenso nur ein sehr geringer Motilitätsverlust von 5 % (Morton et al. 2008d).

Beim Dromedar finden sich Literaturangaben zur Verwendung von flüssigkonserviertem Nebenhodensperma in der *in vitro* Fertilisation und *in vitro* Maturation (Wani 2009). Hierbei wurden TRIS-Lactose und TRIS-SES-Verdünner eingesetzt. Die Motilität wurde direkt nach Gewinnung und vor dem weiteren Gebrauch erhoben. Zwischenzeitlich erfolgte die Kühlung und Lagerung des Samens bei 4 °C über 2, 4, 6 und 8 Tage. Bemerkenswerterweise war die Befruchtungsfähigkeit unabhängig von der Lagerungsdauer jederzeit gleich gut gegeben. Bezüglich der Motilität gab es zwischen den beiden Verdünnern keine signifikanten Unterschiede, lediglich im Zeitverlauf nahm die Motilität der Spermien geringfügig ab (Wani 2009).

2.2.2 Kryokonservierung Alpakasperma

Vorteil der Kryokonservierung ist die quasi unbegrenzte Haltbarkeit gefrorenen Samens. Nachteil der Methode ist, dass wesentlich höhere Spermienzahlen pro Besamungsdosis erforderlich sind (Watson 2000), weil sich Einfrier- und Auftauvorgänge negativ auf Qualität und Lebensfähigkeit der Spermien auswirken.

Mit der Entdeckung der kryoprotektiven Eigenschaften von Glycerol legten Polge et al. (1949) den Grundstein für die Möglichkeit der Konservierung von Sperma durch Gefrieren. Seit den ersten Protokollen zur Kryokonservierung hat sich an der grundlegenden Technik nicht viel geändert (Morrell und Mayer 2017). Bei dieser wurde initial tierartabhängig das Seminalplasma durch Zentrifugation entfernt. Die Spermatozoen wurden dann in einer hyperosmotischen Lösung gekühlt (Morrell und Mayer 2017). Die in der Lösung enthaltenen Kryoprotektoren minimierten die Bildung von Eiskristallen. Vollständig verhindern ließen sich strukturelle Schäden durch Eiskristallbildung und Austrocknung während des Gefriervorganges nicht. Im Verlauf der Forschungen gab es immer wieder Änderungen, wie z. B. tierische Bestandteile der Verdünner durch pflanzliche zu ersetzen und somit das Risiko einer Kontamination zu minimieren (Morrell und Mayer 2017). Ebenso wurden verschiedenste Kryoprotektoren, in unterschiedlichen Konzentrationen und Zusammensetzungen getestet, um deren toxische Auswirkungen zu reduzieren. Es wurde zudem eine Vielzahl an Zusätzen eingesetzt, die sich positiv auf die Spermaqualität nach dem Auftauen auswirken sollten (Morrell und Mayer 2017). Diesbezüglich wurden Antioxidantien, wie z. B. Glutathionperoxidase und TEMPOL (Gómez-Quispe et al. 2016a) eingesetzt. Ebenso Quercetin, ein Flavonol, was zudem einen positiven Effekt auf die DNA-Integrität hat (Morrell und Mayer 2017).

Beim Alpaka ist die Kryokonservierung des Samens wenig erforscht. In den bereits durchgeführten Arbeiten konnten mit ca. 3 bis 42 % Motilität zumeist nur relativ schlechte Ergebnisse nach dem Auftauen erzielt werden (Choez et al. 2014; Durand et al. 2016; Gómez-Quispe et al. 2016a; Morton et al. 2010b; Santiani et al. 2005; Terreros et al. 2015; Vasquéz et al. 2012). Bisher ist es noch nicht gelungen, die optimalen Bedingungen für das Einfrieren und Auftauen zu identifizieren und somit Schäden durch Anwendung dieser Techniken zu vermeiden. Erschwerend kommt die meist geringe Ausgangsqualität und -quantität des verarbeiteten Alpakaspermas hinzu.

Es ist unklar, inwieweit sich speziesspezifische Unterschiede der Spermienmorphologie auf die Kryokonservierung auswirken (Holt 2000a). Ebenso gilt zu beachten, dass die Spermien, die unter natürlichen Bedingungen die besten Befruchtungschancen haben, nicht unbedingt die Widerstandsfähigsten bezüglich Kryokonservierung sind (Holt 2000a). Bis zu 50 % der Spermien sterben bei der Kryokonservierung ab (Holt 2000a; Watson 2000). Die noch lebenden Spermien sind teilweise in ihrer Funktion beeinträchtigt, was sich unter anderem in reduzierter Motilität bemerkbar macht. Durch Selektion während der Verarbeitung wird eine initial heterogene Population an Spermien homogener, was wiederum die Chancen der erfolgreichen Befruchtung einer Eizelle durch diese verbliebene Gruppe an Spermien schmälert (Stelletta et al. 2011). Eine verringerte Fertilität bei kryokonservierten Spermien ist die Folge der genannten Beeinträchtigungen (Stelletta et al. 2011; Holt 2000b). Die Fertilität ist reduziert, wenn die Anzahl voll funktionsfähiger Spermien (nach Kryokonservierung) unter die Mindestmenge fällt, die für eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Befruchtung nötig ist (Watson 2000).

Die Plasmamembranen der Samenzellen bestehen aus Phospholipiden, die auf Temperaturwandel mit Änderung der physikalischen Phase reagieren (Holt 2000b). Bei physiologischen Temperaturen existieren Regionen flüssiger und gelartiger Phase nebeneinander. Temperatursenkung bewirkt eine Verschiebung in Richtung Gelphase. Somit muss sowohl beim Einfrieren, als auch beim Auftauen eine Phasentransition durchlaufen werden (Holt 2000b). Je flüssiger die Membran, umso höher ist ihre Permeabilität, Instabilität und Tendenz zu fusionieren, was zu einer Verkürzung der Lebensdauer der Spermien führt (Stelletta et al. 2011). In kryokonserviertem Sperma steigt beim Auftauen die intrazelluläre Kalziumkonzentration, wodurch es zu Veränderungen des Aufbaus der Zellmembran und letztlich zu Fusionen der Plasma- und Akrosomenmembran kommt (Watson 2000). Diese beschleunigte Reifung der Spermien, durch Kryokapazitation und Akrosomenreaktion, führt zur Hyperaktivität der Spermatozoen. Die Hyperaktivität entspricht den Reaktionen physiologisch gereiften Spermas und äußert sich in hohen Geschwindigkeiten und ausladenden Bewegungen der Spermien (Watson 2000; Stelletta et al. 2011). Alterationen der Spermienmembran durch Kryokapazitation müssen die Motilität nicht zwangsläufig beeinträchtigen, wirken sich aber negativ auf Lebensdauer und Fertilität der Samenzellen aus (Holt 2000b; Salamon und Maxwell 2000).

Eine Ursache von irreparablen Schäden beim Einfrieren stellt die intrazelluläre Eiskristallbildung dar, die die physiologische Zellstruktur zerstört. Außerdem kann eine Veränderung des osmotischen Drucks beim langsamen Einfrieren durch Wasserentzug zum Schrumpfen der Zellen führen (Holt 2000a). Da sich Eiskristalle nur aus purem Wasser bilden, verbleiben die gelösten Stoffe in der restlichen flüssigen Fraktion, deren osmotischer Druck steigt. Ist der extrazelluläre flüssige Anteil schließlich hyperosmotisch, diffundiert Wasser aus den Zellen, um den osmotischen Gradienten auszugleichen. Beim Auftauen kann die Umkehr dieses Phänomens durch Wassereinstrom zu Schäden der Plasmamembran führen (Holt 2000b). Durch die gefrierbedingt unterschiedlichen Salzkonzentrationen innerhalb eines Mediums kann somit eine Samenzelle zugleich hohem und niedrigem osmotischem Druck ausgesetzt sein (Holt 2000b).

Ziel der Entwicklung optimaler Protokolle ist es daher einen Mittelweg zu finden, um Beeinträchtigungen durch das Gefrieren und Auftauen zu minimieren. Laut Watson (2000) zeigten Spermien bei Abkühlraten von 15 bis 60 °C/ Minute die beste Viabilität nach dem Auftauen.

Kryoprotektive Substanzen finden als Zusätze bei Verdünnermedien Anwendung. Permeable Kryoprotektiva dringen bis ins Zytoplasma der Spermien ein, erniedrigen den Gefrierpunkt und reduzieren so die Schädigungen durch Verschiebung des osmotischen Drucks. Hierzu zählen Glycerol, Ethylenglycol, DMSO und Methanol, wobei Glycerol das am weitesten verbreitete Kryoprotektivum ist. Glycerol ist toxisch für Spermien. Die Toleranz gegenüber dieser Toxizität ist speziesspezifisch. Die optimalen Glycerolkonzentrationen müssen daher durch Versuche für jede Spezies bestimmt werden (Holt 2000b).

Der glycerolbedingte osmotische Stress soll in manchen Protokollen durch Hinzufügen in mehreren Schritten oder Entfernung nach dem Auftauen ausgeglichen werden (Watson 2000). Die schützende Wirkung von Glycerol kann durch verbindungsfördernde Eigenschaften, Gefrierpunktserniedrigung und die dadurch bedingte Senkung der Elektrolytkonzentration der ungefrorenen Anteile erklärt werden (Holt 2000b). Interessanterweise produzieren die Spermien von Bulle, Eber, Schaf- und Ziegenbock selbst Glycerol (Jones et al. 1992).

Verschiedene Zucker, Polymere und amphipathische Stoffe dringen nicht in die Zellen ein und wirken durch Beeinflussung der Elektrolytkonzentrationen, der Lösungseigenschaften oder Interaktion mit den Proteinen und Lipiden der Plasmamembranen kryoprotektiv (Vaughan et al. 2003b). Weit verbreitet ist Eigelb als Zusatz bei Verdünnern, welches durch Wirkung auf die Zellmembran vor Kälteschock schützt (Holt 2000b). Verbesserte Viabilität, Motilität, Akrosomenintegrität und Fruchtbarkeit konnte laut Holt (2000b) bei eigelbhaltigen Verdünnern durch Ergänzung mit oberflächenaktiven Substanzen (surfactant) erzielt werden. Puffer stabilisieren den pH-Wert der Verdünner-Samen-Mischung und erhalten das optimale Milieu der Spermien.

Bezüglich des Auftauvorganges ist davon auszugehen, dass zügiges Aufwärmen am besten für die Spermien ist. Beim langsamen Erwärmen können sich intrazelluläre Eiskristalle vergrößern und weitere Schäden initiieren, die schlimmstenfalls im Zelltod enden (Mazur 1984).

2.2.2.1 Kryokonservierung von ejakuliertem Sperma

Das aufgrund des enthaltenen Seminalplasma hoch visköse Ausgangsmaterial mischt sich nur schlecht mit Verdünnern und Zusätzen, was sich negativ auf die Toleranz gegenüber der Kryokonservierung auswirkte (Morton et al. 2008b).

So konnten McEvoy et al. (1992) maximal 10 % Beweglichkeit nach dem Auftauen erzielen und einige Proben zeigten nach dem Auftauen keinerlei Beweglichkeit. Die Spermagewinnung war durch Absamen der Hengste in Intravaginalhüllen an sedierten Stuten und durch Elektroejakulation erfolgt. Das derart gewonnene Sperma war in einem Schritt 1:2 mit Triladyl® verdünnt, in 0,50 ml Pailletten abgefüllt und langsam eingefroren worden (McEvoy et al. 1992).

Im Gegensatz hierzu sollen von Bravo et al. (2000a) im Jahr 1996 sehr gute Auftauergebnisse erzielt worden sein. Mithilfe einer KV gesammeltes Sperma wurde durch Zusatz von Collagenase (1 mg/ ml) verflüssigt. Anschließend folgte eine Verdünnung mit Natrium-, Citrat- (2,90 %) und Eigelb- (10 %) haltigem Medium. Während der Kühlung bei 4 °C erfolgte der Zusatz von glycerolhaltigem Verdünner (7 %) auf drei Portionen verteilt. Die in 0,25 ml Straws konfektionierten Proben wurden kryokonserviert. Nach dem Auftauen (35 °C über 8 Sekunden) zeigten 30 bis 40 % der Spermien

oszillatorische Bewegungen. Mit dem hergestellten TG-Sperma wurden 19 Stuten besamt, von denen 5 fehlten (Bravo et al. 2000a).

In einer darauffolgenden Untersuchung mit Citratverdünner konnte dieses Ergebnis nicht repliziert werden (Morton et al. 2007). Die Motilität des Spermas nach dem Auftauen betrug lediglich 12,50 % (Morton et al. 2007).

Ein anderer Versuch schloss neben verschiedenen Verdünnern auch unterschiedliche Konfektionierungsformen und Gefrierprotokolle ein (Vaughan et al. 2003b). Diese wurden vergleichend bei einem und verschiedenen Ejakulaten, die mithilfe einer KV gewonnen wurden, eingesetzt. Die verwendeten Verdüner enthielten allesamt Glycerol als Kryoprotektivum. War nur ein Verdünnungsschritt vonnöten, wurde das Medium direkt in die KV gegeben oder direkt nach Gewinnung dem Ejakulat zugefügt. Daraufhin erfolgte die Kühlung auf 4 °C über 90 Minuten. Gab es einen zweiten Verdünnungsschritt, wurde dem gekühlten Gemisch tropfenweise der glycerolhaltige Anteil des Verdüners zugegeben. Danach folgte die Equilibrierung von 15 bis 30 Minuten. Die endgültige Glycerolkonzentration war jeweils ca. 7 %. Angewandte Verdüner waren Bovine semen extender, Sheep red extender (005238), Camel fresh chilled green extender (005459) und Camel clear freezing extender (005460), Biladyl A&B®, Triladyl®, Andromed®, Boxcalf® und Human Sperm Präservation Medium (HSPM). Direkt nach dem Auftauen wurde die Aktivität der Spermien bestimmt. Bei green- und clear Camel buffer-Proben lag die durchschnittliche Aktivität bei ca. 17,40 %. Biladyl®-konserviertes Ejakulat erzielte mit ca. 21,3 % die beste Aktivität. Beide Verdünnersysteme wiesen eine Spannbreite der Aktivität von 0 bis 40 % auf. Die restlichen getesteten Verdüner lieferten lediglich Werte von 0 bis 10 % Aktivität. Eine vergleichende Messung der Aktivität direkt nach Spermagewinnung fand nicht statt. Den Einfriervorgang betreffend wurde erwähnt, dass Portionen in 0,25 ml, 0,50 ml und 2,00 ml Pailletten über Stickstoffdampf oder als Pellet auf Trockeneis gefroren wurde. Detaillierte Angaben zu den Ergebnissen hierzu blieben allerdings aus. Zum Vorgehen erfolgt die Aussage, dass 10 cm Abstand zum flüssigen Stickstoff (bei getesteten Höhen von 2 bis 25 cm) für 30 Minuten (5 bis 30 Minuten Zeitdauer verglichen) optimal seien. Die Proben der gleichen Ejakulate wiesen als Pellet gefroren ca. 10 % weniger Aktivität nach dem Auftauen auf als der in Straws gefüllte Samen. Lag die Aktivität über 20 %, wurden entsprechende Pailletten gesammelt bis eine ausreichende Menge

für die erforderliche Besamungsdosis vorlag. Es konnten keine Trächtigkeiten mit dem kryokonservierten Sperma erzielt werden (Vaughan et al. 2003b).

Santiani et al. (2005) verglichen zwei Verdünner, denen jeweils Ethylenglykol (EG) oder Glycerol (GL) beigemischt wurden. Verdünner 1 enthielt TRIS, Zitronensäure, Glucose und Eigelb. Verdünner 2 bestand aus Magermilch, Eigelb und Fructose. Die Endkonzentration von EG war 0,10 molar und von GL 1 molar. Die Verdünnung erfolgte in zwei Schritten. Die Kühlungsrate betrug 1 °C/ 3 Minuten. Das Sperma wurde in 0,25 ml Pailletten gefüllt und für 15 Minuten im Stickstoffdampf gefroren. Das Auftauen erfolgte im Wasserbad bei 37° C für 5 Minuten. Die Bestimmung von Motilität, Viabilität und akrosomalem Status erfolgte an den verdünnten Spermien nach der Equilibrierung und nach dem Auftauen. Die Motilität wurde geschätzt, sowie Viabilität und Akrosomenstatus mittels gefärbter Ausstriche (Trypanblau 2 % und Giemsa 20 %) erhoben. Die Motilität des frischen Spermias sank nach dem Kühlen (bei 5 °C über 30 Minuten) ab, unabhängig mit welchem Verdünner und Kryoprotektivum sie versetzt worden waren. Verdünner 2 erzielte nach dem Auftauen bessere Motilitätswerte (Verdünner 2 + GL: 15,30 ± 4,10 %; Verdünner 2 + EG: 20,00 ± 6,70 %) als Verdünner 1 (Verdünner 1 + GL: 4,00 ± 1,10 %; Verdünner 1 + EG: 1,00 ± 1,40 %).

Es bestand ein signifikanter Unterschied bezüglich Viabilität und Akrosomenintegrität zwischen den Verdünnern ($p < 0,05$), aber nicht zwischen den Kryoprotektoren. Die Anzahl lebender Spermien und intakter Akrosomen war stets annähernd gleich. Santiani et al. (2005) folgerten aus den genannten Ergebnissen, dass Sperma von Neuweltcameliden maximal 1 molare Konzentrationen von Kryoprotektiva tolerieren. Beim Lama liegen Studien zur Auswirkung der Kryokonservierung auf Motilität, Viabilität und Fertilität der Spermien vor (Aller et al. 2003). Es wurden pH-Wert, Volumen, Konzentration, geschätzte Motilität und die Viabilität anhand von Eosin-Nigrosin-Färbung erfasst. Der zucker- und eigelbhaltige Verdünner wurde in zwei Fraktionen geteilt. Fraktion A ohne Kryoprotektoren und Fraktion B mit Glycerol und DMSO. Der Verdünnerzusatz erfolgte in drei Schritten. Zuerst wurde Fraktion A des Verdünners bei 35 °C zugefügt, bis die Hälfte des berechneten endgültigen Volumens erreicht war. Anschließend erfolgte die Kühlung auf 5 °C mit einer Rate von 0,25 bis 0,50 °C/ Minute. Danach wurde Fraktion B des Verdünners in zwei Schritten mit 15 Minuten Abstand zugesetzt. Nach einer Equilibrierung von 45 Minuten bei 5 °C wurde das verdünnte Ejakulat in 0,50 ml Pailletten aufgezogen und versiegelt. Der

Eingefriervorgang begann mit drei Etappen im Stickstoffdampf. Initial lag die Abkühlgeschwindigkeit bei 11 °C/ Minute (5 bis -50 °C), dann bei 6 °C/ Minute (-50 bis -80 °C) und schließlich bei 8 °C/ Minute (-80 bis -120 °C). Zur Untersuchung wurden die Pailletten bei 35 °C für 35 Sekunden aufgetaut. Die Motilität lag bei den frischen Proben bei $54,30 \pm 10,50$ % und nach dem Auftauen bei $20,40 \pm 7,50$ %. Es zeigte sich ebenso ein signifikanter Rückgang der Anzahl lebender Spermien. So wiesen frische Spermien eine Viabilität von $68,50 \pm 12,30$ % auf, wohingegen nur $32,40 \pm 10,50$ % der aufgetauten Spermien lebten (Aller et al. 2003).

Die Befruchtungsfähigkeit des kryokonservierten Spermias wurde durch künstliche Besamung von 38 Lamastuten getestet. Eine Kontrollgruppe bestand aus 23 Tieren, die mit einem Gemisch von frischem Sperma und Fraktion A des Verdünners besamt wurden. Den Stuten war 24 Stunden zuvor ein GnRH-Analogon (Buserelin) verabreicht worden, um eine Ovulation zu induzieren. In beiden Gruppen betrug die Anzahl der Spermien 25 Mio. pro Besamung. Eine Trächtigkeitskontrolle erfolgte nach 60 Tagen mittels transrektaler Palpation. Aus der Kontrollgruppe waren 5 Tiere (21,70 %) und aus der Versuchsgruppe 3 Stuten (7,90 %) tragend (Aller et al. 2003).

2.2.2.2 Kryokonservierung von Nebenhodensperma

Epididymales Alpakasperma bietet sich laut Morton et al. (2010b) aufgrund seiner Toleranz gegenüber Einfrier- und Auftauvorgängen und der nicht viskösen Konsistenz für Experimente zur Erforschung der Kryokonservierung an.

Bei den gewonnenen Proben lag stets eine hohe Varianz zwischen den einzelnen Hengsten bezüglich Konzentration und Motilität des Spermias vor (Morton et al. 2007). Die verwendeten Hoden mit Nebenhoden konnten problemlos bei 4 °C über einige Stunden bis zur Aufbereitung gelagert oder über Nacht ins Labor transportiert werden (Morton et al. 2007). Ferner konnte direkt nach Gewinnung die Vorwärtsbeweglichkeit beurteilt werden (Morton et al. 2010b). Dagegen zeigte ejakuliertes Sperma aufgrund des viskösen Seminalplasma nur oszillatorische Bewegungen.

Der Erhalt von 35 bis 40 % der Ausgangsmotilität bei gefrorenem Nebenhodensperma nach dem Auftauen lag bei Morton et al. (2007) über den Werten, die bei ejakuliertem Sperma erzielt werden konnten. Initial mit Biladyl® (Teil A ohne Glycerol) flüssigkonserviertes Sperma konnte nach bis zu 24 Stunden Lagerung eingefroren werden, ohne dass sich dies auf die Motilität nach dem Auftauen auswirkte (Morton et al. 2010b).

Morton et al. (2007) führten Experimente durch, in denen sie verschiedene Verdünner, verschiedene Gefriertechniken, unterschiedliche Konzentrationen des Glycerolzusatzes und Ergebnisse mit und ohne Natriumdodecylsulfat-Supplementierung verglichen. Die Erhebung der Parameter Motilität und Akrosomenintegrität erfolgte jeweils nach Gewinnung, nach 2 Stunden Kühlung, sowie direkt und 3 Stunden nach dem Auftauen. Die Kryokonservierung der Citrat- und Lactose-basierten Verdünner erfolgte in zwei Etappen und beim TRIS-Medium in einem Schritt. Die Motilität des direkt nach Gewinnung untersuchten Ausgangsmaterials betrug um die 46,90 %. Die bei Morton et al. (2007) erzielten Motilitätswerte nach Kühlung und direkt nach dem Auftauen betrug bei den Spermien mit Lactose ca. 18,20 % Beweglichkeit und übertraf damit die Motilitätsraten der Spermien mit Citrat- (ca. 6,90 % Motilität) und TRIS-Zusatz (ca. 11,30 % Motilität). Drei Stunden nach dem Auftauen unterschied sich die Lactoseverdünnte Portion nur noch von den citratbehandelten Proben signifikant. Bezüglich der Akrosomenintegrität wiesen Spermien in Lactose- und TRIS-Verdünner nach Kühlung und direkt nach dem Auftauen signifikant bessere Werte als die Proben in Citratmedium auf. Drei Stunden nach Auftauen war die Akrosomenintegrität in allen drei Konservierungsmitteln vergleichbar. Die Zusammensetzung der Verdünner ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Zusammenstellung der bei Morton et al. (2007) verwendeten Verdünner und deren Bestandteile für Alpakasperma

Verdünner	Zusammensetzung	Literatur
Citrat	80,60 mM Natriumcitrat	Bravo et al. (1996)
	33,30 mM Glucose	
	20,00 % Eigelb (v:v)	
	5,00 % Glycerol (v:v)	
Lactose	10,00 % Lactose (v:w)	Bathgate et al. (2006)
	20,00 % Eigelb (v:v)	
	9,00 % Glycerol (v:v)	
	1,50 % Equex STM [®] (v:v)	
TRIS	360,00 mM TRIS	Evans and Maxwell (1987)
	113,60 mM Zitronensäure	
	33,30 mM Glucose	
	20,00 % Eigelb (v:v)	
	6,00 % Glycerol (v:v)	

Zum Vergleich verschiedener Gefriermethoden wurde von Morton et al. (2007) lactoseverdünntes Nebenhodensperma in Pelletform auf Trockeneis, in 0,25 ml und 0,50 ml Pailletten auf Trockeneis und in 0,25 ml und 0,50 ml Pailletten im Stickstoffdampf gefroren. Akrosomenintegrität und Motilität des über 2 Stunden auf 4 °C gekühlten Spermias war so hoch wie direkt nach Gewinnung. Die weitaus beste Motilität mit Werten um ca. 27 % unmittelbar nach dem Auftauen wiesen die als Pellet gefrorenen Proben auf. Bei den restlichen Gefrierverfahren zeigten die im 0,50 ml Straw im Stickstoffdampf gefrorenen Portionen die signifikant beste Beweglichkeit, die um 10 % hinter den Werten der pelletgefrorenen Proben zurückblieb. Trotz dieser Ergebnisse wiesen die Autoren darauf hin, dass die Praktikabilität der künstlichen Besamung unter Feldbedingungen die Konfektionierungsform des kryokonservierten Samens in Zukunft bestimmen wird (Morton et al. 2007).

Zur Ermittlung der optimalen Glycerolkonzentration wurden Lactoseverdünner mit Glycerolkonzentrationen von 2, 3 und 4 % angewandt (Morton et al. 2010b). Das Ein-

frieren erfolgte als Pellet auf Trockeneis. Die Motilität betreffend, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Glycerolkonzentrationen nachgewiesen werden. Lediglich die Akrosomenintegrität war 3 Stunden nach dem Auftauen bei 3 und 4 % Glycerolkonzentration im Verdünner bedeutend besser als bei 2 % (Morton et al. 2010b).

In einem weiteren Experiment wurde Lactoseverdünner mit und ohne Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) in Form von Equex STM® mit 1% Endkonzentration eingesetzt (Morton et al. 2010b). Unmittelbar nach dem Auftauen war die Beweglichkeit des Spermias unter SDS-Zusatz mit $21,50 \pm 3,50$ % signifikant höher als bei den Kontrollen mit $14,40 \pm 2,10$ %. Drei Stunden nach dem Auftauen war hingegen in keiner Prüfgruppe mehr Motilität nachzuweisen.

Auf die Akrosomenintegrität konnten keine deutlichen Auswirkungen von SDS nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Lagerung bei 4 °C über 18 bis 24 Stunden vor dem Gefrierschritt zeigte keinerlei negative Auswirkungen und spricht somit für die Unempfindlichkeit des epididymalen Samens gegenüber Flüssigkonservierung (Morton et al. 2010b).

Zwei Studien aus Peru untersuchten die Effekte von Glycerol (GL), Ethylenglykol (EG) und Dimethylsulfoxid (DMSO) bei der Kryokonservierung epididymalen Spermias (Terreros et al. 2015; Choez et al. 2014). In beiden Arbeiten wurde Verdünner mit Magermilch, Eigelb und Fruktose eingesetzt. Kühlraten (1 °C/ Minute) und Auftauprotokolle (1 Minute bei 37 °C im Wasserbad) waren gleich.

Terreros et al. (2015) setzten die verschiedenen Kryoprotektiva in jeweils nur einer Konzentration (DMSO 0,90 molar; EG 0,90 molar; GL 1,20 molar) ein und benutzen Midi-Pailletten (0,50 ml). Hierbei war die Motilität nach dem Auftauen bei DMSO mit $31,10 \pm 8,50$ % am höchsten, gefolgt von Glycerol mit $23,90 \pm 8,30$ % und Ethylenglykol mit $8,30 \pm 6,90$ %. Demselben Verteilungsmuster folgten die Ergebnisse des HOS-Tests. Spermien mit DMSO-Zusatz wiesen mit $28,70 \pm 5,80$ % die höchste Membranintegrität auf, worauf Glycerol mit $26,40 \pm 8,30$ % und Ethylenglykol mit $17,80 \pm 7,00$ % folgten.

Es wurden lediglich Proben mit einer initialen Motilität von mindestens 50 % weiterverarbeitet. Im Endeffekt wurden daher von 32 Proben nur 18 untersucht.

Laut Terreros et al. (2015) war ihre Studie die erste beschriebene Prüfung der in-vitro-Befruchtungsfähigkeit von epididymalem Alpakasperma nach Kryokonservierung. Hierzu wurden die Teilungsraten von 15, mit dem untersuchten Sperma befruchteten, Eizellen über 72 Stunden erhoben. Dabei lieferten die Proben, welche mit Glycerol (26,60 %) und DMSO (46,60 %) behandelt worden waren, ähnliche Ergebnisse.

Demgegenüber testeten Choez et al. (2014) bei jeweils 10 Probanden dasselbe Kryoprotektivum in je 8 unterschiedlichen Konzentrationen (0,00; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 molar). Die Konfektionierung erfolgte in 0,25 ml Straws. Die Motilität wurde geschätzt, sowie Viabilität und Akrosomenintegrität anhand einer Doppelfärbung (Trypanblau 2% und Giemsa 20%) erfasst.

Nach dem Auftauen gab es bzgl. Motilität signifikante Unterschiede zwischen den Kryoprotektiva. Glycerol erzielte mit durchschnittlich $16,10 \pm 12,99$ % die beste Motilität nach dem Auftauen, gefolgt von DMSO mit $14,40 \pm 7,06$ %. Ethylenglycol wies mit durchschnittlich $5,20 \pm 5,30$ % motilen Spermien die deutlich schlechtesten Ergebnisse auf (Choez et al. 2014).

Kongruente Werte wiesen die Proben hinsichtlich Viabilität und Akrosomenintegrität auf. Proben mit Glycerol erreichten $17,90 \pm 7,20$ %, Proben mit DMSO $13,10 \pm 5,00$ % und Spermien in Ethylenglycolverdünner $10,60 \pm 7,20$ % Viabilität und Akrosomenintegrität.

Der Verdünner mit 1 molarem Glycerolgehalt hatte die besten Motilitätswerte ($23 \pm 16,19$ %) im Vergleich zu den anderen Konzentrationen.

Die generell höheren Motilitätsraten bei Terreros et al. (2015) könnten auf der initialen Selektion der Proben beruhen. Insgesamt decken sich die Ergebnisse von Choez et al. (2014) nicht mit älteren Studien an ejakuliertem Sperma (Santiani et al. 2005). Santiani et al. (2005) kamen darin zu dem Schluss, dass EG in niedrigen Konzentrationen mit Magermilch- und Fruktose-basiertem Verdünner bessere Effekte erzielt als GL mit TRIS-basiertem Verdünner.

Mamani-Mango et al. (2019) untersuchten die Auswirkungen von je zwei Gewinnungsmethoden, Verdünnern und Gefrierprotokollen auf die Spermaqualität nach dem Auftauen und die in vitro Befruchtungsfähigkeit. Zur Spermagewinnung erfolgte die

retrograde Spülung oder das Waschen der Nebenhoden mit jeweils 1 ml vorgewärmtem Tris-Eigelb- oder Bioxcell®-Verdünner. 30 Minuten nach Gewinnung wurden Konzentration, Motilität, Viabilität und Plasmamembranintegrität bestimmt. Anschließend erfolgten der Zusatz von 2 ml des initial eingesetzten Verdünners und die Equilibrierung über 180 Minuten bei 4 °C. Beim konventionellen slow freezing wurden die Proben in 0,25 ml Pailletten gefüllt, 10 Minuten 6 cm über flüssigem Stickstoff gekühlt und zuletzt in den flüssigen Stickstoff gegeben. Beim fast freezing wurden Vertiefungen mit 0,25 ml Fassungsvermögen in einem Block Trockeneis mit Proben befüllt und die Proben nach 30 bis 45 Sekunden in flüssigen Stickstoff überführt. Nach dem Auftauen wurden erneut Motilität, Viabilität und Plasmamembranintegrität ermittelt. Bioxcell® erzielte mit $33,20 \pm 16,80$ % Motilität und $38,40 \pm 14,40$ % Viabilität signifikant bessere Ergebnisse als der Tris-Eigelb-Verdünner ($23,20 \pm 14,20$ % Motilität und $32,00 \pm 14,20$ % Viabilität). Das Fast-Freezing-Protokoll erreichte signifikant bessere Werte bei Motilität ($p = 0,0001$) und Viabilität ($p = 0,003$) als das konventionelle Protokoll. Mamani-Mango et al. (2019) erzielten beim Gefrieren als Pellet mit $35,70 \pm 16,50$ % höhere Motilitätswerte als Morton et al. (2007). Die Differenz erklärten Mamani-Mango et al. (2019) mit Unterschieden im eingesetzten Probenvolumen. Bei Überprüfung der Fähigkeit der aufgetauten Spermien zur in vitro Fertilisation wurden keine Auswirkungen der Gewinnungsmethode festgestellt.

Bei einigen anderen Haustierarten existierten bereits länger Studien, die neben Gewinnungsmethoden und Kryokonservierung die Befruchtungskapazität von Nebenhodensperma untersuchten. Dies gilt unter anderem für Bulle (Turri et al. 2012), Büffel (Herold et al. 2004), Schwein (Nagai et al. 1988), Ziege (Blash et al. 2000), Hund (Martins et al. 2009; Hori et al. 2015) und Katze (Tsutsui et al. 2003).

Eine alternative Methode zur konventionellen Kryokonservierung stellt die Vitrifikation dar. Dabei kommt es zur Verfestigung des verarbeiteten Materials durch extreme Erhöhung der Viskosität während des Gefrierens (Fahy et al. 1984). Das intra- und extrazelluläre Wasser geht in einen glasartigen Zustand über. Aufgrund hoher Konzentrationen der Kryoprotektiva und sehr schneller Kühl- und Auftauraten von über 1000 °C/ Minute (Cuevas-Urbe et al. 2017), bleibt die Bildung von Eiskristallen und dadurch bedingter Schäden aus. Es liegen Berichte über Kühlraten von maximal 20.000 °C/ Minute vor (Vajta et al. 1998).

Problematisch wurde die konzentrationsbedingte hohe Toxizität der eingesetzten Kryoprotektiva beurteilt (Fahy et al. 1984). Die bei der Vitrifikation eingesetzten Kryoprotektiva mussten mindestens eine Konzentration von 50 % aufweisen, um bei normalem Luftdruck eine stabile Vitrifikation hervorzurufen (Isachenko et al. 2004). Aus diesem Grund finden sich in der Literatur verschiedene Vorgehensweisen, die zu einer Reduktion der Menge eingesetzter Kryoprotektiva führen sollten. Ein hoher hydrostatischer Druck, Reduktion der Einwirkzeit des Kryoprotektivums auf das nötige Minimum, schrittweises Zuführen vorgekühlter Lösungen, sowie die Kombination permeabler mit nichtpermeablen Kryoprotektiva (Isachenko et al. 2004; Fahy et al. 1984) wurde beschrieben.

Mittlerweile etablierte sich die Vitrifikation v. a. bei Embryonen. Bei Neuweltcameliden wurden Untersuchungen an Eizellen vom Alpaka (Ruiz et al. 2013) und Lamaembryonen (Aller et al. 2002) durchgeführt. Spermien jedoch zeigten sich besonders empfindlich gegen die Toxizität der Kryoprotektiva (Holt 2000a).

Alternativ kam die kinetische Vitrifikation zum Einsatz (Pradiee et al. 2015). Dabei waren die Kühlraten ultra-schnell, das Trägermedium enthielt keine permeablen oder gar keine Kryoprotektiva und das Probenvolumen war auf ein Minimum verringert (Pradiee et al. 2015; Isachenko et al. 2004). So konnten Isachenko et al. (2004) nachweisen, dass die Motilität von humanem Sperma nach Vitrifizierung ohne Kryoprotektoren identisch zu der bei langsam gefrorenen Spermien war. Zudem wurde die DNA-Integrität durch die Vorgehensweise bei der Kryokonservierung nicht beeinflusst.

Der erfolgreiche Einsatz vitrifizierten Spermas bei der intrazytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) gelang bereits in der Humanmedizin (Isachenko et al. 2012). Im Vergleich zum konventionellen Gefrieren lieferte die Vitrifikation bessere Ergebnisse bezüglich der Motilität nach dem Auftauen (Rodriguez-Wallberg et al. 2019; Li et al. 2019).

In der Veterinärmedizin wurden die Möglichkeiten der Vitrifikation bereits an verschiedenen Tierarten evaluiert. Es finden sich einige Angaben zum Einsatz bei diversen Meeresfischen, wobei Cuevas-Urbe et al. (2017) den ersten Bericht einer erfolgreichen Befruchtung mittels vitrifizierten Spermas lieferten.

Bei den bisher untersuchten Säugetierspezies war die Qualität vitrifizierter Spermien im Vergleich mit konventionell kryokonservierten Spermien in der Regel schlechter.

Bei Mouflonsperma führten angewandte Vitrifikationsprotokolle zu schlechterer Qualität und Fertilität nach dem Auftauen im Vergleich zu konventionell kryokonserviertem Sperma (Pradiee et al. 2017).

Indessen erzielten beim Iberiensteinbock ultraschnelle Gefrierprotokolle in Kombination mit schnellem Auftauen Befruchtungsraten, die für kryokonserviertes Sperma üblich sind, obwohl die Proben eine geringe Motilität aufwiesen (Pradiee et al. 2015). Dies könnte durch die initiale Selektion der Proben mittels Dichtegradientenzentrifugation bedingt gewesen sein (Pradiee et al. 2015).

Caturla-Sánchez et al. (2018) verglichen konventionelle und ultraschnelle Gefriermethode unter Einsatz von vier verschiedenen Verdünnern, unterschiedlicher Auftautemperaturen und Sucrose und Trehalose als nicht permeable Kryoprotektiva bei Hundejakulat. Die mittels CASA erfasste Motilität war bei den vitrifizierten Proben signifikant schlechter ($p < 0,05$). Die Plasmamembranintegrität der Proben war bei beiden Verfahren gleich und die Akrosomenintegrität nach Vitrifikation deutlich höher (Caturla-Sánchez et al. 2018).

Untersuchungen an epididymalem Sperma führten Horta et al. (2017) an Mäusesperma durch. Die bei dieser Tierart als optimiert geltende Kryokonservierung lieferte bezüglich Motilität ($p < 0,01$) und Vitalität ($p < 0,05$) signifikant bessere Ergebnisse als vitrifizierte Proben. Die Fertilität wurde anhand der Embryonenentwicklung nach IVF beurteilt, wobei die vitrifizierten Spermien insgesamt bessere Ergebnisse erzielten (23 expandierte Blastozysten von 102 befruchteten Eizellen nach Vitrifikation versus 9 bzw. 8 expandierte Blastozysten von 86 bzw. 79 befruchteten Eizellen bei kryokonserviertem bzw. frischem Samen).

O'Brien et al. (2019) verglichen ultraschnelles und konventionelles Gefrieren an epididymalen und ejakulierten Spermien verschiedener bedrohter Tierarten. Das ultraschnelle Protokoll empfahlen die Autoren für die Konservierung epididymalen Spermas von Damagazelle, Giraffe und Braunbär.

3 Material und Methoden

3.1 Probanden

Insgesamt wurden 40 Alpakahengste der Rasse Huacaya kastriert und versucht aus deren Nebenhoden Sperma zu gewinnen. Die Hengste waren zwischen 2 und 8 Jahren alt, stammten aus kommerziellen und privaten Zuchten und waren zum Zeitpunkt der Kastration von ungestörtem Allgemeinbefinden. Die Kastrationen wurden auf Wunsch der Besitzer zur Haltungserleichterung der Tiere durchgeführt. Zwei der Hengste waren einseitig kryptorchid. Da nur die extraabdominalen Nebenhoden in die Untersuchung einbezogen wurden, betrug die Anzahl der verarbeiteten Nebenhoden 78.

Bei 65 der Nebenhoden war die Spermagewinnung erfolgreich. Aus 13 Nebenhoden konnte kein Sperma gewonnen werden. Diese Nebenhoden wurden histologisch aufbereitet. Einer dieser Nebenhoden stammte von einem der kryptorchiden Hengste, weshalb die Anzahl der histologischen Präparate ungerade ist.

Die Proben von 7 Nebenhoden konnten aufgrund von hochgradigen Erythrozytenbeimengungen oder fehlerhaften Messungen nicht ausgewertet werden. Darunter befand sich der Nebenhoden des zweiten Kryptorchiden.

Die Verwendung der Hoden mitsamt Nebenhoden für die Untersuchungen ist vom zuständigen Regierungspräsidium Gießen genehmigt (kTV 7-2017).

3.2 Kastration

Die Kastrationen wurden von Tierärzten und Studenten der KGGA im Operationsraum für kleine Wiederkäuer der Klinik (n = 36) oder in den Räumlichkeiten des Heimatbestandes der Tiere (n = 2) durchgeführt.

Eine Ausnahme bildeten die von Haustierärzten eingesandten Hoden mit Nebenhoden zweier Hengste. Die Gewinnung von Sperma aus diesen Nebenhoden war erfolgreich. Untersuchung und Verarbeitung des Spermas aus den eingesandten Nebenhoden erfolgte analog zum Vorgehen bei den restlichen Nebenhoden.

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Ketamin (CP-Pharma GmbH, Burgdorf) und Xylazin (Serumwerk Bernburg AG, Bernburg) in einer Dosierung von 0,50 mg Xylazin pro kg Körpergewicht und 5 mg Ketamin pro kg Körpergewicht als intramuskuläre Injektion. Nach Ablegen der Hengste wurden diese auf einen höhenverstellbaren Tisch

(1200 x 2150 cm, Heenen Metallbau, Kempen) verbracht, die Hintergliedmaßen an das dazugehörige Gestänge gebunden und so die Tiere fixiert und in eine optimale Position zur Operation gebracht. Daraufhin wurde eine Venenverweilkanüle (Vasovet 18G x 1^{3/4}; 1.3 x 45 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in die Vena femoralis gelegt und mit Klebeband fixiert. Die Narkose wurde nach Bedarf mit intravenöser Gabe von Ketamin aufrechterhalten, wobei die maximale Gesamtdosis für Ketamin 10 mg pro kg Körpergewicht betrug.

Der Skrotal- und Präskrotalbereich wurde geschoren und mit feuchten Tupfern gereinigt. Die Desinfektion erfolgte durch Aufbringen einer 70 % Alkohollösung (Berkel AHK Alkoholhandel GmbH & Co. KG, Ludwigshafen) und Entfernen der Flüssigkeit nach einer Einwirkzeit von ca. 10 Sekunden mit Gazetupfern (Beesana Mullkompressen 10 x 10 cm 8-fach, Karl Beese GmbH, Barsbüttel). Hierbei wurde darauf geachtet, dass ein Tupfer immer nur einmal von cranial nach caudal in einer geraden Bahn geführt und anschließend verworfen wurde. Dies wurde medial begonnen, nach lateral fortgesetzt und dreimal wiederholt. Anschließend wurde das beschriebene Vorgehen nochmals mit SkinSept-Lösung (Ecolab Deutschland GmbH, Düsseldorf) durchgeführt, wobei der zuletzt aufgetragene SkinSept-Film auf der Haut verblieb.

Die subkutane Gabe von Meloxicam in einer Dosierung von 0,50 mg pro kg Körpergewicht (Metacam 20 mg/ ml, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein) und 22.000 I. E. pro kg Körpergewicht Procain-Penicillin (Procain-Penicillin Susp. 300 mg/ ml mit 300 000 I. E./ ml, Albrecht GmbH, Aulendorf) erfolgte parallel zur Operationsvorbereitung, um eine antibiotische und entzündungshemmende Wirkung intra operationem zu gewährleisten. Zusätzlich erfolgte die prophylaktische Gabe von 5.000 I.E. Tetanusserum (Tetanusserum WDT, WDT, Garbsen).

Die Operation begann mit einer Inzision der Skrotalhaut, die auf einem Hoden ca. fingerbreit lateral der Raphe scroti und parallel zu dieser erfolgte. Die Ausdehnung des durchgeführten Schnittes war je nach Größe der Hoden zwischen 3 und 5 Zentimeter groß, so dass der darunterliegende Hoden daraus vorgelagert werden konnte. Durch stumpfes Präparieren und somit Durchtrennen des Ligamentum scroti wurde der Hoden mit Nebenhoden im Processus vaginalis freigelegt. Es folgte das Setzen zweier

doppelter Ligaturen mit Durchstechung des Samenstranges und einer zusätzlichen Ligatur distal davon. Dies erfolgte mit atraumatischem, armiertem Nahtmaterial (Monosyn, 5 metric, HR 48, 25 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen).

Zwischen der distalen Ligatur und der proximal davon liegenden Durchstichligatur wurden daraufhin zwei Klemmen angebracht und dazwischen der Samenstrang mit einem Emaskulator nach Haussmann für 2 Minuten gequetscht. Es folgte das Absetzen des Hodens mit Nebenhoden. Der am Tier verbliebene Stumpf auf Höhe des Samenstranges wurde mithilfe einer Klemme fixiert und auf Nachblutungen kontrolliert. Traten keine Nachblutungen auf, wurde der Vorgang auf der anderen Seite wiederholt. Waren alle Kontrollen auf Nachblutungen negativ, erfolgte eine fortlaufende Subkutannaht mit polyfilem Nahtmaterial (Safil, 3 metric, HR 26, 22 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) und der Verschluss der Hautwunden in liegenden U-Heften (Monosyn, 5 metric, HR 48, 25 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Es kam in keinem Fall zu Nachblutungen der Stümpfe.

3.3 Vermessung Hoden mit Nebenhoden

Die Hoden mitsamt Nebenhoden wurden im Processus vaginalis mithilfe eines Maßbandes vermessen, wobei Länge, Breite, Höhe und Umfang in cm erfasst wurden. Zur Berechnung des Hodenvolumens wurde die Formel zur Berechnung des Volumens eines Ellipsoids eingesetzt, die wie folgt lautet:

Länge (l) x Breite (w) x Höhe (h) x 0,5236

3.4 Gewinnung Nebenhodensperma

Zur Reduktion der Erythrozytenbeimengung wurde nach dem Präparieren der verwendete Nebenhodenabschnitt ganz belassen. Dabei wurde der abgeklemmte Nebenhoden auf Höhe des Ductus deferens und des Nebenhodenkörpers abgesetzt. Die Eröffnung auf Höhe des Nebenhodenschwanzes erfolgte mithilfe einer frischen Skalpellklinge (Otto Rüttgers GmbH & Co. KG, Solingen), wobei darauf geachtet wurde keine Blutgefäße zu verletzen. Eine vorbereitete Spritze (Injekt®, 2 ml Volumen, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) mit aufgesetzter Venenverweilkanüle ohne Mandrin (Vasovet 22 G x 1; 0.9 x 25 mm, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) war zuvor mit 0,4 ml des entsprechenden, temperierten Verdünners (37 °C) befüllt worden.

Der sich an den Schnittflächen sammelnde Samen wurde damit abgesaugt und in ein Becherglas (Schott Duran, 25 ml Volumen, Mainz) überführt. Weitere Spermien wurden dann mit dem in der Spritze enthaltenen Verdünner erspült. Bei den linken Nebenhoden wurde Andromed® tropfenweise auf die Schnittflächen gegeben und damit weitere Spermien ausgeschwemmt, bei den rechten Nebenhoden war der angewandte Verdünner Triladyl®. Das eingesetzte Verdünnervolumen betrug 0,40 ml. Erst nach Dichtebestimmung mittels SpermVision® bzw. AndroVision® wurde gegebenenfalls weiter verdünnt, um eine optimale Analyse zu gewährleisten.

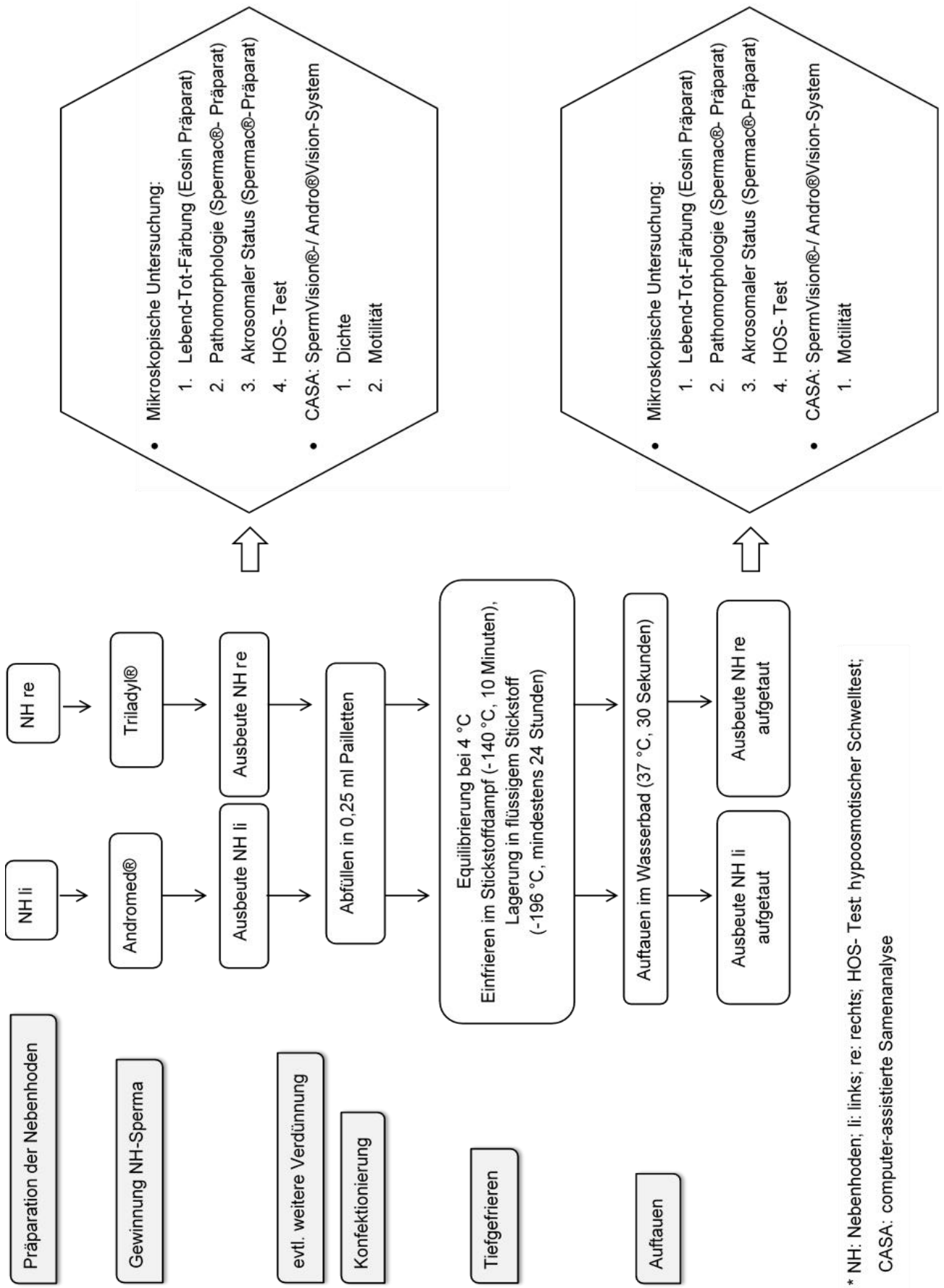
Die Zusammensetzung der verwendeten Verdünner ist in Tabelle 2 aufgelistet.

Der schematische Versuchsaufbau ist in Abbildung 1 dargestellt.

Tab. 2: Zusammensetzung der zur Gewinnung von Nebenhodensperma eingesetzten Verdünner

Verdünner	Andromed®	Triladyl®
Zusammensetzung	Aqua bidest Fructose Glycerol Zitronensäure Puffer* Phospholipide Spectinomycin Lincomycin Tylosin Gentamycin	Aqua bidest Glycerol TRIS Zitronensäure Fructose Spectinomycin Lincomycin Tylosin Gentamycin
Herstellung	40 ml Aqua bidest 10 ml Andromed® → auf 37 °C erwärmen und gut durchmischen	30 ml Aqua bidest 10 ml Triladyl® 10 ml Eigelb → auf 37 °C erwärmen und gut durchmischen → durch zweischichtigen Gazetupfer filtern

*keine näheren Angaben des Herstellers



* NH: Nebenhoden; li: links; re: rechts; HOS- Test: hypoosmotischer Schwelltest;

CASA: computer-assistierte Samenanalyse

Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

3.5 Spermatologische Untersuchung

Das Nebenhodensperma wurde direkt im Anschluss an die Gewinnung lichtmikroskopisch sowie mittels Computer assisted sperm analysis (CASA) untersucht. Die zur Videomikrographie eingesetzten CASA-Systeme waren SpermVision® und AndroVision® (Minitüb GmbH, Tiefenbach).

3.5.1 Mikroskopische Untersuchung

3.5.1.1 Supravitalfärbung

Bei der Supravitalfärbung, auch Lebend-Tot-Färbung genannt, wurden jeweils 10 µl Probe und Eosin-G-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) auf einem entfetteten, vorgewärmten Objektträger vermischt. Mit der Querseite eines weiteren Objektträgers wurde das Gemisch aufgenommen und auf einem dritten vorgewärmten Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Das Eosin dringt in die Membran von Spermien ein, die zum Zeitpunkt der Färbung tot sind und färbt diese rot. Lebende Spermien mit einer intakten Membran bleiben hingegen farblos. Es wurden je Probe 200 Spermatozoen bei 400-facher Vergrößerung (Objektiv E₂ Plan Ph 40x/0,65) im Hellfeld (Mikroskop: Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) ausgezählt.

3.5.1.2 Plasmamembranintegrität

Zur Bestimmung des Gehaltes an Spermien mit intakter Plasmamembran wurde der hypoosmotische Schwelltest (HOS-Test) durchgeführt. Dazu wurden 100 µl hypoosmotische Lösung (150 mosmol/l; Rezept im Anhang unter 9.2.2) mit 10 µl Sperma zusammengegeben und auf der Heizplatte bei 38 °C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde ein Deckglaspräparat mit 10 µl der zuvor angefertigten Mischung hergestellt. Die Untersuchung erfolgte bei 400-facher Vergrößerung (Objektiv 40x/0,65) an einem Mikroskop mit positivem Phasenkontrast und beheizbarem Objektträgertisch (Helmut Hund GmbH, Wetzlar).

Es wurde der Anteil an Spermien mit aufgerolltem Schwanz („curled“) und nicht aufgerolltem Schwanz („not curled“) ermittelt. Im hypoosmotischen Medium kommt es bei intakten Spermien zum Wassereinstrom um ein osmotisches Gleichgewicht herbeizuführen. Daraus resultiert ein Anschwellen des Spermiums bei erhaltener Integrität und Funktionalität der Plasmamembran, welches als typisches Aufrollen des Schwanzes

sichtbar wird („curled tail“). Bei Spermatozoen mit defekter Membran kann dieses Phänomen hingegen nicht beobachtet werden („not curled“).

3.5.1.3 Pathomorphologie

Die Spermac®-Färbung (REF. 15405/0000, Fa. Minitüb GmbH, Tiefenbach) wurde zur Beurteilung der pathomorphologischen Veränderungen inklusive des Vorhandenseins der Kopfkappen eingesetzt. Es wurde ein Ausstrich aus einem Tropfen Sperma von 10 µl Volumen angefertigt, fünf Minuten luftgetrocknet und anschließend zehn Minuten in der Fixationslösung belassen. Nach dem Abtropfen der überflüssigen Fixierlösung folgte die Trocknung auf einer Wärmeplatte bei 37 °C für 15 Minuten. Nun wurde der Objektträger durch fünfmaliges Eintauchen in Leitungswasser gewaschen und anschließend abgetupft um überschüssiges Wasser zu entfernen. Daraufhin erfolgte das Färben mittels drei verschiedener Lösungen. Zwischen den Färbeschritten wurde wie zuvor beschrieben gewaschen, wobei das Waschwasser nach jeder Benutzung erneuert wurde. Der Objektträger wurde zwei Minuten in Färbelösung A (rotes Reagenz), anschließend eine Minute in Färbelösung B (hellgrünes Reagenz) und zuletzt eine Minute in Färbelösung C (dunkelgrünes Reagenz) verbracht. Nach einem letzten Waschschrift, wurde der Objektträger luftgetrocknet. Es wurde je Nebenhoden mindestens ein fixiertes, ungefärbtes Präparat archiviert, um bei Bedarf eine Beurteilung am frisch gefärbten Präparat wiederholen zu können.

Die mikroskopische Betrachtung der Spermatozoen erfolgte im positiven Phasenkontrast (Helmut Hund GmbH, Wetzlar) bei 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion (Objektiv 100x/1.25 Oel). Die Spermienanteile stellten sich auf folgende Art verschieden gefärbt dar: Akrosom: grün, Äquatorialzone: hellgrün, der restliche Kopf: rot, Mittelteil und Schwanz: grün. Beurteilt wurden jeweils 200 Spermien. Eine deutliche Grünfärbung im Bereich der Kopfkappe wurde als Vorhandensein und keine Grünfärbung entsprechend als abgelöstes Akrosom gewertet.

Die zur Beurteilung herangezogene Einteilung pathomorphologischer Veränderungen ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Pathomorphologische Spermienformen; Modifizierte Einteilung nach Hoffmann (2003)

Veränderungen		
Primäre	Sekundäre/ Tertiäre	Plasmatrophen
Zwergkopf	Lose Köpfe	Hals
Riesenkopf	Krümmlinge	Mittelstück
lanzenform	Akrosom nicht vorhanden	Endstück
Kolbenform		
deformiert		
Doppelkopf		
schmal		
Spatelform		
abaxialer Schwanzansatz		
paraxialer Schwanzansatz		
retroaxialer Schwanzansatz		
Halsbruch		
schleifenförmiger Schwanz		
Aufgerollter Schwanz		
um Kopf gerollter Schwanz		
abgeknickt		

3.5.2 Computer assisted sperm analysis (CASA)

Eine objektive Beurteilung der Gesamtmotilität wurde durch Verwendung der SpermVision® und AndroVision® Analysesysteme (Minitüb GmbH, Tiefenbach) gewährleistet.

Die Messungen erfolgten vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen. Hierzu wurde jeweils eine Leja-Messkammer mit 2,50 µl einer Probe beschickt und diese bei 37 °C analysiert. Die Messung schloss in Haufen zusammenliegende oder an andere Partikel anhaftende Spermien aus. Es erfolgte eine Einteilung der beurteilten Spermien in unbewegliche, vorwärtsbewegliche und lokalbewegliche Samenzellen (Level 1 Klassifizierung). Im aufgezeichneten Mikroskopbild wurde dies durch farblich unterschiedliche

Markierung der Spermien dargestellt und auch die zurückgelegten Strecken entsprechend farbig dargestellt. Die ermittelten Zahlenwerte wurden neben dem Bild auf dem Monitor angezeigt und automatisch in der Datenbank des Messsystems gespeichert. Abbildung 2 zeigt das Monitorbild während einer Messung.

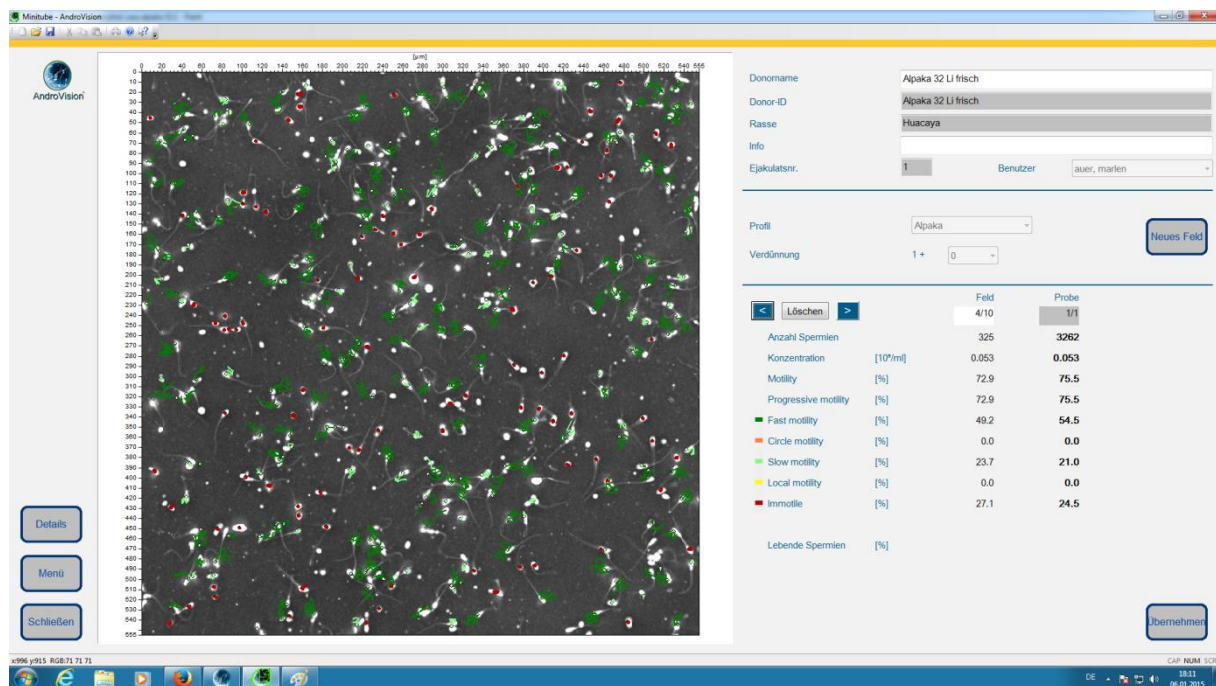


Abb. 2: Ansicht des AndroVision®-Monitorbildes nach einer Messung: links das zuletzt beurteilte Gesichtsfeld, rechts oben die Einstellungen, rechts unten die Ergebnisse des letzten Gesichtsfeldes (in Spalte Feld) und die Durchschnittswerte der gesamten gemessenen Gesichtsfelder der aktuellen Probe (Spalte Probe).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Spermia durch Anschneiden der Nebenhoden gewonnen, um die Blutkontamination möglichst gering zu halten. Überdies wurde auf den Einsatz eines Lactoseverdünners verzichtet. Dies geschah, um die Gefahr von Fehlmessungen und damit verfälschten Ergebnissen der CASA-Messungen durch Nicht-Spermien-Partikel in den Proben zu vermeiden.

Durch die Optimierung der Erkennungseinstellungen wurde die bestmögliche Erkennung der Alpakaspermien herbeigeführt.

Zusätzlich zur CASA-Analyse erfolgte eine subjektive Gegenkontrolle simultan zur CASA-Messung.

3.5.2.1 Probenvorbereitung und Befüllung der Messkammer

Die Proben wurden direkt in ein kleines Becherglas gespült oder der Inhalt der aufgetauten Pailletten in ein Eppendorfgefäß abgelassen. Das Mischen der Probe mittels Pipette garantierte eine homogene Verteilung der Spermien. Zur Beschickung der Messkammern wurde eine Pipette mit einem Volumen von 2,50 µl genutzt (Rainin Pipet – Lite® XLS, Rainin Instrument LLC.; Oakland; USA). Das voreingestellte Volumen von 2,50 µl wurde nach Entnahme aus dem Becherglas direkt in die Leja-Messkammern gefüllt, die hierzu bereits auf dem Mikroskoptisch positioniert und auf 37 °C erwärmt waren. Der langsam abgelassene Tropfen wurde aufgrund von einwirkenden Kapillarkräften unter das Deckglas der Leja-Messkammern eingezogen und verteilte sich auf dem gesamten Zählfeld. Es wurde auf eine gleichmäßige Füllung der Messkammern geachtet. War die Füllung der Kammer ungleichmäßig, z. B. infolge von Luftblasenbildung, wurde ein neuer Zählbereich befüllt. Im Anschluss wurden nach 20 Sekunden Wartezeit die Analysen durchgeführt. Nach dieser Zeit gab es keine Bewegungen der Spermien durch den Sog mehr und es war noch nicht zu Akkumulationen der Spermien in den Randbereichen gekommen. Am Mikroskop waren Filter 2 und Phase 1 eingestellt. Bei den o. g. Leja-Messkammern sind vier Zählbereiche von 20 µm Tiefe auf einem Objektträger vorhanden (Leja Standard Count 4 Chamber Slide; Leja Products B. V., Nieuw Vennep, Niederlande).

Zuerst wurde die initiale Dichte der jeweiligen Probe von 0,40 ml Volumen bestimmt. Falls nötig wurden die Proben weiter verdünnt und unter Sichtkontrolle Messungen durchgeführt. Die Proben wurden verdünnt bis die Dichte mit optimaler Erkennung erreicht war. Die Proben wurden auf eine Dichte von durchschnittlich $59,10 \pm 35,14$ Mio. Spermien pro ml eingestellt.

3.5.2.2 Aufbau und Funktionsweise des SpermVision® und AndroVision® Analysesystems

Das genutzte System bestand aus folgenden Komponenten:

- einem Mikroskop (Olympus BX41; Okular x10; Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg) mit
- Negativ-Hoch-Kontrast Objektiv (Planoc N 20x/0.40Ph1; Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg)
- beheizbarem, ferngesteuertem Mikroskop-Tisch (Scan Stage)
- angekoppelter Heizplatte (HT 300, Minitüb GmbH, Tiefenbach)
- Joystick zur Steuerung des Mikroskop-Kreuztisches
- Hochgeschwindigkeits-Digitalkamera (schwarz/weiß) mit einer Auflösung von 101 Bildern/Sekunde (Basler avA 1000 – 100gc, Basler AG, Ahrensburg)
- Rechner (Intel® Core™ i7; 3,4 GHz) mit 40 GB Festplatte und dem Betriebssystem Microsoft Windows 7 Professional
- SpermVision® Software Version 3.8 (Oktober 2011) bzw. AndroVision® Software (Mai 2014) installiert

Beim SpermVision®-System wurde das Präparat automatisch an definierte Stellen unter dem Objektiv positioniert. Das AndroVision®-System hingegen verlangte eine manuelle Positionierung der Präparate mittels Joystick. Die Platzierungen wurden so gewählt, dass sämtliche Randbereiche der Längs- und Querseiten gemieden wurden und die Aufnahmen somit an zentral gelegenen Punkten erfolgten.

Wiesen die auf den in Serie aufgenommenen Bildern dargestellten Partikel eine Übereinstimmung mit den zuvor gewählten Einstellungen (Fläche von 10 bis 22 μm) auf, konnten sie als Spermien definiert werden. Pro Probe wurden mindestens 500 Spermien oder 10 Felder gemessen. Zur Motilitätsanalyse wurden die Positionen der Spermien auf den verschiedenen Bildern verglichen und somit die Distanz ermittelt, die einzelne Samenzellen zurückgelegt hatten. Graphisch wurde dies durch farblich unterschiedliche Markierung der dargestellten Partikel bzw. der zurückgelegten Strecke dargestellt. Alle vorgenommenen Einstellungen zur Spermienbeurteilung sind dem Anhang zu entnehmen (9.1 Einstellungen des SpermVision®- und AndroVision®-Analysesystems). Für jede Messung wurde anhand der Spermienanzahl, des Messvolumens und des Verdünnungsfaktors die Dichte der Probe ermittelt. Ein Mittelwert

aller ermittelten Analysenwerte einer Probe ergab dann das endgültige Ergebnis. Es wurden sowohl die Zahlenwerte in Datenbanken, als auch Bilder und Videosequenzen automatisch vom SpermVision®- bzw. AndroVision®-System gespeichert.

3.6 Kryokonservierung

Es wurden Mini- und Midi-Pailletten eingesetzt. Zuerst wurde eine Mini-Paillette (0,25 ml) mit Probenflüssigkeit befüllt. War das Volumen des verbliebenen Sperma-Verdüner-Gemisches hoch genug, wurden weitere Mini- und Midi-Pailletten (0,50 ml) damit befüllt. Bei den Proben von 19 Nebenhoden reichte das Probenvolumen nur zur Befüllung einer Mini-Paillette aus.

Die verwendeten Pailletten wurden zur Kennzeichnung etikettiert und das Sperma-Verdüner-Gemisch mit einem Mikropipettor (Minitüb GmbH, Tiefenbach) aufgezogen. Der Verschluss der befüllten Pailletten erfolgte manuell durch das Einbringen von Verschlusskugeln. Es schloss sich eine Äquilibrationsphase von mindestens zwei Stunden in einer Styroporbox im Kühlschrank bei 4 °C an. Wurden die Proben mehrerer Hengste verarbeitet, kam es aus praktischen Gründen zu einer Verlängerung der Äquilibrationsdauer bis zu maximal 4 Stunden. Danach wurden die Pailletten im Stickstoffdampf weiter gekühlt. Hierzu wurde eine Einfriereinheit für 90 Pailletten (Minitüb GmbH, Tiefenbach) auf eine Höhe von zehn Zentimetern mit flüssigem Stickstoff befüllt. Ein Ladeblock für 20 Pailletten mit Schwimmrampe (Minitüb GmbH, Tiefenbach) wurde auf den Stickstoff gesetzt und darauf die Pailletten positioniert. So kühlten die Pailletten für 10 Minuten im Stickstoffdampf, 5 cm über dem flüssigen Stickstoff, weiter ab. Anschließend wurden die Pailletten mit einer vorgekühlten Pinzette in den Stickstoff gegeben, so dass sie am Boden der Einfriereinheit zum Liegen kamen und von hieraus direkt in den Aufbewahrungscontainer verbracht wurden.

3.7 Auftauen

Es wurden nur Mini-Pailletten aufgetaut und untersucht, um die Vergleichbarkeit aller Proben zu gewährleisten. Das Auftauen erfolgte frühestens 24 Stunden nach dem Einfrieren. Hierzu wurden die Pailletten aus dem Container entnommen und direkt für 20 Sekunden bei 37 °C in einem Wasserbad aufgetaut.

3.8 Histologie

Die Nebenhoden, aus denen kein Spermia gewonnen werden konnte, wurden histologisch aufbereitet. Dies war bei 13 Nebenhoden der Fall. Es handelte sich dabei um sechs Nebenhodenpaare und den extraabdominalen Nebenhoden eines kryptorchiden Hengstes. Die daraus angefertigten Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und mikroskopisch beurteilt, ob Spermien vorhanden waren.

Die Dehydrierung, Einbettung und Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde am Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen durchgeführt.

3.8.1 Fixierung

Die Nebenhodenstücke wurden in vorbeschriftete Einbettkassetten gelegt (Tissue-tek R, Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Netherlands) und mindestens sieben Tage in gepuffertes 10%iges Formalin eingelegt. Die Zusammensetzung des verwendeten Formalins zeigt Tabelle 13 (Anhang 9.2.3).

3.8.2 Dehydrierung der Proben

Nach der Fixierung wurden die Nebenhodenstücke über 48 Stunden in neutralem Puffer gewaschen, wobei nach 24 Stunden der Puffer gewechselt wurde. Danach wurden die Organteile über 24 Stunden in 70%igen Alkohol gelegt. Die Zusammensetzung des verwendeten neutralen Puffers und des 70%igen Alkohols zeigen die Tabellen 14 und 15 (Anhang 9.2.3).

3.8.3 Einbettung

Mittels aufsteigender Alkoholreihe erfolgte die weitere Dehydrierung der Proben (siehe Tabelle 16 im Anhang 9.2.3). Anschließend erfolgte die Einbettung mit einem Histoembeeder (Leica TP 1050; Leica Mikrosystem Vertrieb GmbH, Wetzlar). Dabei wurden die Präparate mit Paraffin bei 60 °C über 15 Minuten infiltriert. Anschließend wurden die einzelnen Proben in Bleiformen mit flüssigem Paraffinwachs (CN48.1; Carl Roth, Karlsruhe) überschichtet und auf einer Kühlplatte bei -4 °C aushärten gelassen.

3.8.4 Anfertigung der histologischen Präparate

Die Paraffinblöcke wurden gekühlt, um eine optimale Schneidfähigkeit herbeizuführen. Mit dem Rotationsmikrotom Leica RM 2125 (Leica Mikrosysteme Nussloch GmbH, Nussloch) wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in einem mit destilliertem Wasser aufgefüllten, 35 bis 38 °C warmen Wasserbad (G FL 1052, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) zum Strecken aufgefangen. Es folgte das Aufziehen der Schnitte auf Objektträger (Assistent-Objektträger Elka 76 x 26 mm, Matrand, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön), die zuvor im klinikseigenen Labor mit APES (3-Aminopropyltrimethoxysilan) beschichtet worden waren (siehe Tabelle 17 im Anhang 9.2.3). Die APES-Beschichtung soll ein Ablösen der Schnitte vom Objektträger bei der Färbung verhindern. Anschließend wurden die Schnitte im Wärmeschrank (Memmert SL 40, Memmert, Schwabach) bei 38 °C über Nacht getrocknet. Bis zur Färbung erfolgte die Lagerung der Präparate bei Raumtemperatur.

3.8.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur Visualisierung von Nebenhodengewebe und Spermien wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) durchgeführt. Das Färbeprotokoll ist in Tabelle 18 (Anhang 9.2.3) beschrieben. Unmittelbar nach dem Färben wurden die Präparate mit Entellan® (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

3.8.6 Lichtmikroskopische Untersuchung

Es wurden nur Präparate ausgewertet, die typische Gewebestrukturen darstellten und eine zufriedenstellende Qualität von Anschnitt und Färbung aufwiesen. Die Beurteilung erfolgte an einem Mikroskop mit positivem Phasenkontrast (Helmut Hund GmbH, Wetzlar) bei 1000-facher Vergrößerung (Objektiv 100x/1.25 Oel).

3.9 Statistische Methoden

Die erhobenen Daten wurden mit Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft Corporation) erfasst und verwaltet.

Die statistische Analyse erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Hierbei kamen folgende Programme des Statistikprogrammpaketes BMDP /Dynamic, Release 8.1 (DIXON, 1993) zum Einsatz: BMDP1D (einfache Datenbeschreibung) und BMDP2V (ein- und mehrfaktorielle Varianzanalyse bzw. Kovarianzanalyse mit Messwiederholungen).

Bei den morphologisch veränderten Spermien waren lediglich die Formen „Plasmotropfen am Hals“ und „Plasmotropfen gesamt“ normalverteilt. Da hier nur der Faktor Verdünner vorlag, konnten diese Daten dem t-Test für abhängige Stichproben mit dem Programm BMDP3D und einer einfaktoriellen Kovarianzanalyse mit Messwiederholungen (BMDP2V) unterzogen werden. Bei den rechtsschief verteilten Daten der anderen Pathomorphologien wurden die Zählergebnisse von „Riesenkopf“, „Lanzenform“, „Kolbenform“, „schmal“, „deformiert“, „Doppelkopf“, „Spatelform“, „abaxialer Schwanzansatz“, „paraxialer Schwanzansatz“, „retroaxialer Schwanzansatz“, „Halsbruch“, „aufgerollt“, „um Kopf gerollt“, „abgeknickt“ und „Doppelschwanz“ mit Hilfe der multiplen Poisson-Regression für gemischte hierarchische Modelle (Programm R 3.2.3, 2015, Free Software Foundation's GNU project, R-packages MASS, nlme und psych, R-Funktion glmmPQL) ausgewertet. Dabei wurde die hierarchische Zugehörigkeit der Proben zu einem bestimmten Alpakahengst als zufällige zusätzliche Einflussgröße berücksichtigt.

Die Analyse der Merkmale „Zwergkopf“, „Schleifenform“, „lose Köpfe“ und „Kopfkappen nicht vorhanden“ erfolgte durch Verwendung der negativen Binomialverteilung für gemischte hierarchische Modelle (Programm R 3.2.3, 2015, Free Software Foundation's GNU project, R-package MASS, nlme und psych, R-Funktion glmmPQL). Dabei wurde die hierarchische Zugehörigkeit der Proben zu einem bestimmten Alpakahengst als zufällige zusätzliche Einflussgröße berücksichtigt.

Die normalverteilten und daher mittels BMDP /Dynamic- Software (DIXON, 1993) analysierten Daten wurden als prozentualer Anteil bezogen auf alle ausgezählten Spermien der jeweiligen Probe (= 100%) angegeben.

Bei den nicht normalverteilten Daten, die mit dem Statistikprogramm R3.2.3 (2015, Free Software Foundation's GNU project, R-package MASS, nlme und psych, R-Funktion glmmPQL) ausgewertet worden waren, erfolgte die Wiedergabe als Zähl-
ergebnis bezogen auf 200 ausgezählte Spermien je Probe.

Die graphische Darstellung der Daten geschah mit Microsoft® Office Excel 2010 (Microsoft Corporation).

Zur einfachen Datenbeschreibung erfolgten bei quantitativen, annähernd normalverteilten Merkmalen die Angabe des arithmetischen Mittelwertes (\bar{x}), der Standardabweichung (SD), des Minimums (Min.) und des Maximums (Max.) in der Form $\bar{x} \pm . (SD)$ (Min.; Max.).

Bei starker Streuung wurde ergänzend der Median ermittelt und die graphische Darstellung erfolgte als Boxplot (Box-and-Whisker-Plot) mittels Quartilen (Q1 und Q3), Median, Minimum (Min.) und Maximum (Max.).

Das Signifikanzniveau betrug bei der Bewertung der statistischen Analysen $\alpha = 0,05$.
Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Hodenmaße

Die Hoden der Hengste, deren Sperma in die Untersuchung eingingen, wiesen durchschnittlich eine Länge von $5,40 \pm 0,94$ cm, eine Breite von $3,70 \pm 0,66$ cm, eine Höhe von $3,30 \pm 0,61$ cm und ein Volumen von $36,10 \pm 18,90$ cm³ auf. Sämtliche Messdaten dieser Probanden sind in Tabelle 20 (Anhang 9.3) dargestellt. 86,20 % der Hengste wiesen Unterschiede im Volumen von linkem und rechtem Hoden auf. Dies hatte keinen signifikanten Effekt auf die erhobenen spermatologischen Parameter.

Die Hengste, deren Nebenhoden histologisch untersucht wurden, besaßen durchschnittlich Hoden mit einer Länge von $4,40 \pm 1,10$ cm, einer Breite von $2,60 \pm 0,80$ cm, einer Höhe von $2,60 \pm 0,90$ cm und einem Volumen von $18,80 \pm 22,10$ cm³. Alle erhobenen Werte dieser Tiere finden sich in Tabelle 19 (Anhang 9.3).

4.2 Erfolgsquote

Es konnte aus 65 von 78 Nebenhoden Sperma zur Untersuchung gewonnen werden. Die Erfolgsquote der Spermagewinnung betrug bezogen auf alle Tiere 83 %. Der Median des Alters der 29 Hengste, von denen Sperma in die vorliegende Untersuchung einging betrug 36 Monate (Min. 24 Monate; Max. 60 Monate). Der Median des Alters der Hengste, von denen kein Sperma gewonnen werden konnte ($n = 7$) betrug 24 Monate (Min. 24 Monate; Max. 96 Monate). Abbildung 14 stellt die Altersverteilung aller 40 Probanden dar. Bei den Tieren, aus deren Nebenhoden kein Sperma gewonnen werden konnte, fällt auf, dass Minimum, erstes Quartil und Median den gleichen Wert (24 Monate) aufwiesen. Das dritte Quartil, d. h. der Bereich, in dem bis zu 75 % der Proben lagen, war bei dieser Probandengruppe 18 Monate niedriger als bei den Tieren, aus deren Nebenhoden Sperma gewonnen werden konnte.

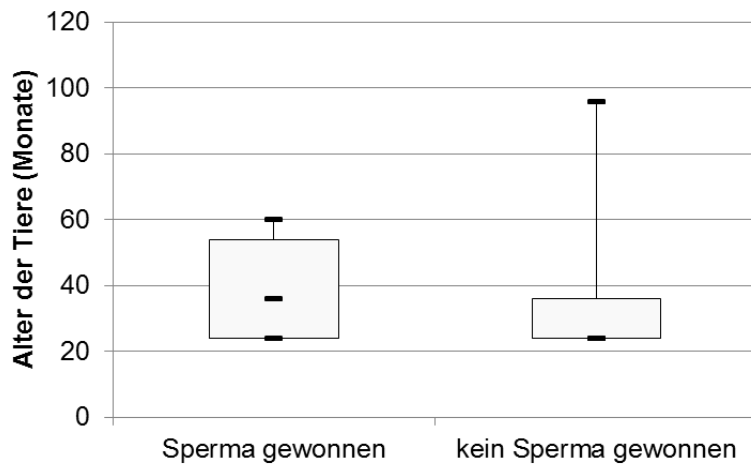


Abb. 3: Darstellung der Altersverteilung der Hengste (n = 40) mittels Box-and-Whisker-Plot. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Der kurze horizontale Strich in der Box ist der Median, der zentrale Wert der Datenverteilung. Die kurzen horizontalen Striche außerhalb der Box sind minimales und maximales Alter.

4.3 Mikroskopische Untersuchung vor Kryokonservierung

4.3.1 Supravitalfärbung

Nach Gewinnung waren durchschnittlich $76,70 \pm 11,60$ % (Min. 41,00 %; Max. 92,50 %) der Spermien vital. Der für beide Nebenhoden bzw. eingesetzten Verdünner getrennt ermittelte prozentuale Anteil lebender und toter Spermien ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Anteil lebender und toter Spermien (%) der aus 58 Nebenhoden gewonnenen Samenzellen vor Kryokonservierung; dargestellt durch Angabe von arithmetischem Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Median (Med.)

Parameter	Nebenhoden/ Verdüner	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.	Med.
Anzahl lebende Spermien (%) in der Probe direkt nach Gewinnung	links/ Andromed®	74,50 ± 11,62	45,00	88,50	75,50
	rechts/ Triladyl®	78,88 ± 10,55	41,00	92,50	80,50
Anzahl tote Spermien (%) in der Probe direkt nach Gewinnung	links/ Andromed®	25,50 ± 11,62	11,50	55,00	24,50
	rechts/ Triladyl®	21,12 ± 10,55	7,50	59,00	19,50

4.3.2 Spermienmembranintegrität

Im Mittel zeigten $69,50 \pm 10,48$ % der Spermien in 58 Proben nach Gewinnung im hypoosmotischen Schwelltest (HOS-Test) einen aufgerollten Schwanz (Tabelle 5).

Tab. 5: Anteil Spermien mit „curled tail“ und „not curled“ (%) vor Kryokonservierung (n = 58); arithmetischer Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Median (Med.) aufgeführt

Parameter	Nebenhoden/ Verdünner	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.	Med.
Anzahl Spermien mit „curled tail“ (%) in der Probe direkt nach Gewinnung	links/ Andromed®	69,71 ± 10,31	43,00	87,00	71,00
	rechts/ Triladyl®	69,33 ± 10,84	41,00	89,00	68,50
Anzahl Spermien „not curled“ (%) in der Probe direkt nach Gewinnung	links/ Andromed®	30,29 ± 10,31	13,00	57,00	29,00
	rechts/ Triladyl®	30,67 ± 10,84	11,00	59,00	31,50

4.3.3 Pathomorphologie

Durchschnittlich $38,40 \pm 12,69$ % (Min. 17,00 %; Max. 72,50 %) der Spermien waren pathomorphologisch verändert (Plasmotropfen nicht berücksichtigt).

In Tabelle 6 ist die gesamte Anzahl pathomorphologischer Spermien in 58 Proben für beide Nebenhoden bzw. Verdünner getrennt dargestellt.

Tab. 6: Darstellung der prozentualen Anteile morphologisch veränderter Spermien (%) in den Proben direkt nach Gewinnung (n = 58) anhand von arithmetischem Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Median (Med.)

Morphologische Veränderung	Nebenhoden/ Verdüner	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.	Med.
Anomale gesamt, direkt nach Gewinnung (ohne Plasmatropfen)	links/ Andromed®	39,43 ± 13,76	18,00	72,50	39,43
Anomale gesamt, direkt nach Gewinnung (ohne Plasmatropfen)	rechts/ Triladyl®	37,33 ± 11,93	7,00	65,00	37,50

Die Ergebnistabellen 21 und 22 im Anhang (9.3) geben die Werte einzelner Pathomorphologien der Proben vor Kryokonservierung wieder.

4.4 Computer assisted sperm analysis (CASA) vor Kryokonservierung

4.4.1 Dichte

Die initiale Dichte lag im Mittel bei $108,80 \pm 83,28$ Mio./ ml (Min. 12,30 Mio./ ml; Max. 475,90 Mio./ ml). Die große tierindividuelle Varianz der Dichtewerte bedingt die weite Spannbreite der Werte. Abbildung 4 stellt die Dichteverteilung einzelner Proben ($n = 58$) dar und veranschaulicht das Ausmaß der Spannbreite der Werte.

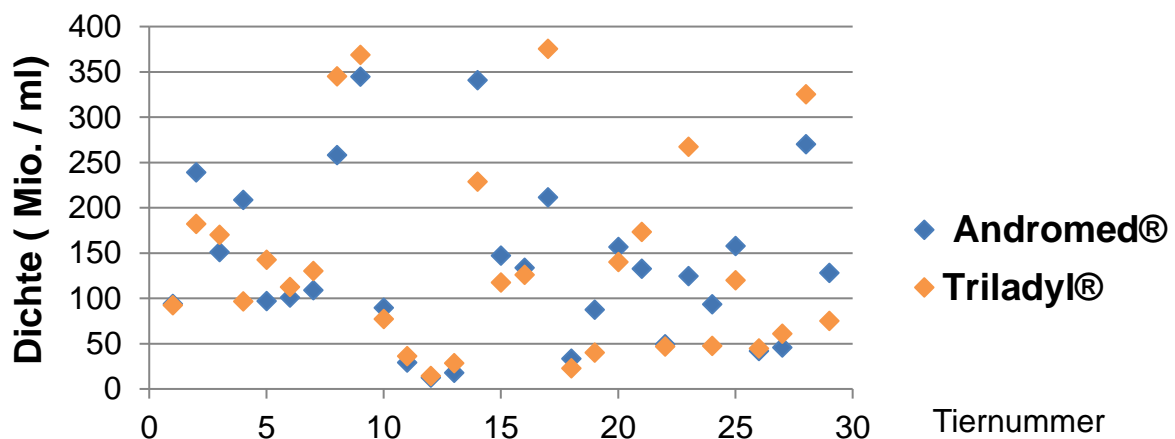


Abb. 4: Dichte (Mio./ ml) der Samenproben ($n = 58$) einzelner Tiere aus den Nebenhoden von Alpakas mit Andromed®- bzw. Triladyl®-Zusatz.

Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,44$) der Dichte zwischen den Proben der linken Nebenhoden mit Andromed® und den Proben der rechten Nebenhoden mit Triladyl®. Dies wird in Abbildung 5 anschaulich.

In Abbildung 5 sind die Dichtewerte der 58 Proben nach Nebenhodenseite beziehungsweise Verdünner getrennt zusammengefasst und dargestellt. Der Median der Proben mit Andromed® lag bei 93,40 Mio./ ml und der Median der Proben mit Triladyl® lag bei 93,80 Mio./ ml. Die Dichtewerte des ersten Quartils, d. h. des Bereiches in dem 25 bis 50 % der Proben liegen, wiesen nur eine geringe Differenz von 3 Mio./ ml auf. Die Werte des dritten Quartils, d. h. des Bereiches in dem 50 bis 75 % der Proben liegen, divergierten mit 11 Mio./ ml Unterschied.

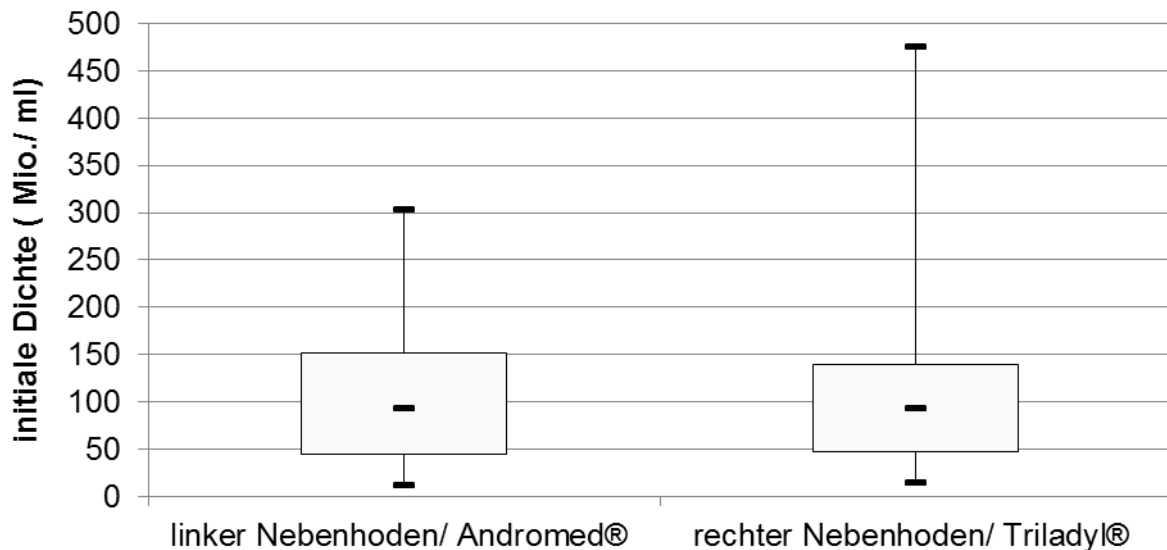


Abb. 5: Box-and-Whisker-Plot für die initiale Dichte (Mio./ ml) der Samenproben (n = 58) von Alpakahengsten nach Nebenhodenseite beziehungsweise Verdünner getrennt dargestellt. Die Box gibt den Bereich an, in dem 25 bis 75 % der Werte liegen. Der Strich in der Mitte der Box ist der Median, unterhalb dessen 50 % der Werte liegen. Zudem sind Minimum und Maximum (–) dargestellt.

4.4.2 Motilität

Die durchschnittliche Motilität der Proben lag bei $53,30 \pm 18,17$ % (Min. 19,30 %; Max. 92,00 %). In Tabelle 7 sind die Motilitätswerte der 58 Proben für jede Nebenhodenseite bzw. Verdünner getrennt aufgeführt.

Tab. 7: Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Median (Med.) motiler und immotiler Nebenhodenspermien (%) von Alpakahengsten vor der Kryokonservierung (n = 58)

Parameter	Nebenhoden/ Verdüner	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.	Med.
Anzahl motiler Spermien (%) der Probe direkt nach Gewinnung	links/ Andromed®	54,30 ± 18,17	19,30	92,00	52,50
	rechts/ Triladyl®	52,25 ± 18,43	19,30	89,10	47,90
Anzahl immotiler Spermien (%) der Probe direkt nach Gewinnung	links/ Andromed®	45,70 ± 18,17	8,00	80,70	47,50
	rechts/ Triladyl®	47,75 ± 18,43	10,90	80,70	52,10

4.5 Histologie

Es befanden sich in 23 % der histologischen Präparate Spermien in den Nebenhoden der sieben Tiere, von denen kein Sperma gewonnen werden konnte. Die histologischen Präparate, in denen Spermien nachgewiesen worden waren, stammten von Tieren im Alter von 2, 2 und 4 Jahren. In 77 % der histologischen Präparate waren keine Spermien in den Nebenhoden nachweisbar. Diese Präparate stammten von drei Tieren im Alter von 2 Jahren und einem Hengst mit 8 Jahren.

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen Anschnitte von Nebenhodengängen im Bereich des Nebenhodenschwanzes.

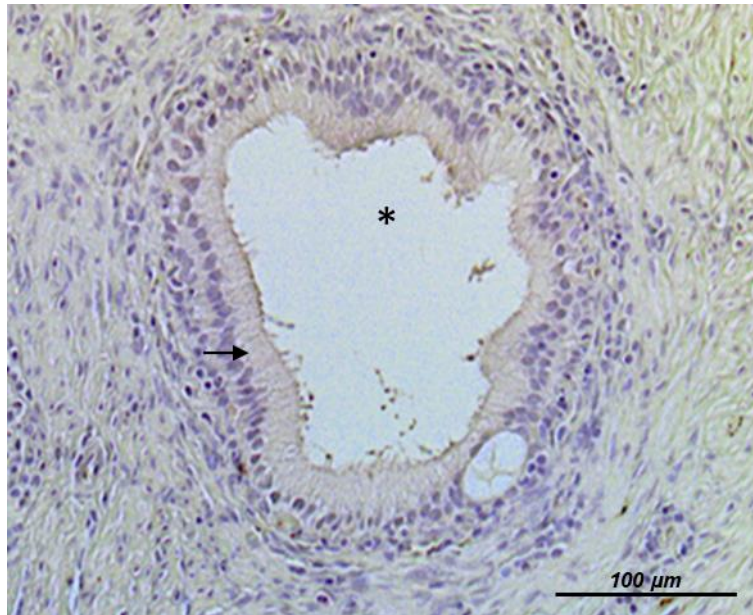


Abb. 6: Anschnitt des Nebenhodenganges eines Alpakahengstes (2 Jahre alt) ohne Spermien. Hämatoxylin-Eosin-gefärbtes Präparat, 200-fache Vergrößerung. Im Lumen (*) des Ductus epididymidis (→) waren keine Spermien detektierbar.

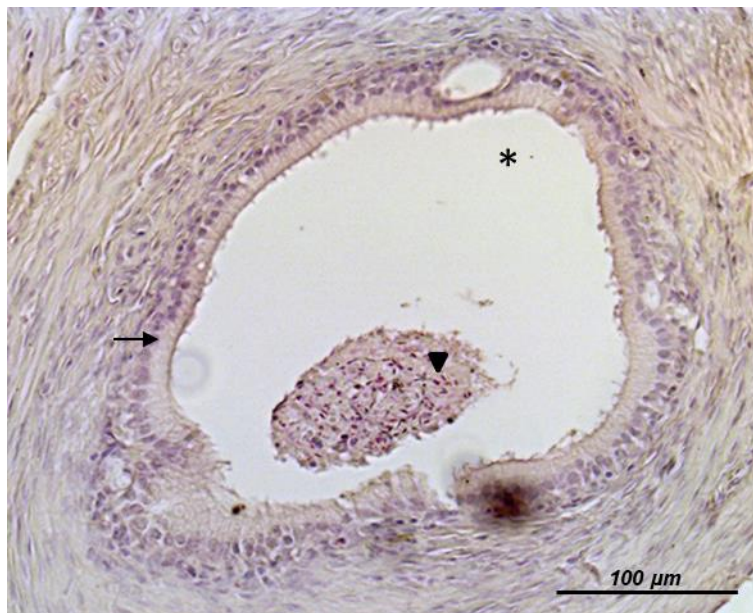


Abb. 7: Anschnitt des Nebenhodenganges eines Alpakahengstes (2 Jahre alt) mit Spermien. Hämatoxylin-Eosin-gefärbtes Präparat, 200-fache Vergrößerung. Im Lumen (*) des Ductus epididymidis (→) befand sich ein Konglomerat mit Zelldebris und Spermien (▼).

4.6 Mikroskopische Untersuchung nach Kryokonservierung

4.6.1 Supravitalfärbung

In den 58 aufgetauten Proben lebten durchschnittlich $28,80 \pm 19,48$ % der Spermien. Dabei lag das Minimum bei 0 % und das Maximum bei 72,50 %. In Tabelle 8 ist der Anteil lebender und toter Spermien nach Nebenhodenseite bzw. Verdünner getrennt dargestellt.

Tab. 8: Prozentsatz lebender und toter Nebenhodenspermien von Alpakahengsten in den Proben nach Kryokonservierung (n = 58) unter Angabe von arithmetischem Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Median (Med.)

Parameter	Nebenhoden/ Verdünner	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.	Med.
Anzahl lebende Spermien (%) in der aufgetauten Probe	links/ Andromed®	$24,66 \pm 18,96$	0,00	63,00	22,00
	rechts/ Triladyl®	$33,02 \pm 19,40$	1,00	72,50	28,50
Anzahl tote Spermien (%) in der aufgetauten Probe	links/ Andromed®	$75,34 \pm 18,96$	37,00	100,00	78,00
	rechts/ Triladyl®	$66,98 \pm 19,40$	27,50	99,00	71,50

4.6.2 Spermienmembranintegrität

Nach Kryokonservierung waren $30,90 \pm 13,82$ % (Min. 0,50 %; Max. 64,00 %) der Spermien intakt, d. h. sie hatten einen aufgerollten Schwanz. Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse des hypoosmotischen Schwelltests (HOS-Tests).

Tab. 9: Anteil Spermien mit „curled tail“ und „not curled“ (%) von Alpakahengsten nach dem Auftauen; es wurden Proben von 58 Nebenhoden ausgewertet; die Darstellung erfolgt durch Angabe von arithmetischem Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Median (Med.)

Parameter	Nebenhoden/ Verdünner	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.	Med.
Anzahl Spermien mit „curled tail“ (%) in der aufgetauten Probe	links/ Andromed®	28,72 ± 11,89	9,50	50,00	30,00
	rechts/ Triladyl®	33,07 ± 15,41	0,50	64,00	31,00
Anzahl Spermien „not curled“ (%) in der aufgetauten Probe	links/ Andromed®	71,28 ± 11,89	50,00	90,50	70,00
	rechts/ Triladyl®	66,93 ± 15,41	36,00	99,50	69,00

4.6.3 Pathomorphologie

Der mittlere Wert pathomorphologisch veränderter Spermien lag bei $44,10 \pm 17,00$ % (Min. 17,00 %; Max. 69,50 %). Bei dieser Zahl wurden Plasmatropfen nicht berücksichtigt. Tabelle 10 zeigt die Gesamtzahl der Anomalien in 58 Proben für beide Nebenhoden bzw. Verdünner getrennt aufgelistet.

Tab. 10: Prozentualer Anteil morphologisch veränderter Nebenhodenspermien von Alpakas insgesamt nach dem Auftauen (n = 58); es sind arithmetischer Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Median (Med.) aufgeführt

Morphologische Veränderung	Nebenhoden/ Verdüner	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.	Med.
Anomale gesamt in der aufgetauten Probe (ohne Plasmatropfen)	links/ Andromed®	44,22 ± 12,40	17,00	69,50	43,50
Anomale gesamt in der aufgetauten Probe (ohne Plasmatropfen)	rechts/ Triladyl®	43,98 ± 12,86	19,00	66,00	45,50

Im Anhang geben die Ergebnistabellen 23 und 24 die deskriptive Statistik einzelner Pathomorphologien der aufgetauten Proben wieder.

4.7 Computer assisted sperm analysis (CASA) nach Kryokonservierung

4.7.1 Motilität

Die aufgetauten Proben (n = 58) wiesen im Mittel eine Motilität von $10,30 \pm 9,04$ % (Min. 0,30 %; Max. 34,00 %) auf. Tabelle 11 zeigt alle gemessenen Motilitätswerte nach Kryokonservierung.

Tab. 11: Prozentualer Anteil motiler und immotiler Spermien von Alpakas nach der Kryokonservierung in 58 Proben ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max., Med.)

Parameter	Nebenhoden/ Verdünner	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.	Med.
Anzahl motiler Spermien (%) in der aufgetauten Probe	links/ Andromed®	$9,95 \pm 8,83$	0,60	34,00	6,90
	rechts/ Triladyl®	$10,70 \pm 9,38$	0,30	31,20	7,00
Anzahl immotiler Spermien (%) in der aufgetauten Probe	links/ Andromed®	$90,05 \pm 8,83$	66,00	99,40	93,10
	rechts/ Triladyl®	$89,30 \pm 9,38$	68,80	99,70	93,00

4.8. Wirksamkeit der Faktoren Verdünner, Kryokonservierung und Hodenvolumen

4.8.1. Auswirkungen von Verdünner und Kryokonservierung auf die Motilität

Der Verdünner hatte vor ($p = 0,54$) und nach Kryokonservierung ($p = 0,77$) keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Motilität.

Das Einfrieren hatte eine hoch signifikante Wirkung auf die Anzahl motiler Spermien ($p < 0,0001$).

Die Wechselwirkung der beiden Faktoren Verdünner und Einfrieren wirkte sich statistisch nicht signifikant auf die Motilität aus ($p = 0,31$).

Der prozentuale Anteil motiler Spermien in Andromed®- und Triladyl®-konservierten

Proben vor und nach Kryokonservierung (n = 58) ist in Abbildung 8 dargestellt.

Die Mediane (Zentralwerte) der Andromed®- und Triladyl®-Proben differierten um 4,60 % vor und um 0,10 % nach Kryokonservierung. Die Werte der Quartile 1 und 3 wichen maximal um 4,45 % voneinander ab. Diese Datenverteilung zeigt, dass der Verdünner keinen signifikanten Effekt hatte.

Im Vergleich der Werte vor und nach Kryokonservierung fielen dagegen signifikante Unterschiede auf. So betrug der Median der Andromed®-behandelten Proben vor Kryokonservierung 52,50 % und nach Kryokonservierung 6,90 % Motilität. Der Median der Triladyl®-behandelten Proben betrug vor Kryokonservierung 47,90 % und nach Kryokonservierung 7,00 % Motilität.

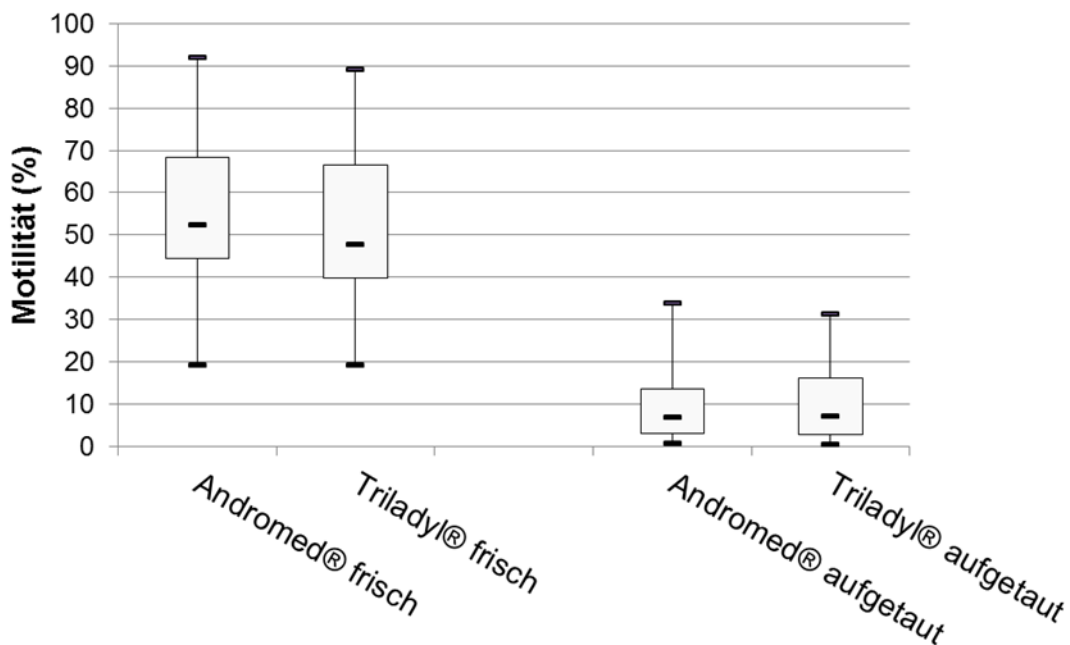


Abb. 8: Box-and-Whisker-Plot für Motilität der Andromed®- und Triladyl®-konservierten Samenproben (n = 58) vor und nach Kryokonservierung. Die Box gibt den Bereich an, in dem 25 bis 75 % der Werte liegen. Der Strich in der Mitte der Box ist der Median, der zentrale Wert der Datenverteilung, unterhalb dessen 50 % der Werte liegen. Die kurzen horizontalen Striche außerhalb der Box sind Minimum und Maximum der Motilität.

4.8.2 Auswirkungen von Verdünner und Kryokonservierung auf Eosin-G-Färbung und hypoosmotischen Schwelltest

Vor Kryokonservierung wirkte sich der Faktor Verdünner isoliert betrachtet nicht statistisch signifikant auf die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung aus ($p = 0,12$). Die Methode, d. h. ob Eosin-G-Färbung oder HOS-Test angewandt wurden, hatte statistisch hoch signifikante Auswirkungen auf die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung ($p < 0,0001$). Dies bestätigt Auffälligkeiten bei initialer Gegenüberstellung der Ergebnisse der Eosin-G-Färbung und des HOS-Tests. Dabei fielen bei 56 % der Präparate Unterschiede zwischen der Anzahl lebender und intakter Spermien von über 5 % auf. Die Wechselwirkung zwischen Verdünner und Methode überschritt das Signifikanzniveau ($p = 0,0171$).

Nach Kryokonservierung war die Auswirkung des Verdünners ($p = 0,0069$) und die Wechselwirkung zwischen Verdünner und Methode ($p = 0,0069$) statistisch signifikant. Die Methode hatte jedoch keine statistisch signifikanten Effekte auf die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung ($p = 0,12$).

Der Einfluss von Verdünner und Methode auf die Vitalitätsbestimmung äußerte sich in den statistisch signifikanten Wechselwirkungen zwischen den beiden Faktoren.

Die Kryokonservierung hatte eine hoch signifikante Wirkung ($p < 0,0001$) auf die Vitalität. Dadurch unterschied sich die Anzahl vitaler bzw. intakter Spermien vor und nach Kryokonservierung statistisch signifikant. Die Wechselwirkung zwischen Einfrieren und Methoden ($p = 0,0009$) war ebenso statistisch signifikant.

Der Vergleich des Anteils vitaler Spermien in Eosin-G-Ausstrich und HOS-Test stellt Abbildung 9 dar.

Die Mittelwerte unterschieden sich bezüglich der Methode bei den frischen Andromed®-behandelten Proben um 4,79 % und bei den Triladyl®-behandelten Proben um 9,55 %. Dies veranschaulicht die statistische Signifikanz der Methode vor Kryokonservierung. Nach Kryokonservierung war die Differenz zwischen den Verdünnern von bis zu 8,64 % bei Eosin-G-Ausstrichen signifikant.

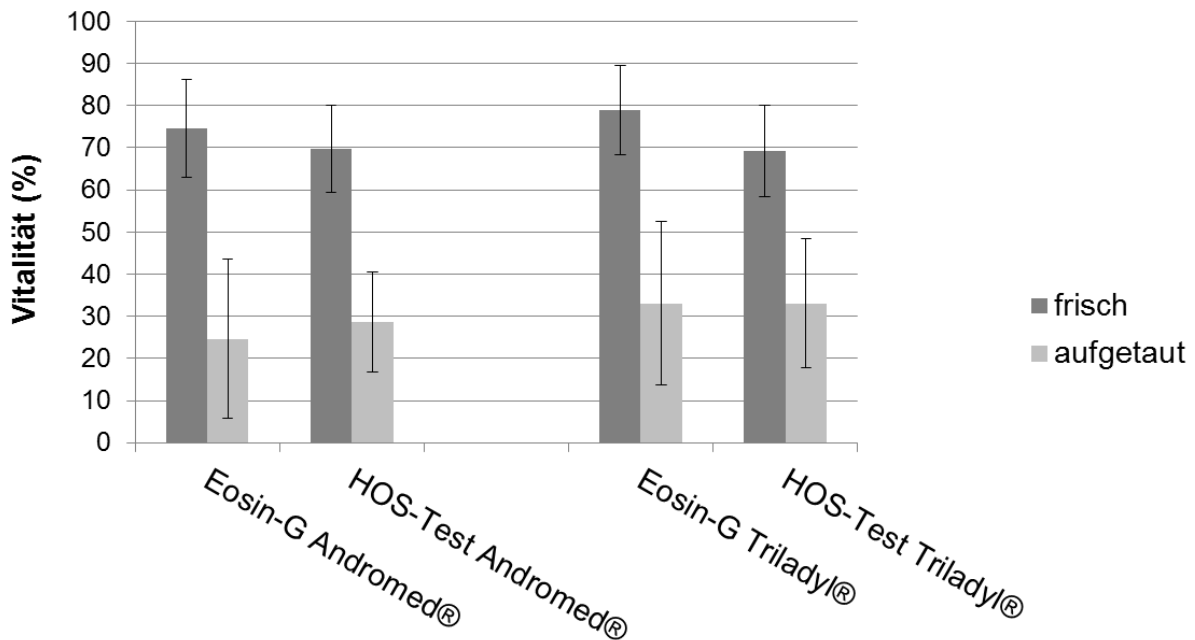


Abb. 9: Vitalität der Nebenhodenspermien von Alpakas in Eosin-G-Ausstrich und hypoosmotischem Schwelltest (HOS-Test) für Andromed®- und Triladyl®-behandelte Proben (n = 58) jeweils frisch und aufgetaut aufgezeigt. Dargestellt als Mittelwert (\bar{x}) mit Standardabweichung (SD).

4.8.3 Auswirkungen von Verdünner und Kryokonservierung auf die Pathomorphologie

Die Gesamtzahl veränderter Spermien wurde durch den Verdünner vor ($p = 0,52$) und nach Kryokonservierung ($p = 0,78$) nicht statistisch signifikant beeinflusst.

Die Kryokonservierung hatte statistisch signifikante Auswirkungen auf das Auftreten von Anomalien ($p = 0,0048$). Anhand des Anteils pathomorphologischer Spermien können somit gefrierbedingte Schäden der Spermien nachvollzogen werden.

Der prozentuale Anteil pathomorphologisch veränderter Spermien vor und nach Kryokonservierung für Andromed®- und Triladyl®- behandelte Proben zeigt Abbildung 10. Die Mediane der Andromed®- und Triladyl®- behandelten Proben wichen vor oder nach Kryokonservierung maximal 2 % voneinander ab. Die Zentralwerte desselben Verdünners vor und nach Kryokonservierung differierten dagegen bis zu 8 % (Triladyl®). Dies spiegelt die signifikante Wirkung der Kryokonservierung auf den Anteil pathomorphologischer Spermien wider.

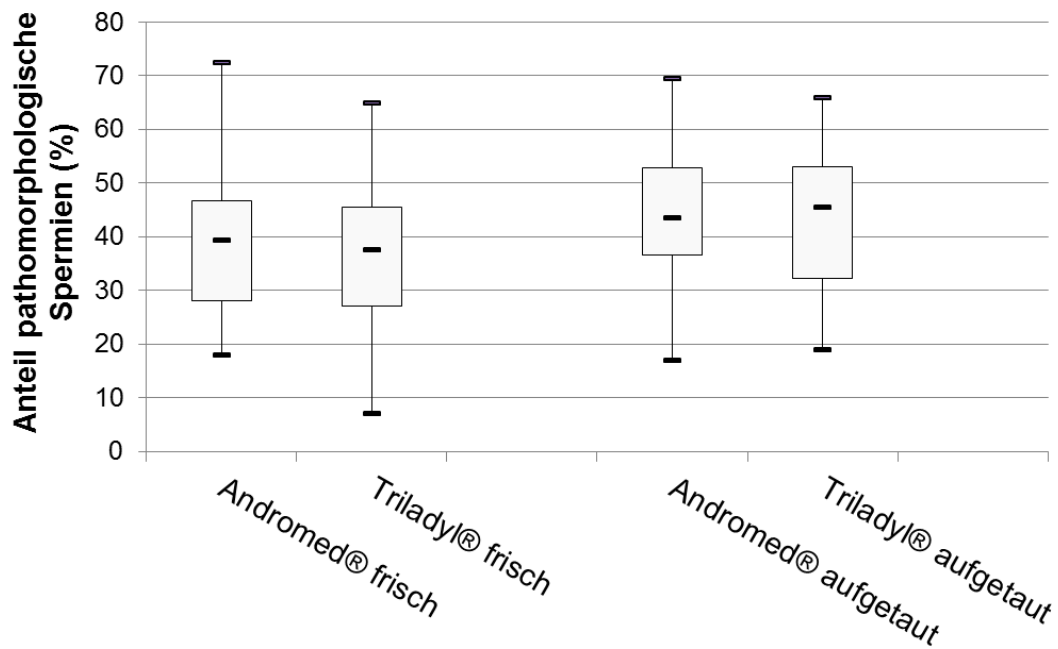


Abb. 10: Box-and-Whisker-Plot für den Anteil pathologisch veränderter Spermien von Alpakahengsten Andromed®- und Triladyl®-konservierter Proben (n = 58) vor und nach Kryokonservierung. Die Box gibt den Bereich an, in dem 25 bis 75 % der Werte liegen. Der Strich in der Mitte der Box ist der Median, unterhalb dessen 50 % der Werte liegen. Zudem sind Minimum und Maximum (–) dargestellt.

Die Abbildungen 11, 12 und 13 zeigen typische pathomorphologische Veränderungen von Alpakaspermien.

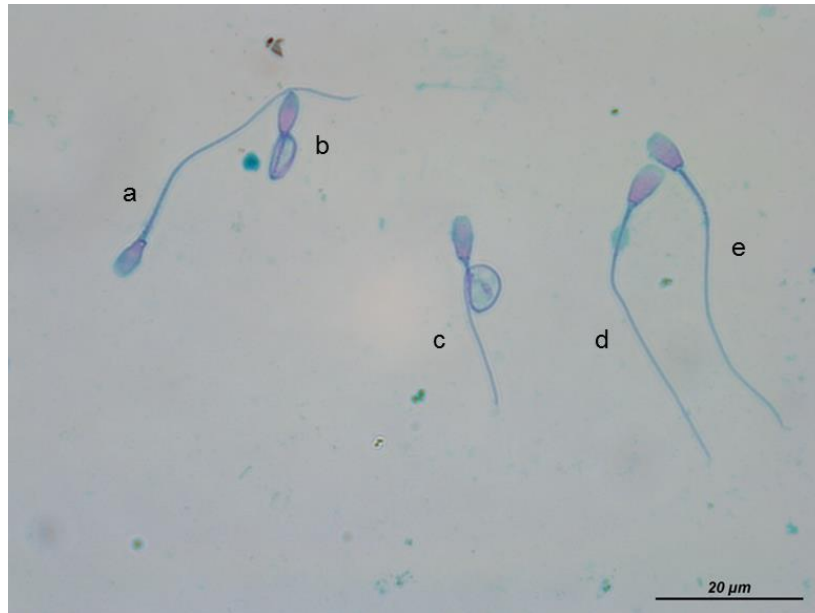


Abb. 11: Spermac®-Färbung, kryokonserviertes Alpakasperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl. a: Spermium mit Kolbenform des Kopfes, b: aufgerollter Schwanz, c: Spermium mit schleifenförmigem Schwanz, d: Spermium mit undeutlich angefärbtem Plasmotropfen, e: physiologisches Spermium.

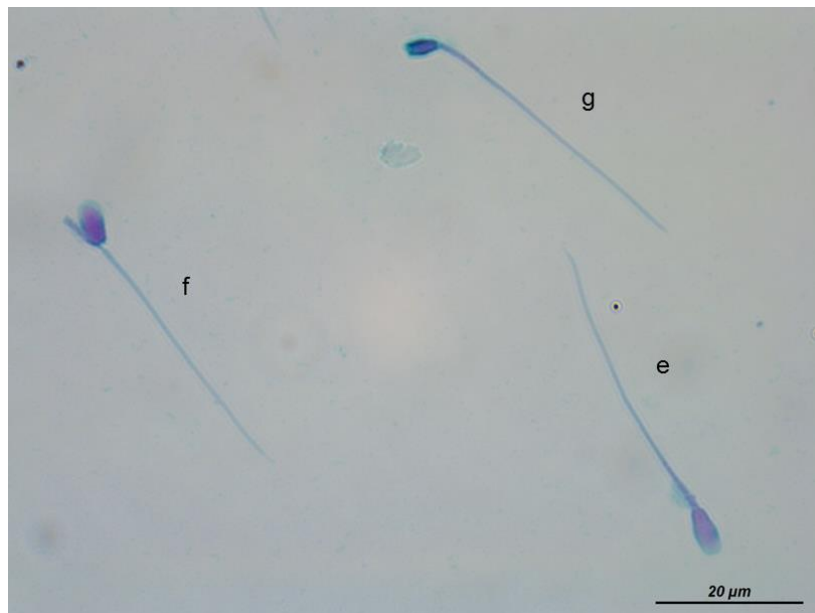


Abb. 12: Spermac®-Färbung, kryokonserviertes Alpakasperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl. f: Halsbruch, g: Spermium mit deformiertem Kopf, e: physiologisches Spermium.

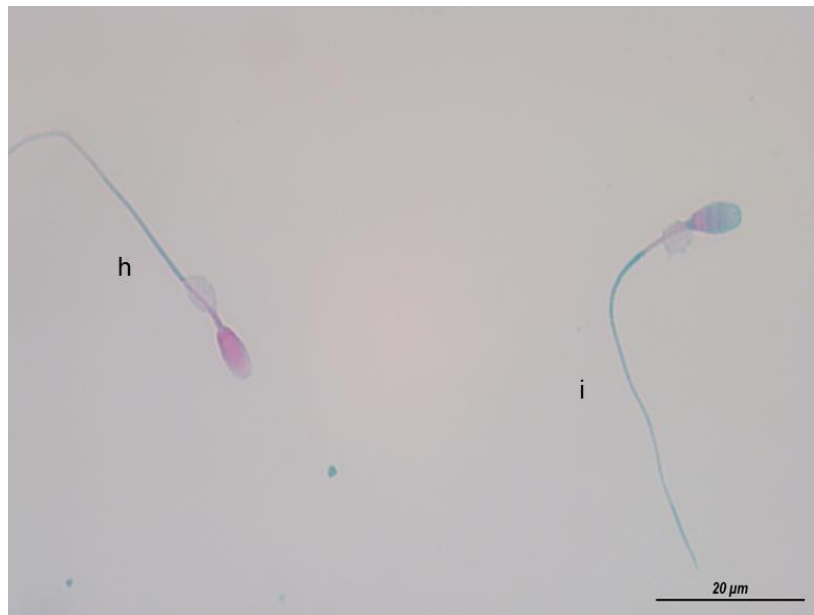


Abb. 13: Spermac®-Färbung, kryokonserviertes Alpakasperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl. h: Spermium mit abgelöstem Akrosom, i: Spermium mit vorhandenem Akrosom.

4.9 Effekte des Hodenvolumens

Das Hodenvolumen hatte auf die Motilität vor ($p = 0,36$) und nach ($p = 0,17$) Kryokonservierung keinen statistisch signifikanten Einfluss.

Auf die Ergebnisse der Supravitalfärbung und des HOS-Tests hatte das Hodenvolumen vor ($p = 0,82$) und nach ($p = 0,24$) Kryokonservierung keinen signifikanten Einfluss.

Auf den Anteil pathomorphologischer Spermien wirkte sich das Hodenvolumen vor ($p = 0,70$) und nach ($p = 0,93$) Kryokonservierung nicht statistisch signifikant aus.

Auf das Vorkommen einzelner Anomalien hatte das Hodenvolumen keine signifikante Wirkung. Dies wurde durch Einbezug der Kovariablen Hodenvolumen in die multiple Poisson-Regression und in das generalisierte lineare Modell mit Verwendung der negativen Binomialverteilung verifiziert. Die Ergebnisse dieser Analysen finden sich unter 9.3 im Anhang in Tabelle 25. Mit Hilfe der einfaktoriellen Kovarianzanalyse wurde ermittelt, dass das Hodenvolumen keine statistisch signifikante Wirkung auf die Gesamtzahl der Samenzellen mit Plasmotropfen ($p = 0,39$) hatte.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

In der Literatur ist die Gewinnung von Sperma aus den Nebenhoden beim Alpaka beschrieben. Zumeist wurden dazu die Nebenhoden post castrationem oder post mortem abgetrennt und anschließend zerkleinert (Kershaw-Young und Maxwell 2011; Choez et al. 2014; Morton et al. 2010a; Morton et al. 2010b).

Eine deutlich reduzierte Spermaqualität nach Kryokonservierung dieses Nebenhodenspermas war bereits festgestellt worden (Morton et al. 2010b; Santiani et al. 2005). Artübergreifend betrachtet sterben bis zu 50 % der Spermien während der Kryokonservierung ab (Holt 2000a; Watson 2000). Die Ursachen hierfür sind bis dato nicht vollständig identifiziert. Ungleiche Toleranzen der Spermien gegenüber Gefrierprozessen treten speziesabhängig auf. Gleichzeitig können die Spermien von Individuen einer Art massive Unterschiede hinsichtlich der Verträglichkeit von Gefrierprozessen aufweisen.

Bezüglich epididymalen Alpakaspermas wurden in der Literatur unterschiedliche Vorgehensweisen der Kryokonservierung geschildert. Dabei kamen verschiedene Verdüner (Morton et al. 2007), Kryoprotektoren (Terreros et al. 2015; Choez et al. 2014) und Gefriermethoden (Morton et al. 2010b) zum Einsatz. Die Anwendung von Andromed® (Abraham et al. 2016) und Triladyl® (Gómez-Quispe et al. 2016a) als Verdüner ist beschrieben.

Bisher gab es kein standardisiertes Protokoll für die Kryokonservierung epididymalen Alpakaspermas, welches von seinen Ergebnissen befriedigte. Zudem wurden bisher nicht beide Verdüner vergleichend getestet.

Ziel dieser Arbeit war es daher Sperma aus den Nebenhoden von Alpakahengsten durch Anschneiden zu gewinnen und zu testen, ob sich ein Protokoll mit den Verdünnern Andromed® und Triladyl® zur Kryokonservierung unter den vorliegenden Laborbedingungen etablieren lässt. Veränderungen der Spermaparameter durch die Gefrier- und Auftauvorgänge wurden durch Untersuchung der Proben vor und nach Kryokonservierung beurteilt. Zudem sollten zwei Methoden der Vitalitätsbestimmung von Samenzellen vergleichend bewertet werden.

5.2 Diskussion der Methodik

5.2.1 Auswahl der Probanden

Alle zur Probengewinnung eingesetzten Hengste gehörten zur Rasse Huacaya. Vorliegende Studien wurden ebenfalls an Huacaya-Hengsten durchgeführt (Santiani et al. 2005; Meza et al. 2018) oder es fehlten Angaben über die Rasse (Santiani et al. 2016; Choez et al. 2017; Morton et al. 2010a).

Entgegen einiger Studien, deren Probanden ein Mindestalter von 3 Jahren erreicht haben mussten (Choez et al. 2017; Mamani-Mango et al. 2019; Terreros et al. 2015), wurden in der vorliegenden Arbeit Tiere ab 2 Jahren eingesetzt. Bisher bezog lediglich eine Untersuchung Hengste dieses Alters ein (Morton et al. 2007). Daher sollte vorliegende Arbeit prüfen, ob bei Hengsten dieser Altersklasse Nebenhodensperma gewonnen werden kann. Die Alters-Spannweite wurde so gewählt, dass mit einer physiologisch ablaufenden Produktion und Reifung der Spermien gerechnet werden konnte (Smith et al. 1994). Die Hengste, aus deren Nebenhoden Sperma gewonnen wurde, waren durchschnittlich $40,56 \pm 15,60$ Monate (Min. 24 Monaten; Max. 72 Monate) alt. Die Notwendigkeit der Einbeziehung von jungen Hengsten in der vorliegenden Studie ergab sich daraus, dass Alpakahengste in der Regel in einem jungen Lebensalter kastriert werden.

Das durchschnittliche Alter der Hengste bei Morton et al. (2010b; 2007) reichte von $22,50 \pm 0,90$ Monaten bis $33,90 \pm 3,90$ Monate. Kershaw-Young und Maxwell (2011) erwähnen ein Durchschnittsalter der Probanden von $85,00 \pm 24,10$ Monaten.

Es wurde keine Selektion der Probanden oder gewonnenen Spermien durchgeführt. Keiner der Probanden war zuvor im Zuchteinsatz.

Dies stand im Gegensatz zu einigen Veröffentlichungen, in denen nur Proben mit einer zuvor definierten Mindestqualität (Gómez-Quispe et al. 2016a; Kershaw-Young und Maxwell 2011; Durand et al. 2016; Choez et al. 2017; Santiani et al. 2016) verwendet wurden. Andere Studien setzten ausschließlich Hengste ein, deren Fruchtbarkeit bereits erwiesen war (Perez et al. 2014; Meza et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst keine Selektion der Tiere oder gewonnenen Proben durchgeführt, um keine Ergebnisse zu erhalten, die nur für eine kleine Gruppe von Tieren zutreffen. Ziel war es, einen repräsentativen Überblick der Spermaqualität aller eingesetzten Probanden zu erhalten und damit der Situation in der Praxis nahezukommen.

5.2.2 Spermagewinnung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Nebenhoden nicht in Stücke zerteilt, um die Kontamination mit Blut zu minimieren. Erythrozyten können negative Auswirkungen auf die Kryokonservierung und die Erkennbarkeit der Spermien durch das eingesetzte CASA-System haben.

Bei der Spermagewinnung aus dem Nebenhoden ist die Stärke der Kontamination mit Blut vom Zerteilungsgrad des Gewebes abhängig. Werden die Nebenhoden zerkleinert, sind teils Zentrifugation und Waschen zur Eliminierung der Kontamination notwendig. Dies führt zur Hämolyse der Erythrozyten. Bei der Kryokonservierung verursachen Gefrier- und Auftauvorgänge ebenfalls hämolytische Prozesse, die zur Freisetzung von Hämoglobin aus den Erythrozyten führen. Hämoglobin wurde als Verursacher von negativen Auswirkungen auf die Spermaqualität angesehen (Rijsselaere et al. 2004). Die negativen Auswirkungen von Blutbeimengung auf die Kryokonservierung von Sperma wurden in der Literatur bereits diskutiert (Rijsselaere et al. 2004). Während geringgradige Blutbeimengungen keine Auswirkungen auf porcines Sperma hatten, konnten bei equinen und caninen Spermien negative Effekte nachgewiesen werden.

Abweichend vom Vorgehen der vorliegenden Arbeit wurden in der Literatur die Nebenhoden meistens in kleine Stücke zerteilt und in unterschiedliche Ausschwimmmedien für Spermien gegeben. So finden sich Angaben über den Einsatz von PBS-BSA (Kershaw-Young und Maxwell 2011) und verschiedener Verdünner, z. B. Androhep® (Morton et al. 2010a; Morton et al. 2007), Andromed® (Abraham et al. 2016), Tris-Eigelb- und Bioxcell®-Verdünner (Mamani-Mango et al. 2019).

Eine Alternative hätte die retrograde Spülung des Nebenhodenschwanzes durch den Ductus deferens dargestellt. Diese Methode ist bis dato unter anderem bei Bulle (Papa et al. 2015), Hengst (Papa et al. 2008), Rüde (Hori et al. 2015), Spix-Gelbzahnmeerschweinchen (Silva et al. 2017) und Iberiensteinbock (Santiago-Moreno et al. 2009) beschrieben. Bei Cameliden wurde die Methode zuerst bei Dromedaren eingesetzt (Monaco et al. 2016). Dabei traten trotz der Tier- und somit Nebenhodengröße einige Probleme auf. Dazu zählten fehlerhafte Katheterisierung und Ruptur des Ductus deferens, sowie Austritt von Puffer an den Einschnittsstellen. Daher konnten aus

4 von 18 Nebenhoden keine Spermien, und aus 4 von 18 Nebenhoden nur wenige Spermien gewonnen werden (Monaco et al. 2016).

Mamani-Mango et al. (2019) verglichen die Methoden der retrograden Spülung und der Zerkleinerung und Ausschwimmenlassen der Spermien bei Nebenhoden vom Alpaka. Die durchschnittliche Dichte der Proben aus retrograder Spülung ($25,1 \pm 17,6$ Mio.) war signifikant niedriger als bei den Proben nach Zerkleinern ($51,7 \pm 34,7$ Mio.). Die zuvor erhobenen Hodenparameter zeigten keine signifikanten Unterschiede, woraus die Autoren schlossen, dass die Parameter keinen Einfluss auf die Gewinnungsmethode hatten.

Zu Beginn des praktischen Teils der vorliegenden Untersuchung lagen keine Studien zur retrograden Spülung des Nebenhodens bei Cameliden vor. In der vorliegenden Arbeit wurde von der retrograden Spülung abgesehen um eine einheitliche, von der Tiergröße unabhängige Durchführung zu gewährleisten und keine Verluste des Probenmaterials zu riskieren.

Aufgrund der Fragestellung der Arbeit und aus tierschutzrechtlichen Gründen stellte die chirurgische Verlegung und Eröffnung der Samenleiter keine Alternative dar. Diese Technik wurde in einigen südamerikanischen Arbeiten angewandt (Meza et al. 2018; Pacheco-Curie et al. 2014; Pacheco et al. 2017; Gómez-Quispe et al. 2016a; Durand et al. 2016).

5.2.3 Mikroskopische Untersuchungsmethoden

Die Vitalitätsbestimmung von epididymalen Alpakasperma ist bisher nur wenig beschrieben.

Pacheco et al. (2017) führten an Alpakasperma aus dem Vas deferens mit und ohne Zusatz von Seminalplasma den HOS-Test (100 mosmol Lösung) und die Eosin-Nigrosin-Färbung durch. Die Autoren stellten keine positive Korrelation zwischen Endosmose im HOS-Test und Vitalität in der Supravitalfärbung fest. Pacheco et al. (2017) werteten dies als Hinweis, dass die Vitalität nicht zwangsläufig die Plasmamembranintegrität widerspiegelt.

Aus diesem Grund empfahlen einige Quellen den HOS-Test ergänzend zur Supravitalfärbung bei der Untersuchung von Alpakasperma (Pacheco et al. 2017; Zubair et al. 2015). Analog zu Vasquéz et al. (2012) wurden in vorliegender Arbeit der HOS-Test und die Supravitalfärbung mit Eosin-G eingesetzt. Vasquéz et al. (2012) poolten die

Proben der einzelnen Hengste und stellten keinen Bezug zwischen den Ergebnissen der beiden Untersuchungsmethoden her.

Folglich verglich die vorliegende Arbeit erstmals die Ergebnisse der Supravitalfärbung mittels Eosin ohne Zusatz von Nigrosin mit den Resultaten des HOS-Tests bei Sperma einzelner Nebenhoden.

Generell erfolgt die Vitalitätsbestimmung durch Ermittlung der Integrität der Plasmamembran der Spermien (Gottardo und Kliesch 2011). Die Eosin-Färbung gibt Aufschluss über die strukturelle Unversehrtheit der Plasmamembran und damit ihrer physikalischen Funktionalität. Der hypoosmotische Schwelltest zeigt, ob eine intakte Membran physiologische biochemische Aktivität aufweist.

Das Vorgehen bei der Eosin-Färbung war weitestgehend identisch zur Methode von Hoffmann (2003b).

Es finden sich divergierende Angaben in der Literatur über die Verfälschung von Ergebnissen oder Analyseprobleme bei der Eosin-Färbung durch Kristallbildung und nachträgliche Färbung von Spermien (Daub 2015). Um diese Probleme zu umgehen, erfolgte die Analyse der Eosin-Ausstriche direkt nach Anfertigung und Trocknung über drei Minuten. Es wurde die Anzahl an klaren (lebenden) und gefärbten (toten) Spermien bestimmt. Je Präparat wurden 200 Spermien beurteilt, da dies eine ausreichend hohe Anzahl für einen akzeptabel niedrigen Stichprobenfehler darstellt.

In Human- und Veterinärmedizin werden aus diesem Grund standardmäßig 200 Spermien je Präparat ausgezählt. Diese Zahl ist auch in den WHO-Richtlinien zur Untersuchung und Verarbeitung humanen Samens aufgeführt (Gottardo und Kliesch 2011).

Die Färbung mit Eosin wurde gewählt, da sie bereits zur Beurteilung von Alpaka-sperma eingesetzt wurde. Auf eine Kombination mit Nigrosin als Hintergrundfarbe wurde verzichtet, da hierdurch der Kontrast zwischen lebenden und toten Spermien nicht verstärkt wird (Daub 2015). Generell ist die Eosin-Färbung bei Spermauntersuchungen weit verbreitet und daher für die globale Beurteilung gut geeignet. Zudem ist die Färbung mit Eosin-G im andrologischen Labor der KGGA etabliert und wird regelmäßig angewandt. Diese Färbemethode ist einfach und schnell durchzuführen und deshalb für die Vitalitätsbestimmung im Rahmen der Routinediagnostik empfehlenswert.

Die Durchführung des HOS-Tests erfolgte analog zur Empfehlung für epididymales Alpakasperma von Vasquéz et al. (2012). Die genannten Autoren führten den HOS-Test mit unterschiedlich konzentrierten hypoosmotischen Lösungen (50, 100, 150, 200 und 275 mosmol) für 15 und 60 Minuten an epididymalem Alpakasperma aus. Die Studie ergab, dass die Verwendung einer 150 mosmol Lösung und eine Inkubation bei 38 °C optimal für den HOS-Test bei epididymalem Alpakasperma waren. Zwischen den Inkubationszeiten bestand kein signifikanter Unterschied.

In dieser Arbeit wurde die Inkubationszeit auf 30 Minuten erhöht. Ohne diese Modifikation wäre eine Durchführung der Untersuchungen durch nur eine Person nicht möglich gewesen. Aufgrund der Ergebnisse von Vasquéz et al. (2012) ist nicht von einer Auswirkung der Dauer auf den Verlauf des HOS-Tests auszugehen.

In vorliegender Literatur divergieren die Angaben über die ideale Osmolarität der eingesetzten Lösungen im HOS-Test für epididymales Alpakasperma (Vasquéz et al. 2012; Pacheco-Curie et al. 2014; Pacheco et al. 2017). In der durchgeführten Arbeit erfolgte der HOS-Test analog zu Vasquéz et al. (2012), da dies die einzige vorliegende Quelle zu Beginn des praktischen Teils dieser Arbeit war.

Der HOS-Test wurde eingesetzt, da bereits Erfahrungsberichte zur Anwendung an epididymalem Alpakasperma vorlagen. Darüber hinaus war der HOS-Test im andrologischen Labor der KGGA etabliert. Es handelt sich um einen kostengünstigen, sowie schnell und leicht durchzuführenden Test, der für die Routinediagnostik geeignet ist.

Anhand des HOS-Tests können nicht nur strukturelle, sondern auch biochemische Schäden der Membran festgestellt werden. Er ist daher zur Beurteilung der Befruchtungskapazität geeignet (Zubair et al. 2015; Daub 2015). Für den physiologischen Ablauf von Kapazitation, Akrosomenreaktion und Bindung des Spermatozoons an die Eizelle ist eine intakte Plasmamembran unabdingbar. Es fanden sich Belege für eine positive Korrelation des Anteils HOS-positiver Spermien mit Vorwärtsbeweglichkeit, Vitalität (Jeyendran et al. 1984; Karger et al. 2016), Akrosomenintegrität, Spermienkonzentration und Fertilität (Zubair et al. 2015). Trotz dieser Zusammenhänge war die Vorhersage der Qualität caninen Samens nach Kryokonservierung mit Hilfe des HOS-Tests nicht erfolgreich (Karger et al. 2016).

In dieser Arbeit erfolgte die Beurteilung der Pathomorphologie anhand der Spermac®-Färbung. Die farblich kontrastreiche Anfärbung einzelner Spermienbestandteile ermöglichte eine gute Erkennbarkeit des akrosomalen Status. Die Färbung hatte sich bereits bei der Evaluierung caniner Spermien bewährt (Goericke-Pesch et al. 2012; Goericke-Pesch und Failing 2013).

Spermac® war ebenso bei Spermauntersuchungen anderer Haustierarten, wie z. B. Schafen (Paulenz et al. 2002), eingesetzt worden. Methodenvergleichende Studien an Kater- und Hengstsperma (Schafer und Holzmann 2000; Runcan et al. 2014) empfahlen Spermac® insbesondere zur Akrosomenevaluierung. Zudem sollten Schwankungen in Zusammensetzung und Qualität auszuschließen sein, da es sich um ein kommerzielles Färbeset handelt.

Bei Cameliden traten dieselben pathomorphologischen Veränderungen der Spermien auf, wie bei anderen Nutztieren (Tibary und Vaughan 2006). Die Häufigkeit der Anomalien war hoch oder höher als bei anderen Nutztierarten (Morton et al. 2010a; Adams et al. 2009). Die Auswirkungen verschiedener Anomalien auf die Fertilität konnten bis dato nicht vollständig geklärt werden (Tibary und Vaughan 2006).

Plasmatropfen sind als Zeichen einer Prämaturität der Spermien zu werten. Bei der hier eingesetzten Gewinnungsmethode war ein hoher Anteil an Plasmatropfen zu erwarten. Da nicht davon auszugehen war, dass sich die Einfrier- und Auftauvorgänge auf die Anzahl der Plasmatropfen auswirken, wurden die Plasmatropfen nur vor dem Einfrieren ausgezählt.

5.2.4 Computer assisted sperm analysis (CASA)

Ein computergestütztes Spermienanalyse-Programm (SpermVision® und AndroVision®, Minitüb, Tiefenbach) bestimmte in dieser Arbeit Dichte und Motilität der Spermien. Dies erfolgte, um eine objektive Erfassung der Parameter zu gewährleisten (Verstegen et al. 2002).

Die Einstellungen zur optimalen Erkennung von Alpakasperma wurden mit Hilfe der Firma Minitüb (Tiefenbach) festgelegt, da vom Hersteller keine Voreinstellungen für diese Tierart vorlagen (siehe 9.2 Einstellungen des SpermVision®- und AndroVision®-Analysesystems). Diese Einstellungen waren für die Untersuchungen vor und nach

Kryokonservierung gleich, um einstellungsbedingte Abweichungen der Ergebnisse zu verhindern.

Morphometrische Spermienuntersuchungen mittels CASA wurden bereits erfolgreich an Alpakaejakulaten durchgeführt (Soler et al. 2014b; Ordóñez et al. 2012; Buendia et al. 2002). Dabei wurden einige Parameter zu Größe und Form gemessen bzw. aus den Messungen berechnet. Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe des Integrated Semen Analysis Systems (ISAS®) durchgeführt.

Soler et al. (2014b) führten Messungen an Ejakulaten von Alpaka und Lama durch. Im Vergleich waren die Spermienköpfe vom Alpaka signifikant größer als die Spermienköpfe vom Lama. Die Proben einzelner Hengste, sowie verschiedener Hengste wiesen Variationen auf, die beim Lama größer waren (Soler et al. 2014b).

Die einzige bis dato vorliegende CASA- gestützte Dichte- und Motilitätsmessung beim Alpaka erfolgte an Spermien aus dem Vas deferens (Meza et al. 2018). Dabei wurden von fünf Hengsten über die Zuchtsaison alle drei Tage jeweils fünf Proben entnommen und nach einer Pause von sieben Tagen das Vorgehen wiederholt. Die initial erste erfolgreiche Probenentnahme gelang 50 Tage post operationem. Nach einer Pause von neun Tagen erfolgte anschließend das oben beschriebene Vorgehen der Probenengewinnung. Die Autoren erfassten neben Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit weitere Motilitätsparameter (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF). Meza et al. (2018) setzten ein anderes CASA-System (ISAS®) ein als in vorliegender Arbeit und die Einstellungen des CASA wichen ebenfalls von denen der hier durchgeführten Untersuchung ab.

CASA-Systeme definieren initial die Charakteristika motiler Zellen um daraus Spermien zu bestimmen. Daher wurden teilweise Partikel, die keine Spermien waren, fälschlicherweise als Spermien klassifiziert. Dadurch kam es zur Überschätzung der Konzentration der Spermien und Fehlberechnung der Motilität (Comhaire et al. 1992).

Verdünnerbestandteile und Blut können aufgrund ihrer spermienähnlichen Größe zu derartigen Fehlmessungen führen.

Die Erythrozyten von Cameliden wurden als verhältnismäßig klein mit einem mittleren Erythrozyteneinzelvolumen (MCV) bis zu 28 Femtoliter (fL) beschrieben (Tornquist und Cebra 2014). Die ovale Form der Erythrozyten verstärkt zudem die

morphologische Ähnlichkeit mit Alpakaspermienköpfen, die als elliptisch beschrieben wurden (Morton et al. 2010b).

Proteine tierischen Ursprungs in Verdünnern enthielten Partikel, die von den CASA-Systemen als Spermien fehleingestuft wurden (Comhaire et al. 1992; Verstegen et al. 2002).

In der Literatur finden sich divergierende Ergebnisse zu Fehleinschätzungen der Dichte durch CASA. Bei Untersuchungen caniner Spermien wurden Überschätzungen (Iguer-Ouada und Verstegen 2001) und Unterschätzungen (Rijsselaere et al. 2003) der Konzentration beobachtet. Kollisionen der Spermien und dadurch bedingte Mehrfachmessungen derselben Spermien wurden als Grund für die Überschätzung der Spermienkonzentration angeführt. Bei niedrigen Konzentrationen der analysierten Proben wurden vermutlich Partikel als Spermien missinterpretiert (Verstegen et al. 2002).

Auf die Motilität wirkten sich unter anderem Probenvorbereitung, Probertemperatur, der eingesetzte Verdünner, Kammertiefe und Systemeinstellungen aus. Die Beeinträchtigung von Untersuchungen durch diese Faktoren könnte eine Erklärung für die Fehleinschätzung der Motilität durch CASA-Systeme sein (Miss 2012). Andere Studien erzielten statistisch signifikante Korrelationen zwischen subjektiv geschätzter und mittels CASA erhobener Motilitätswerte (Amann und Hammerstedt 1980; Talarczyk-Desole et al. 2017; Rijsselaere et al. 2003).

5.2.5 Histologie

In der Literatur wurde bereits erwähnt, dass teilweise die Spermagewinnung aus Nebenhoden von Alpakahengsten nicht möglich war (Morton et al., 2010b). Die vorliegende Arbeit führte erstmals eine histologische Untersuchung des Nebenhodengewebes durch, aus dem kein Sperma gewonnen werden konnte. Anhand der daraus angefertigten Präparate wurde geklärt, ob Spermien im Ductus epididymidis des jeweiligen Nebenhodens vorhanden waren oder nicht.

Es fand sich kein Protokoll für die Anfertigung histologischer Präparate aus Alpakanebenhoden. Daher erfolgten die Aufbereitung, Färbung und Untersuchung der histologischen Präparate nach dem standardisierten Vorgehen bei Hunden (Philipp 2011). Die Auswertung der histologisch aufbereiteten Nebenhodenschwänze war bei allen Präparaten möglich.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Erfolgsquote

Die Erfolgsquote der Spermagewinnung betrug in der vorliegenden Arbeit bezogen auf alle Tiere 83 % und lag unter den Werten vergleichbarer Studien (Morton et al. 2010b; Morton et al. 2007). Die von Morton et al. (2010b) erreichten Erfolgsquoten betragen 90,9 % in Experiment 1 und 100 % in Experiment 2. Die Probanden waren knapp unter 3 Jahre alt (Experiment 1: $33,90 \pm 3,90$ Monate; Experiment 2: $32,50 \pm 1,80$ Monate).

Das durchschnittliche Alter der Probanden bei Morton et al. (2007) betrug in Experiment 1 $32,90 \pm 5,80$ Monate und in Experiment 2 $22,50 \pm 0,90$ Monate. Angaben über die Hodengröße wurden bei Morton et al. (2010b; 2007) keine gemacht. Da die Probanden von Experiment 2 bei Morton et al. (2007) unter 2 Jahren alt waren, scheint das Alter nicht der alleinige Grund für die unterschiedliche Erfolgsrate zu sein. Unterschiede in der Gewinnungsmethode können die divergierenden Erfolgsquoten begründen. Zudem war die Studienpopulation in vorliegender Arbeit größer und wesentlich heterogener. Betrachtet man die Probandengruppen der einzelnen Experimente bei Morton et al. (2010b; 2007), wiesen diese eine einheitlichere Altersverteilung auf. Dies könnte sich ebenfalls positiv auf die Erfolgsquote ausgewirkt haben.

In der vorliegenden Studie befanden sich ältere Hengste (4 und 8 Jahre) unter den Tieren, von denen kein Spermium gewonnen wurde. Auch dieser Sachverhalt spricht dafür, dass sich multiple Faktoren auf die Erfolgsquote auswirken und nicht nur das Alter der Probanden ausschlaggebend war. Faktoren, die mit dem erfolglosen Gewinnungsversuch bei den beiden älteren Hengsten (4 und 8 Jahre) in Zusammenhang standen, konnten auf Basis der ermittelten Daten nicht festgestellt werden.

Beim Menschen waren 15 % der Fälle männlicher Infertilität durch Azoospermie bedingt (Wosnitzer und Goldstein 2014). Zur Häufigkeit von Azoospermie beim Alpaka liegen keine Zahlen vor.

In der vorliegenden Arbeit konnte von 68,75 % der zweijährigen Hengste Spermium gewonnen werden. Bezogen auf die Gesamtzahl der Probanden waren 38 % der Hengste, von denen Spermium gewonnen werden konnte, 2 Jahre alt. Entgegen einiger

Quellen, die ein Mindestalter der Probanden von 3 Jahren vorschrieben (Terreros et al. 2015; Choez et al. 2017), war somit die Gewinnung von epididymalem Sperma bei Tieren unter 3 Jahren möglich.

Es ist davon auszugehen, dass bei den zweijährigen Hengsten, von denen kein Sperma gewonnen werden konnte, keine Spermaproduktion vorlag oder die Spermaproduktion gerade eingesetzt hatte. Die Anzahl gebildeter Spermien steigt während der Entwicklung der Tiere von Geschlechts- zur Zuchtreife an. Vorliegende Literatur nennt für das Alpaka den Beginn der Spermaproduktion im Alter von 10 bis 12 Monaten (Smith et al. 1994), von einer Zuchtreife hingegen erst im Alter von ca. 30 bis 36 Monaten (Knauf et al. 2008). Zudem wirken sich Genetik, alimentäre Faktoren, Klima und zu welcher Jahreszeit das Tier geboren wurde auf den Zeitpunkt des Pubertätseintritts aus (Tibary und Vaughan 2006).

5.3.2 Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung

Die Vitalitätswerte in der vorliegenden Arbeit betragen vor Kryokonservierung durchschnittlich $76,70 \pm 11,60$ %. Nach Kryokonservierung lag die Vitalität durchschnittlich bei $28,80 \pm 19,48$ % und bei den Proben mit Andromed® bei $24,66 \pm 18,96$ %. Damit blieben die Vitalitätsraten der Andromed®-konservierten Proben nach Kryokonservierung um ca. 1,50 % unter den Literaturwerten. Die Vitalitätsraten der Proben mit Andromed® vor Kryokonservierung und der Proben mit Triladyl® lagen im Schwankungsbereich der vorliegenden Literaturangaben (Gomez-Quispe et al. 2016b; Mamani-Mango et al. 2019; Pacheco et al. 2017; Pacheco-Curie et al. 2014). Vor Kryokonservierung betrug der Anteil vitaler Spermien in der Literatur 67,20 % bis zu $79,30 \pm 6,06$ % (Gomez-Quispe et al. 2016b; Mamani-Mango et al. 2019; Pacheco-Curie et al. 2014; Vásquez et al. 2013). Nach Kryokonservierung lagen die Vitalitätswerte bei $26,13 \pm 3,08$ % bis zu maximal $47,96 \pm 2,36$ % (Gomez-Quispe et al. 2016b; Mamani-Mango et al. 2019).

Eine Vorselektion der verwendeten Proben könnte die höhere Vitalität nach Kryokonservierung und die geringere Spannbreite bei Gomez-Quispe et al. (2016b) erklären. Dort wurden nur Probanden eingesetzt, deren Sperma in Voruntersuchungen > 50 % Vorwärtsbeweglichkeit, > 60 % Plasmamembranintegrität und > 80 % Vitalität aufwiesen.

Im HOS-Test betrug die Vitalität vor Kryokonservierung durchschnittlich $69,50 \pm 10,48$ % und bei den Proben mit Triladyl® $69,33 \pm 10,84$ %. Nach Kryokonservierung lag die Vitalität durchschnittlich bei $30,90 \pm 13,82$ % und bei den Triladyl®-konservierten Proben bei $33,07 \pm 15,41$ %.

Damit befanden sich die erreichten Werte in der Schwankungsbreite vorliegender Literaturangaben und waren im Falle der Triladyl®-behandelten Proben höher (Gomez-Quispe et al. 2016b; Durand et al. 2016; Mamani-Mango et al. 2019; Terreros et al. 2015; Vasquez et al. 2012). Vor Kryokonservierung erzielten Mamani-Mango et al. (2019) mit $35,60 \pm 16,40$ % bis $40,00 \pm 13,10$ % die niedrigsten Vitalitätsraten. Pacheco et al. (2017) erreichten $57,46$ % bis $69,12$ % vitale Spermien. Gomez-Quispe et al. (2016b) zeigten mit $79,30 \pm 6,06$ % die höchsten Vitalitätswerte. Proben mit Triladyl® wiesen bei Durand et al. (2016) durchschnittlich $52,98 \pm 7,63$ % Vitalität auf.

Nach Kryokonservierung betrug der Schwankungsbereich in der Literatur $14,90 \pm 10,50$ bis $44,20 \pm 4,69$ % (Gomez-Quispe et al. 2016b; Mamani-Mango et al. 2019; Terreros et al. 2015). Proben mit Triladyl® wiesen bei Durand et al. (2016) durchschnittlich $32,18 \pm 5,95$ % vitale Spermien auf.

In vorliegender Arbeit wirkte sich die Methode der Vitalitätsbestimmung, d. h. ob Eosin-Färbung oder HOS-Test eingesetzt wurden, vor Kryokonservierung signifikant auf die Ergebnisse aus. Dies stimmte mit den Resultaten vorliegender Literatur überein (Pacheco et al. 2017). Pacheco et al. (2017) verglichen die Ergebnisse epididymalen Spermias mit und ohne Zusatz von Seminalplasma in HOS-Test und Eosin-Nigrosin-Färbung. Pacheco et al. (2017) stellten zwischen den beiden Methoden eine negative Korrelation fest. Daraus folgerten die Autoren, dass die Vitalität nicht zwangsläufig die Plasmamembranintegrität widerspiegelt.

Interessanterweise waren in vorliegender Untersuchung nach Kryokonservierung die Effekte der Methode nicht signifikant. Dagegen wirkten sich die Kryokonservierung und der Verdünner signifikant aus. Es liegt die Vermutung nahe, dass durch die signifikante Wirkung der Kryokonservierung die Effekte des Verdünners in den Vordergrund traten. Die Wechselwirkungen zwischen Einfrieren und Methode, sowie zwischen Verdünner und Methode waren vor und nach Kryokonservierung signifikant. Daher ist anzunehmen, dass alle drei genannten Faktoren einen Effekt auf das Ergebnis hatten, aber zu den verschiedenen Zeitpunkten die Wirkung unterschiedlicher Faktoren überwog.

Zu Untersuchungen nach Kryokonservierung lag keine vergleichbare Literatur vor, die diese Annahmen bestätigen oder widerlegen könnte.

Aus diesem Grund ist der Empfehlung von Pacheco et al. (2017) zuzustimmen, dass eine Kombination von Supravitalfärbung und HOS-Test zur Vitalitätsbewertung sinnvoll ist.

Der Anteil pathomorphologisch veränderter Spermien betrug durchschnittlich $38,40 \pm 12,69$ % vor und $44,10 \pm 12,41$ % nach Kryokonservierung. Damit lagen die erzielten Werte im Schwankungsbereich der Literaturangaben bzgl. frischer Ejakulate. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Anteil von Pathomorphologien bei Nebenhodensperma vom Alpaka bestimmt.

In der Literatur wurde bei humanem Sperma bezüglich der Morphologie vor Kryokonservierung keine signifikanten Unterschiede zwischen epididymalem und ejakuliertem Sperma nachgewiesen (Steele et al. 2000). Daher wurden zum Vergleich Werte von frischen Ejakulaten herangezogen.

Bei Alpakaejakulaten zählten Bravo et al. (1997a) und Morton et al. (2010a) an Giemsa-gefärbten Ausstrichen den Anteil anormaler Köpfe, Mittelstücke, Schwänze, sowie Zytoplasmotropfen aus. Anomalien zeigten bei Bravo et al. (1997a) $24,10 \pm 2,10$ % und bei Morton et al. (2010a) bis zu $48,00 \pm 5,50$ % der ejakulierten Spermien. Die große Schwankungsbreite, der in diesen Studien angegebenen Werte könnte durch unterschiedlich definierte Kriterien und Einteilung der Pathomorphologien begründet sein. In beiden Studien wurde keine detailliertere Unterteilung genannt, wie z. B. Spatelform, Kolbenform etc. und dadurch auch nicht genauer definiert, was als pathologisch und was als physiologisch angesehen wurde. Der Anteil von Zytoplasmotropfen erklärt nicht die große Differenz zwischen beiden Studien.

Zwei chilenische Untersuchungen evaluierten unter anderem die Pathomorphologie von Alpakaejakulaten mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Harris. Dies erfolgte zu Beginn (Flores et al. 2002) und zu verschiedenen Zeitpunkten der Decksaison (Urquieta et al. 2005). Flores et al. (2002) wiesen durchschnittlich $51,00 \pm 12,40$ % normale Spermien nach. Bei den Pathologien war der Anteil von Mittelstückdefekten mit $14,40$ % am höchsten. Anormale Köpfe ($13,20$ %) und Schwänze ($11,80$ %) kamen seltener vor. Lose Köpfe und Zytoplasmotropfen wurden separat erfasst. Lose Köpfe traten häufiger nach 90 Tagen sexueller Inaktivität ($19,30 \pm 21,20$ %) als nach

45 Tagen ($10,90 \pm 6 \%$) Deckpause auf. Flores et al. (2002) nahmen eine Einteilung der Kopfformen in klein, groß, pyriform, konische Form, amorph und Doppelkopf vor. Bei Urquieta et al. (2005) betrug der Anteil normaler Spermien $51,00 \pm 12,40 \%$ (Tag 1) bis $59,30 \pm 13,50 \%$ (Tag 5). Die Werte wiesen signifikante Unterschiede zwischen den Tagen 1 und 5, sowie 1 und 12 auf.

Der Prozentsatz pathologischer Spermien in der vorliegenden Arbeit war damit geringer als entsprechende Werte der chilenischen Studien (Flores et al. 2002; Urquieta et al. 2005). Da die Einteilung der pathomorphologischen Formen nicht definiert wurde (Urquieta et al. 2005) oder von der vorliegenden Arbeit abwich (Flores et al. 2002) ist ein Vergleich nur unter Vorbehalt möglich.

Darüber hinaus existieren morphometrische Studien an Alpakaejakulaten. Darin wurden die Spermienköpfe vermessen und anhand der ermittelten Daten (Länge, Breite, Perimeter und Fläche des Spermienkopfes) klassifiziert. Die verschiedenen Formen und Größen der Spermienköpfe wurden wiederum in physiologisch und pathologisch eingeteilt. Die Untersuchungen erfolgten mittels computer assistierter Spermien Analyse (ISAS® CASA-System) (Buendia et al. 2002) und nicht-automatisierter digitaler Methoden (Evangelista-Vargas et al. 2017).

Eine Modifikation der Klassifizierung von Buendia et al. (2002) erfolgte in einer morphometrischen Studie an fraktioniert gewonnenen Lamaejakulaten (Soler et al. 2014a). Die Morphometrie der Spermienköpfe wies individuelle Unterschiede auf, schien aber über den Zeitraum der Ejakulation konstant zu sein.

In einer artübergreifenden Studie waren im Vergleich zum Lama die Spermienköpfe vom Alpaka signifikant größer (Soler et al. 2014b). Die erhobenen Parameter variierten innerhalb der Proben einzelner Hengste, sowie zwischen verschiedenen Hengsten. Diese Variationen waren beim Lama signifikant größer (Soler et al. 2014b). Soler et al.; Soler et al. (2014b; 2014a) nutzen in beiden Studien ein ISAS® CASA-System.

Aussagen zur Gesamtzahl pathologischer oder physiologischer Spermien je Probe wurden in den Studien keine gemacht, weshalb der Vergleich mit den hier ermittelten Werten entfällt (Soler et al. 2014b; Soler et al. 2014a; Evangelista-Vargas et al. 2017; Buendia et al. 2002). Plasmotropfen wiesen in der vorliegenden Arbeit im Mittel $31 \pm 15,11 \%$ der Spermien auf. In Folge der Spermagewinnung aus den Nebenhoden

war ein derart hoher Anteil an Spermien mit Plasmotropfen zu erwarten. Spermien, die aus dem Nebenhoden gewonnen wurden, konnten die Nebenhodenpassage und damit die finale Reifung nicht abschließen. Unter anderem wandern bei der Reifung Zytoplasmotropfen vom proximalen Mittelstück nach distal in Richtung Schwanz und schnüren sich ab (Hoffmann 2003a; Cooper 2011).

Die Akrosomenintegrität der Samenzellen betrug $93,60 \pm 6,04$ % vor und $90,20 \pm 8,40$ % nach Kryokonservierung. Damit lagen die Werte vor und nach Kryokonservierung in der Spannbreite der Literaturergebnisse (Morton et al. 2010b; Kershaw-Young und Maxwell 2011; Santiani et al. 2016). In Studien hatten vor Kryokonservierung $76,60 \pm 1,08$ % (Kershaw-Young und Maxwell 2011) bis $95,03 \pm 6,39$ % (Santiani et al. 2016) der frisch gewonnen epididymalen Alpakaspermien ein intaktes Akrosom. Direkt nach Kryokonservierung waren es $81,30 \pm 2,00$ % bis $91,10 \pm 1,40$ % (Morton et al. 2010b). Ein intaktes Akrosom ist die Voraussetzung für physiologisch ablaufende Kapazitation und Akrosomenreaktion, weshalb einige Studien die Akrosomenintegrität erfassten ohne andere Pathomorphologien zu berücksichtigen (Kershaw-Young und Maxwell 2011; Morton et al. 2010b).

5.3.3 Ergebnisse der Computer assisted sperm analysis (CASA)

Die in der vorliegenden Arbeit initial gemessene Dichte der Proben betrug durchschnittlich $108,80 \pm 83,28$ Mio./ ml und überstieg die in der Literatur vorliegenden Werte von Nebenhodensperma pro Milliliter (Perez et al. 2014; Santiani et al. 2016; Gómez-Quispe et al. 2016a). Tierindividuelle Schwankungen äußerten sich in der großen Spannbreite der Spermienzahl, die von 12,30 Mio./ ml bis maximal 475,90 Mio./ ml reichte.

Die aus den gemessenen Werten berechnete Spermienanzahl pro Tier betrug durchschnittlich $112,58 \pm 139,46$ Mio. Spermien und lag damit im Schwankungsbereich der in der Literatur genannten Werte von Morton et al. (2010b; 2007).

Hengste, von denen Proben in die vorliegende spermatologische Untersuchung eingingen ($n = 29$), waren durchschnittlich über 3 Jahre ($40,56 \pm 15,60$ Monate) alt. 38 % der Hengste, deren Proben untersucht wurden, waren 24 Monate alt.

Santiani et al. (2016) erzielten eine durchschnittliche Konzentration von $97,38 \pm 76,49$ Mio./ ml durch Zerkleinern der Nebenhoden in Tris-Verdünner. Zur weiteren Untersuchung diverser Parameter wurden allerdings nur Proben mit einer Dichte von mindestens 30 Mio. Spermien pro ml eingesetzt.

Abweichend von der hier angewandten Methode gewannen Perez et al. (2014) Nebenhodensperma aus den Samenleitern zweier Alpakahengste mit nachgewiesener Fertilität. Die Probensammlung erfolgte über 12 Wochen zweimal wöchentlich. Die durchschnittliche Probendichte betrug $15,90 \pm 6,80 \times 10^4$ / ml bei Hengst 1 und $9,80 \pm 4,00 \times 10^4$ / ml bei Hengst 2.

Gómez-Quispe et al. (2016a) gewannen Nebhodensperma aus den Samenleitern dreier Alpakahengste. Es wurden nur Probanden eingesetzt, deren Sperma über 50 % Motilität aufwies. Das über acht Monate, dreimal pro Woche gewonnene Material, wurde gemischt und analysiert. Aus den Daten ermittelten die Autoren eine durchschnittliche Dichte von 19,60 Mio./ ml.

Bei den Studien an Sperma aus dem Samenleiter erfolgten keine Angabe über das Alter der Probanden (Gómez-Quispe et al. 2016a; Perez et al. 2014). Die geringe Probandenanzahl und die Vorselektion der Probanden bei Perez et al. (2014) und Gómez-Quispe et al. (2016a) erklären eine einheitlichere Qualität der Proben und damit eine geringere Spannbreite der Dichtewerte als in vorliegender Arbeit. Die Gewinnungsmethode scheint für die wesentlich geringeren Dichtewerte bei Proben aus dem Vas deferens verantwortlich zu sein.

Morton et al. (2010b) zerkleinerten die Nebenhoden und ließen die Spermien in Puffer ausschwimmen. Die gewonnenen Spermien wurden gewaschen, resuspendiert und die Proben beider Nebenhoden eines Tieres gemischt. Im ersten Experiment der Studie wurden durchschnittlich $75,30 \pm 22,50$ Mio. Spermien pro Hengst gewonnen (Min. 8,70 Mio.; Max. 190 Mio.). Im zweiten Experiment waren es $143,10 \pm 43,50$ Mio. Spermien pro Hengst (Min. 49,50 Mio.; Max. 295,50 Mio.). Das Alter der Tiere aus Experiment 1 ($n = 11$) war im Mittel $33,90 \pm 3,90$ Monate und aus Experiment 2 ($n = 10$) $32,50 \pm 1,80$ Monate. Mit dem gleichen Vorgehen erzielten Morton et al. (2007) eine durchschnittliche Dichte von $123,50 \pm 22,20$ Mio. Spermien pro Hengst (Min. 36,90 Mio.; Max. 265,50 Mio.) in Experiment 1, wobei die Hengste durchschnittlich ein Alter von $32,90 \pm 5,80$ Monaten aufwiesen ($n = 10$). In Experiment 2 wurden

122,30 ± 9,60 Mio. Spermien je Tier gewonnen (Min. 12,30 Mio.; Max. 261,00 Mio.), wobei die Hengste im Durchschnitt 22,50 ± 0,90 Monate alt waren (n = 10).

Bei Morton et al. (2010b) waren die Probanden im Durchschnitt ca. ein halbes Jahr jünger als in der vorliegenden Arbeit, die Dichtewerte der Proben aber sowohl höher (Experiment 2) als auch niedriger (Experiment 1).

Die durchschnittliche Dichte der Proben bei Morton et al. (2007) war in beiden Experimenten um ca. 10 Mio. Spermien pro Hengst höher als in vorliegender Arbeit. Trotz des Altersunterschiedes der Probanden der beiden Experimente von ca. 10 Monaten, differierten die Dichtewerte der einzelnen Experimente nur um ca. 1 Mio. (Morton et al. 2007). Daher lässt sich kein direkter Zusammenhang zwischen Proben-dichte und dem Alter der Tiere erkennen. Dagegen scheint die einheitlichere Altersverteilung innerhalb der Probandengruppen je Experiment bei Morton et al. (2010b; 2007) die geringere Spannbreite der Dichte im Vergleich zu vorliegender Untersuchung zu erklären.

Mamani-Mango et al. (2019) erzielten im Vergleich zu Morton et al. (2010b; 2007) und vorliegender Arbeit deutlich geringere Spermienkonzentrationen. Die Autoren gewannen durch Zerkleinern, Quetschen und Waschen der Nebenhoden durchschnittlich 51,70 ± 34,70 Mio. Spermien je Hengst. Dagegen konnten durch den Ductus deferens und Nebenhodenschwanz im Durchschnitt 25,20 ± 17,60 Mio. Spermien pro Tier retrograd erspült werden. Folglich war die Ausbeute an Spermien bei der retrograden Spülung signifikant niedriger (p = 0,005). Die geringe Spermienausbeute könnte in Zusammenhang mit der niedrigen durchschnittlichen Hodenlänge der Probanden bei Mamani-Mango et al. (2019) stehen. In der Literatur sind Belege für die Korrelation der Hodenlänge mit der Spermaproduktion beim Alpaka beschrieben (Abraham et al. 2016).

Sonstige Literaturquellen erwähnten in der Regel die Dichte, auf die das epididymale Alpakasperma zur weiteren Untersuchung verdünnt wurde (Durand et al. 2016; Kershaw-Young und Maxwell 2011), oder es wurden keine Angaben zur Dichte gemacht (Choez et al. 2017).

Die in dieser Arbeit zum ersten Mal eingesetzte Methode der Spermagewinnung durch Anschneiden der Nebenhoden führte zu befriedigenden Ergebnissen bezüglich der Menge und Dichte des gewonnenen Samens.

Die in dieser Arbeit gemessene Motilität lag mit durchschnittlich $53,30 \pm 18,17$ % vor und $10,30 \pm 9,04$ % nach Kryokonservierung im Schwankungsbereich vorliegender Literatur zu epididymalem Sperma (Choez et al. 2017; Gomez-Quispe et al. 2016b; Gómez-Quispe et al. 2016a; Durand et al. 2016; Kershaw-Young und Maxwell 2011; Morton et al. 2007; Morton et al. 2010b; Morton et al. 2010a; Meza et al. 2018; Mamani-Mango et al. 2019; Santiani et al. 2016; Terreros et al. 2015; Vasquéz et al. 2012). Die Spannbreite der Motilität in vorliegender Arbeit betrug $72,70$ % vor und $33,70$ % nach Kryokonservierung. Triladyl®-konservierte Proben erreichten Motilitätswerte von $52,25 \pm 18,43$ % vor und $10,70 \pm 9,38$ % nach Kryokonservierung. Die Motilität der Triladyl®-konservierten Proben lag unter dem Schwankungsbereich der Literatur (Perez et al. 2014; Durand et al. 2016).

In der Literatur fanden sich für frisch gewonnenes epididymales Sperma Motilitätswerte von $30,04 \pm 16,03$ % (Santiani et al. 2016) bis zu $80,60 \pm 4,40$ % (Gómez-Quispe et al. 2016a). Aufgetaute Proben wiesen im Mittel $3,30 \pm 3,37$ % (Choez et al. 2017) bis zu $42,40 \pm 3,50$ % (Gómez-Quispe et al. 2016a) motile Spermien auf.

Santiani et al. (2016) sahen die Ursache der niedrigen Motilitätswerte ihrer Untersuchung in langen Transportzeiten zum Labor von bis zu 20 Stunden. Die Nebenhoden befanden sich dabei in 0,90%iger Kochsalzlösung und wurden gekühlt. Zur weiteren Analyse gingen ausschließlich Proben, die mindestens 36 % Motilität aufwiesen und zudem weitere Anforderungen erfüllten.

Auffallend hohe Motilitätswerte, die die Ergebnisse anderer Studien überstiegen, erreichten Gómez-Quispe et al. (2016a). Die Autoren wählten drei Hengste als Probanden, die in einer initialen Spermauntersuchung Motilitätswerte über 50 % aufwiesen. Die aus den Samenleitern der Tiere gewonnenen Proben wurden vor den Untersuchungen gemischt. Somit können die erzielten Werte der Studie in der Vorselektion der Probanden und der Probenmischung begründet sein.

Die Proben mit Triladyl® lagen vor Kryokonservierung um ca. 4 % unter den von Perez et al. (2014) ermittelten Werten (Hengst 1 $56,8 \pm 9,80$ %; Hengst 2 $56,20 \pm 7,20$ %). Die Probengewinnung erfolgte bei Perez et al. (2014) aus dem Vas

deferens. Die Gewinnungsmethode könnte somit ein Faktor sein, der sich auf die Motilität der Proben auswirkte. Da die Proben bei Perez et al. (2014) von nur zwei Hengsten gewonnen wurden, sind die Proben homogener als in vorliegender Untersuchung. Die wesentlich geringere Spannbreite der Werte bedingt wiederum eine höhere durchschnittliche Motilität der Proben bei Perez et al. (2014).

Die bisher einzige computer-gestützte Motilitätsanalyse führten Meza et al. (2018) an frischen Proben aus dem Vas deferens von fünf Zuchthengsten im Alter von 5 Jahren durch. Die Gesamtmotilität betrug im Durchschnitt $41,70 \pm 8,20$ % (Min. 30,40 %; Max. 50,90 %) und die Vorwärtsbeweglichkeit $3,29 \pm 0,80$ % (Min. 2,40 %; Max. 4,20 %). Die Proben wurden in zwei Intervallen mit einer Pause von sieben Tagen gewonnen. In den Probenzeiträumen wurden alle drei Tage fünf Proben von den Hengsten genommen. Bei allen Probanden wies die erste Probe die niedrigste Motilität auf. In beiden Probengewinnungsperioden stiegen die Motilitätswerte initial an und fielen dann ab. Dabei lagen die abgefallenen Werte deutlich über den initialen Werten des gleichen Untersuchungszeitraums. Die Unterschiede zwischen den Probenserien waren signifikant. Alle kinetischen Parameter wiesen Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren auf. Die Autoren erklärten, dass sich bessere Ergebnisse vorangegangener Studien mit gleicher Gewinnungsmethode durch die subjektive Motilitätsschätzung ergaben. Bei subjektiver Schätzung konnten auch Zellen motil eingestuft worden sein, die lediglich Bewegung des Schwanzes aufwiesen oder die passiv bewegt wurden. Im Gegensatz dazu ignorieren CASA-Systeme Zellen ohne Eigenbewegung (Meza et al. 2018).

Die Ursachen für die über 10 % bessere Durchschnittsmotilität der Proben in vorliegender Arbeit sind nicht gänzlich zu klären. Da die initialen Proben bei Meza et al. (2018) stets die schlechtesten Werte aufwiesen, müssten die Werte der vorliegenden Untersuchung im Vergleich schlechter sein. Es muss beachtet werden, dass in der vorliegenden Arbeit ein anderes CASA-System mit anderen Einstellungen als bei Meza et al. (2018) eingesetzt wurde. Da es für die bestehenden CASA-Systeme keinen allgemein gültigen Standard gibt, ist ein Vergleich der Messwerte unterschiedlicher Systeme nur bedingt möglich (Verstegen et al. 2002).

Nach Kryokonservierung betrug die Differenz der hier erzielten Motilitätswerte über 20 % zu den Angaben bei Durand et al. (2016) ($33,18 \pm 7,50$ %). Im Gegensatz zur vorliegenden Studie setzten Durand et al. (2016) nur zwei Probanden zur Spermagewinnung aus dem Samenleiter ein. Damit wiesen die Proben eine wesentlich einheitlichere Qualität auf, als dies in der vorliegenden Untersuchung mit Spermien von 29 Probanden gegeben war. Zudem führten Durand et al. (2016) eine Vorselektion der Proben durch. Es gingen ausschließlich Proben in die Studie ein, die mindestens 60 % Motilität und eine Konzentration von über 9×10^4 Spermien/ ml aufwiesen. So schienen sich neben der Gewinnungsmethode und Homogenität der Proben v. a. die Vorselektion positiv auf die Spermaqualität nach Kryokonservierung auszuwirken.

Vergleichbare Beobachtungen zur vorliegenden Arbeit bezüglich der großen Spannweite der Motilität von epididymalem Sperma wurden bereits bei Hund (Hori et al. 2009) und Pferd (Neuhauser et al. 2018) gemacht.

5.3.4 Histologie

77 % der histologisch untersuchten Nebenhoden wiesen keine Spermien auf. Die Präparate stammten von drei Tieren im Alter von 2 Jahren und einem achtjährigen Hengst. Bei den zweijährigen Probanden dieser Gruppe scheint die Azoospermie darin begründet zu sein, dass die Spermaproduktion noch nicht angelaufen ist. Welche Faktoren mit der Azoospermie des Tieres im Alter von 8 Jahren zusammenhängen, konnte aufgrund der erhobenen Daten nicht ermittelt werden.

Der Anteil histologisch untersuchter Nebenhoden mit Spermien betrug 23 %. Diese Nebenhoden stammten von Tieren im Alter von 2 und 4 Jahren. Bei den zweijährigen Hengsten, in deren Nebenhoden Spermien histologisch nachgewiesen wurden, hat die Spermarche (Beginn der Spermaproduktion) eingesetzt, so dass hier nicht die Ursache der Nichtgewinnung zu suchen ist. Die Anzahl gebildeter Spermien steigt während der Entwicklung der Tiere von der Geschlechts- zur Zuchtreife an. Daher könnten bei den zweijährigen Probanden dieser Gruppe nicht genügend Spermien vorhanden gewesen sein, um sie aus den Nebenhoden gewinnen zu können. Vorliegende Literatur spricht beim Alpaka von einer möglichen Spermarche im Alter von 10 bis 12 Monaten (Smith et al. 1994), von einer Zuchtreife hingegen erst im Alter von ca. 30 bis 36 Monaten (Knauf et al. 2008). Daneben wirken sich Genetik, alimentäre

Faktoren, Klima und zu welcher Jahreszeit das Tier geboren wurde auf den Zeitpunkt des Pubertätseintritts beim Alpakahengst aus (Tibary und Vaughan 2006).

Obstruktive Azoospermie oder Kryptozoospermie könnten die Ursache dafür sein, dass bei dem vierjährigen Hengst Spermien nicht gewonnen, aber in den histologischen Präparaten nachgewiesen wurden. Kryptozoospermie liegt vor, wenn die Spermienanzahl ≤ 1 Mio. pro ml Ejakulat liegt (Karabulut et al. 2018). Dies kann durch nicht vollständige Obstruktionen oder Schädigungen des Keimepithels hervorgerufen werden. Azoospermie ist definiert durch das Nichtvorhandensein von Spermien im Pellet einer zentrifugierten Probe (Aziz 2013). Eine Obstruktion kann an jeglicher Lokalisation von Rete testis bis Ductus ejaculatorius auftreten (Wosnitzer und Goldstein 2014). Hervorgerufen werden Obstruktionen durch Entzündungen oder kongenitale Anomalien (Baker und Sabanegh 2013). Hodenbiopsie, klinische Untersuchung, Kontrolle des Hormonstatus (Krausz et al. 2018; Schlegel 2004) und genetische Analysen (Krausz et al. 2018) werden in der Humanmedizin eingesetzt, um die Ursachen der Azoospermie herauszufinden. Bei einer Obstruktion des Ductus epididymidis auf Höhe des Nebenhodenschwanzes würden sich proximal der Obstruktion Spermien im Nebenhodengang befinden. Beide Ursachen konnten in vorliegendem Fall nicht ausgeschlossen werden.

Zum histologischen Aufbau der Nebenhoden gibt es Studien bei Lama (Delhon und Lawzewitsch 1994), Kamel (Mahmud et al. 2015) und Dromedar (Ibrahim und Singh 2014; Tingari 1989). Beim Alpaka existieren immunhistochemische Untersuchungen des Nebenhodens (Parillo et al. 2009; Liguori et al. 2013). Histologische Auswertungen des Vorhandenseins bzw. Nichtvorhandenseins von Spermien in Nebenhoden sind bisher nicht beschrieben. Ein Vergleich der Literatur mit der in vorliegender Arbeit durchgeführten Histologie entfällt daher.

5.3.5 Auswirkungen von Kryokonservierung, Verdünner und Hodenvolumen

Motilität und Vitalität waren in der vorliegenden Arbeit nach Kryokonservierung deutlich reduziert. Der Anteil anomaler Spermien stieg signifikant nach Kryokonservierung an.

Diese Parameter sind somit ein Indikator für die Schädigung der Spermien durch die Gefrier- und Auftauvorgänge.

Bezüglich der Empfindlichkeit Nebenhodenspermas gegenüber Schädigung durch Kryokonservierung gehen die Aussagen in der Literatur auseinander. Canines epididymales Sperma scheint empfindlicher als ejakulierter Samen (Hewitt et al. 2001; Prapaiwan et al. 2016). Im Vergleich von epididymalem Sperma mit Ejakulat konnten Woelders et al. (2012) bei Schafbocksperma keine Qualitätsunterschiede nach Kryokonservierung feststellen. Hingegen zeigten sich bei Manchego-Schafböcken (Garcia-Alvarez et al. 2009) und Iberiensteinbock (Pradiee et al. 2014) epididymale Spermien kryoresistenter als Spermien, die durch Elektroejakulation gewonnen wurden. Zum direkten Vergleich epididymalen und ejakulierten Spermas liegen beim Alpaka bisher nur Untersuchungen zur Vitalitätsbestimmung vor (Pacheco-Curie et al. 2014). Im Vergleich zu ejakuliertem Sperma waren die Vitalitätswerte von epididymalem Sperma im HOS-Test geringer und in Eosin-gefärbten Präparaten gleich.

Zwischen den verwendeten Verdünnern gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Qualitätsminderung des Samens durch die Kryokonservierung. Aufgrund signifikant reduzierter Vitalitäts- und Motilitätswerte nach Kryokonservierung erschienen die eingesetzten Verdüner ungeeignet zur Kryokonservierung epididymalen Alpakaspermias, obwohl sie in anderen Untersuchungen benutzt wurden (Durand et al. 2016).

Die Verdüner Andromed® und Triladyl® erzielten in der Literatur bei Nebenhodensperma anderer Tierarten bessere Motilitäts- und Vitalitätsraten. Epididymales Bullensperma hatte nach dem Auftauen mit Andromed®-zusatz $42,10 \pm 15,60$ % Motilität und $51,60 \pm 12,00$ % Vitalität. Die Proben mit Triladyl® zeigten $58,10 \pm 10,90$ % Motilität und $65,40 \pm 9,50$ % Vitalität (Fleisch et al. 2017). Die Gesamtmotilität beim afrikanischen Büffel betrug 5 Minuten nach dem Auftauen bei den Proben mit Andromed® $44,1 \pm 21,94$ % und bei den Proben mit Triladyl® $56,40 \pm 16,15$ % (Herold et al. 2004). Katernebenhodensperma mit Triladyl® hatte nach Kryokonservierung $51,80 \pm 3,50$ % Gesamtmotilität und $44,20 \pm 3,00$ % Vitalität. Katernebenhodensperma mit Andromed®-zusatz hatte nach Kryokonservierung $25,90 \pm 5,00$ % Gesamtmotilität und $30,40 \pm 3,00$ % Vitalität (Jimenez et al. 2013).

Bei Sperma, das aus dem Nebenhoden gewonnen wurde, scheiden die Zusammensetzung der Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen und pH-Wert des Nebenhodengewebes als Einflussfaktoren auf Motilität und Vitalität aus. Der Grund für die schlechtere Motilität und Vitalität von Alpakasperma im speziesübergreifenden Vergleich scheint somit im Aufbau und Metabolismus der Spermien begründet zu sein. Eine intakte Struktur von Mittelstück und Schwanz der Spermien sehen humanmedizinische Studien als Voraussetzung für Motilität an (Zhao et al. 2018). Zur Struktur gehören Außenfibrillen, Faserscheide und Axonem (Piasecka et al. 2003). Darüber hinaus scheint sich die Struktur der Spermien auf die Geschwindigkeit auszuwirken. Beim Menschen korreliert die Länge der Außenfibrillen mit der Länge von Mittelstück und Schwanz (Zhao et al. 2018). Die Länge des Mittelstücks beeinflusst wiederum die Geschwindigkeit der Spermienbewegung (Firman und Simmons 2010).

Die artübergreifende Studie von Tourmente et al. (2011) erfasste verschiedene morphologische Spermienparameter von 226 Spezies, darunter Hausrind, Hauskatze und Lama. Dabei korrelierte Spermienlänge und Geschwindigkeit der Spermienbewegung (Tourmente et al. 2011). Folglich könnte die größere Länge der Spermien von Kater, Bulle und Büffel eine Ursache für die höhere Motilität im Vergleich zum Alpaka sein.

Die für die Fortbewegung der Spermien notwendige Energie liefern die Mitochondrien. In den Mitochondrien finden diverse Stoffwechselwege statt, wodurch Spermien verschiedene Substrate zur Energiegewinnung nutzen können. Die in Mitochondrien hauptsächlich ablaufenden Stoffwechselwege wiesen speziesspezifische Unterschiede auf (Piomboni et al. 2012). Dies erklärt möglicherweise die unterschiedliche Wirkung derselben Verdünner bei verschiedenen Tierarten. Die Varianz des Stoffwechsels der Mitochondrien könnte somit ein Grund für die niedrigeren Motilitätsraten von Andromed®- und Triladyl®-konservierten Spermien beim Alpaka im Vergleich zu Bulle und Kater sein.

Darüber hinaus spielen laut Amaral et al. (2013) Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Apoptose und der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Schäden durch übermäßige ROS-Produktion induzierten Apoptose, was sich initial im Absinken von Motilität und Vitalität äußerte (Aitken et al. 2012). Diese Fakten lassen mutmaßen,

dass bei Alpakasperma eine stärkere Produktion von ROS und/ oder eine höhere Empfindlichkeit gegenüber diesen Metaboliten vorliegen als bei Samen von Bulle und Kater.

Die durchschnittliche Hodenlänge der Hengste, deren Sperma analysiert wurde, betrug in der vorliegenden Arbeit $5,40 \pm 0,94$ cm (Min. 3,70 cm; Max. 7,80 cm). Die Hoden wiesen eine durchschnittliche Breite von $3,70 \pm 0,66$ cm und Höhe von $3,30 \pm 0,61$ cm auf. Das Hodenvolumen hatte keine Auswirkungen auf Motilität, Plasmamembranintegrität, Vitalität und Pathomorphologie. 86,20 % der Hengste wiesen Unterschiede im Volumen von linkem und rechtem Hoden auf. Dies hatte keinen signifikanten Effekt auf einen, der in der vorliegenden Arbeit erhobenen spermatologischen Parameter.

Beim Bullen wird in Zuchttauglichkeitsuntersuchungen der Skrotalumfang ermittelt, da eine Korrelation dieses Parameters mit der Hodengröße (Abraham et al. 2016) und der Spermaproduktion (Brito et al. 2004) belegt ist. Aufgrund der anatomischen Lage und geringen Größe der Hoden beim Alpaka ist dieser Parameter in vivo schwierig zu erfassen. Alternativ bietet sich laut Abraham et al. (2016) beim Alpaka die Ermittlung der Hodenlänge an. Dieser Parameter gibt, idealerweise in Kombination mit Body Condition Score und Alter, Aufschluss über die Spermaproduktion (Abraham et al. 2016).

Interessanterweise war die durchschnittliche Hodenlänge in der vorliegenden Arbeit größer als bei Mamani-Mango et al. (2019). Mamani-Mango et al. (2019) erfassten Gewicht, Länge und Umfang von Alpakahoden nach Kastration vor der Gewinnung von Nebenhodensperma. Die Parameter wurden für die eingesetzten Gewinnungsmethoden (retrograde Spülung/ Zerkleinern der Nebenhoden) getrennt erfasst. Die durchschnittliche Hodenlänge betrug $35,70 \pm 4,60$ mm bei den Nebenhoden, die zerkleinert wurden, und $35,10 \pm 4,80$ mm bei den Nebenhoden, die gespült wurden.

Die peruanische Studie legte das Mindestalter der Probanden auf über 3 Jahre fest. Weitere Angaben zum Alter der Hengste wurden keine gemacht. In der vorliegenden Untersuchung betrug der Median des Alters der Hengste, von denen Sperma gewonnen werden konnte, 3 Jahre.

In der Literatur wurde bereits erwähnt, dass die Hoden von Alpakas in Peru kleiner waren als von australischen Alpakas, was vermutlich auf einen schlechteren Ernährungszustand zurückzuführen war (Abraham et al. 2016). Entsprechende Unterschiede bezüglich Haltungsbedingungen und Ernährungszustand könnten folglich die Differenzen der Hodenlängen von Hengsten ähnlichen Alters bei Mamani-Mango et al. (2019) im Vergleich zu vorliegender Arbeit erklären.

Entgegen der Ergebnisse vorliegender Arbeit zeigten die Hodenparameter bei Mamani-Mango et al. (2019) keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen. Daraus schlossen die Autoren, dass sie keinerlei signifikante Auswirkungen auf die Gewinnungsmethode hatten.

Hingegen existieren in der Literatur und analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit Beschreibungen asymmetrischer Hoden bei Pampahirsch, Maus und Bison (Ungerfeld et al. 2017). Als Ursache für eine derartige, immer wieder in unterschiedlichen Ausprägungen auftretende Asymmetrie bilateral angelegter Strukturen vermuten Tomkins und Kotiaho (2002) genetischen und umgebungsbedingten Stress.

Zur Klärung der Fragestellung inwiefern und wie häufig Asymmetrien der Hoden beim Alpaka auftreten, sind weitere Studien notwendig.

Im Vergleich zu Mamani-Mango et al. (2019) wiesen Alpakas über 3 Jahre in einer schwedischen Studie größere durchschnittliche Hodenlängen auf (Abraham et al. 2016). Alle Hoden, die an 10 Hengsten über 3 Jahren in vivo vermessen wurden, waren über 4 cm lang. Bei Messungen der Hodenlänge am isolierten Organ (nach Kastration oder post mortem) betrug die Hodenlänge bei Tieren über 36 Monate einmal unter 3 cm und bei den restlichen sieben Hengsten über 4 cm. Damit zeigten die Messergebnisse von Abraham et al. (2016) eine ähnliche Tendenz wie die Daten der vorliegenden Arbeit. Da Abraham et al. (2016) keine genauen Längenangaben machten, kann kein detaillierter Vergleich der Ergebnisse erfolgen. Abraham et al. (2016) zogen das Fazit, dass beim Alpaka sicher mit Spermienproduktion ab einer Hodenlänge von $\geq 3,80$ cm gerechnet werden kann. Dementgegen konnte in der vorliegenden Arbeit von einem Hengst mit einer Hodenlänge von 3,70 cm Sperma gewonnen werden. Zudem war die Mehrzahl der Hoden der Tiere, von denen kein Sperma

gewonnen wurde, länger als 3,80 cm. Lediglich drei Hoden dieser Gruppe unterschritten den Wert von 3,80 cm Länge. Die Angaben von Abraham et al. (2016) zur Bedeutung der Hodenlänge können folglich nicht unwidersprochen bleiben.

Abraham et al. (2016) stellten fest, dass die Hodengröße als Indikator der Spermaproduktion besser geeignet ist als das Alter eines Alpakahengstes. Aufgrund der in vorliegender Arbeit erhobenen Werte, ist allerdings eine Schätzung der Spermaproduktion allein aufgrund der Hodenlänge als kritisch zu betrachten. Eine Kombination mehrerer Einflussfaktoren scheint sinnvoll. Dazu schlugen Abraham et al. (2016) idealerweise die Berücksichtigung von Alter, Hodenlänge und Body Condition Score vor. Interessanterweise konnte ein positiver Zusammenhang zwischen BCS und Hodengröße nachgewiesen werden (Abraham et al. 2016). Starke Varianzen der Hodengrößen legen die Vermutung nahe, dass sich noch andere Faktoren auf die Hodengröße auswirken (Abraham et al. 2016). Diese Faktoren sind oft genetische Defekte (Kova et al. 1999), Allgemeinerkrankungen, Hormonstörungen sowie Haltungs- und Fütterungsfehler (Gauly 2011).

In humanmedizinischen Studien war die Masse der Hoden assoziiert mit der Anzahl der Sertolizellen und der spermatogenetischen Aktivität der Hoden. Dennoch konnte keine Korrelation von Hodenvolumen und den Parametern epididymalen Spermast festgestellt werden (Pintus et al. 2015). Dies deckt sich mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen.

Stelletta et al. (2011) stellten bezüglich der Anzahl an Spermien und Sertolizellen keine Unterschiede zwischen den linken und rechten Hoden bei Alpakahengsten fest. Dagegen wurden bei Pampashirschen bezüglich der spermatogenetischen Funktionalität Unterschiede zwischen den linken und rechten Hoden festgestellt (Ungerfeld et al. 2017).

5.4 Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass es möglich ist beim Alpaka Sperma in zufriedenstellender Dichte und Menge durch Anschneiden der Nebenhoden und anschließendes Abspülen mit Verdünner zu gewinnen.

Da beide im Vergleich getesteten Verdünner keine unterschiedlichen Ergebnisse lieferten, sind beide gleich geeignet. Einschränkend muss festgestellt werden, dass die beiden getesteten Protokolle zu sehr heterogenen und insgesamt unbefriedigenden Auftauergebnissen führen. Insbesondere im Vergleich mit der Literatur, konnten teilweise deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt werden. Dies liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit daran, dass die Samenzellen erstmals an einer heterogenen Population von Tieren gewonnen wurden und nicht nur aus wenigen Nebenhoden vorselektierter Probanden.

6 Zusammenfassung

Die Kryokonservierung epididymalen Spermas ist die Methode der Wahl, um genetisches Material frisch verstorbenen, wertvoller Zuchthengste zu sichern. Als Modell wurden in der vorliegenden Arbeit Nebenhoden aus Kastrationen eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es, Nebenhodensperma zu gewinnen, zu gefrieren und die Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Spermien im Vergleich zweier Verdüner zu untersuchen.

Insgesamt wurden 40 Alpakahengste der Rasse Huacaya kastriert, welche zwischen 2 und 8 Jahren alt waren. Zwei dieser Hengste waren einseitig kryptorchid, weshalb insgesamt 78 Nebenhoden in die Untersuchung gingen.

Nach der Kastration wurden von Hoden mitsamt Nebenhoden im Processus vaginalis Länge, Breite, Höhe und Umfang in cm erfasst. Die Nebenhoden wurden anschließend frei präpariert und angeschnitten. Das an den Schnittflächen austretende Sperma wurde gesammelt. Durch Aufträufeln von Verdünner wurden weitere Spermien aus den Anschnittflächen ausgeschwemmt. Das eingesetzte Verdünnervolumen betrug 0,40 ml. Bei den linken Nebenhoden wurde ein Verdünner ohne tierische Fremdproteine (Andromed®, Minitüb, Tiefenbach) und bei den rechten Nebenhoden ein Verdünner mit Zugabe von Eigelb (Triladyl®, Minitüb, Tiefenbach) eingesetzt.

Bei 58 Nebenhoden war die Spermagewinnung erfolgreich. Aus 13 Nebenhoden (einer von einem Kryptorchiden) konnte kein Sperma gewonnen werden. Diese Nebenhoden wurden histologisch aufbereitet. Die daraus angefertigten Präparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Das Nebhodensperma wurde direkt im Anschluss an die Gewinnung und nach dem Auftauen spermatologisch untersucht. Der Anteil lebender und toter Spermien wurde anhand der Supravitalfärbung mit Eosin-G ermittelt. Der hypoosmotische Schwelltest (HOS-Test) gab Aufschluss über den Prozentsatz von Spermien mit intakter Plasmamembran. Die vorliegende Arbeit verglich erstmals die Ergebnisse von Eosin-G-Färbung und HOS-Test von Alpakasperma einzelner Nebenhoden. Zur Beurteilung der

Pathomorphologie wurde die Spermac®-Färbung eingesetzt. Eine Beschreibung einzelner Pathomorphologien bei Nebenhodensperma vom Alpaka erfolgte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal.

Motilität und Dichte wurden mithilfe der computer-assistierten Spermienanalyse bestimmt.

Folgende relevanten Ergebnisse wurden erzielt:

- Das durchschnittliche Hodenvolumen betrug $36,10 \pm 18,90 \text{ cm}^3$ bei den Probanden, von denen Sperma in die Untersuchung einging, und $18,80 \pm 22,10 \text{ cm}^3$ bei den Hengsten, aus deren Nebenhoden kein Sperma gewonnen werden konnte.
- Das Hodenvolumen hatte keine signifikanten Auswirkungen auf Motilität, Plasmamembranintegrität, Vitalität und Pathomorphologie der Spermien.
- Die Erfolgsquote der Spermagewinnung betrug 83 %.
- Es erfolgte der Nachweis von Spermien in 23 % der Präparate der Nebenhoden, aus denen kein Sperma gewonnen werden konnte.
- Die Menge und Qualität der gewonnenen Spermien variierten stark zwischen den einzelnen Hengsten.
- Einen statistisch hoch signifikanten Effekt hatte die Kryokonservierung auf die Motilität und Vitalität ($p < 0,0001$). Auf den Anteil pathologischer Spermien ($p = 0,0048$) und den Akrosomenstatus hatte die Kryokonservierung eine signifikante Wirkung ($p = 0,02$).
- Vor Kryokonservierung unterschieden sich die Ergebnisse von Eosin-Färbung und HOS-Test statistisch signifikant ($p < 0,0001$). Daher empfiehlt es sich beide Methoden in Kombination zur Vitalitätsbestimmung einzusetzen.
- Triladyl® erzielte nach Kryokonservierung bessere Ergebnisse bzgl. der Vitalität als Andromed®. Der Anteil vitaler Spermien der Triladyl®-behandelten Proben

war in der Eosin-Färbung 8,36 % und im HOS-Test 4,35 % höher als bei den Proben mit Andromed®. Der Prozentsatz anomaler und motiler Spermien differierte nach Kryokonservierung weniger als 1 %.

- Der Verdünner wirkte sich nach Kryokonservierung statistisch signifikant auf die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung aus ($p = 0,069$).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es möglich ist Sperma durch Anschneiden der Nebenhoden zu gewinnen. Es erfolgte erstmals eine Beschreibung einzelner Pathomorphologien und ein Vergleich von Eosin-Färbung (Eosin-G) und HOS-Test von Alpakasperma einzelner Nebenhoden. Durch die Kryokonservierung wurden deutliche Veränderungen der Spermien induziert, wobei sich die angewandten Verdünner nicht unterschieden. Die beiden eingesetzten Protokolle führten zu sehr heterogenen Auftauergebnissen, die insgesamt schlechter waren als in vergleichbarer Literatur. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die heterogene Probandenpopulation, die nicht vorselektiert war und eine breite Altersspannweite aufwies.

7 Summary

Cryopreservation of epididymal sperm is the method of choice to save genetic material of valuable males that recently died. In the current study epididymides from castrations were used as a model.

The aim of this work was to extract epididymal sperm, to freeze it and to study the effects of cryopreservation on the sperm comparing two semen extenders.

Altogether 40 male alpacas of the breed Huacaya were castrated. Males were between 2 and 8 years old. Two of these males have been unilateral cryptorchid, so a total of 78 epididymides were obtained.

Testicles and epididymides in the vaginal process were measured with a tape, to record the length, width, height and circumference in cm. Subsequently the epididymides were dissected and cut on the surface. Sperm leaked out of the cut surface and was recovered. More sperm were washed out of the epididymides by dropping 0.40 ml of extender on them.

On the left epididymides an extender without animal proteins (Andromed®, Minitüb, Tiefenbach) and on the right epididymides an extender with egg yolk (Triladyl®, Minitüb, Tiefenbach) were used.

The sperm collection was successful in 58 epididymides. It was not possible to gain sperm out of 13 epididymides (one from a cryptorchid). These epididymides were processed for histological evaluation and stained with hematoxylin eosin.

Sperm were evaluated immediately after harvest and after thawing. Supravitalstain with eosin-y was used to determine the amount of vital and dead sperm. The rate of sperm with intact plasmamembrane was detected by hypoosmotic swelling test (HOS-test). For the first time results of eosin-y-stain and HOS-test of single epididymides were evaluated comparatively in this work. Morphological evaluation was performed on Spermac®-stained smears. In the present study individual abnormalities of epididymal sperm from the alpaca were assessed for the first time.

Motility and density were identified with computer-assisted-sperm-analysis.

The following relevant results were achieved:

- The mean testicular volume was $36.10 \pm 18.90 \text{ cm}^3$ in animals, of which semen analysis were performed and $18.80 \pm 22.10 \text{ cm}^3$ in males from whose epididymis sperm could not be obtained.
- The volume of the testicles did not have any significant effects on the motility, vitality, integrity of the plasma membrane and pathomorphology of the sperm.
- The success rate of sperm collection was 83 %.
- Sperm were detected in 23 % of the histological preparations of the epididymides, from which no sperm were obtained.
- There was a large variation between the males concerning the amount and quality of the sperm.
- Cryopreservation had the most obvious impact on the vitality and the motility with a statistical significance ($p < 0.0001$). Cryopreservation had a significant effect on the number of abnormal sperm ($p = 0.0048$) and the acrosomal status ($p = 0.02$).
- Eosin stain and HOS-test had statistical influence on vitality before cryopreservation ($p = 0.069$). Therefore, it is recommended to use both methods combined for determination of vitality.
- Triladyl® achieved better results after cryopreservation in terms of vitality. In comparison to Andromed®-diluted semen the percentage of vital sperm in samples with Triladyl® was 8.36 % higher in the eosin stain and 4.35 % higher in the HOS-test. The percentage of abnormal and motile sperm after cryopreservation differed by less than 1 %.
- The semen extender had a statistically significant effect on the results of the analysis of vitality after cryopreservation ($p = 0.069$).

In conclusion, this work has shown, that it is possible to gain sperm by cutting into epididymides. For the first time sperm abnormalities were evaluated, and the results of eosin-y stain and hypoosmotic swelling test of alpaca sperm of single epididymides were compared. Cryopreservation induced significant changes in the sperm, with no difference between the semen extenders. The two protocols used led to very heterogeneous results after cryopreservation. In total these results were worse than in the literature. The reason for this is probably the heterogeneous subject population that is not preselected and has a wide range of age.

8 Literaturverzeichnis

Abraham, MC; Puhakka, J; Ruete, A; Al-Essawe, EM; Verdier, K de; Morrell, JM; Båge, R (2016)

Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions.

Acta Veterinaria Scandinavica 58, S. 10.

Abraham, MC; Verdier, K de; Bage, R; Morrell, JM (2017)

Semen collection methods in alpacas.

The Veterinary Record 180, S. 613–614.

Adams, GP; Ratto, MH; Collins, CW; Bergfelt, DR (2009)

Artificial insemination in South American camelids and wild equids.

Theriogenology 71, S. 166–175.

Adams, GP; Ratto, MH; Huanca, W; Singh, J (2005)

Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas.

Biology of Reproduction 73, S. 452–457.

Aitken, RJ; Jones, KT; Robertson, SA (2012)

Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health.

Journal of Andrology 33, S. 1096–1106.

Aller, JF; Rebuffi, GE; Cancino, AK; Alberio, RH (2002)

Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos.

Animal Reproduction Science 73, S. 121–127.

Aller, JF; Rebuffi, GE; Cancino, AK; Alberio, RH (2003)

Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*).

Archivos de Zootecnia 52, S. 15–23.

Amann, RP; Hammerstedt, RH (1980)

Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm.

Biology of Reproduction 23, S. 647–656.

Amaral, A; Lourenco, B; Marques, M; Ramalho-Santos, J (2013)

Mitochondria functionality and sperm quality.

Reproduction (Cambridge, England) 146, S. 74.

Aziz, N (2013)

The importance of semen analysis in the context of azoospermia.
Clinics 68, S. 35–38.

Baer, L von; Hellemann, C (1999)

Cryopreservation of Llama (*Lama glama*) Semen.
Reproduction in Domestic Animals 34, S. 95–96.

Baker, K; Sabanegh, E (2013)

Obstructive azoospermia: reconstructive techniques and results.
Clinics 68, S. 61–73.

Blash, S; Melican, D; Gavin, W (2000)

Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats.
Theriogenology 54, S. 899–905.

Bogle, OA; Ratto, MH; Adams, GP (2011)

Evidence for the conservation of biological activity of ovulation-inducing factor in seminal plasma.
Reproduction 142, S. 277–283.

Bravo, PW; Ccallo, M; Garnica, J (2000b)

The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas.
Small Ruminant Research 38, S. 91–95.

Bravo, PW; Flores, U; Garnica, J; Ordoñez, C (1997a)

Collection of semen and artificial insemination of alpacas.
Theriogenology 47, S. 619–626.

Bravo, PW; Moscoso, R; Alarcon, V; Ordoñez, C (2002)

Ejaculatory process and related semen characteristics.
Archives of Andrology 48, S. 65–72.

Bravo, PW; Skidmore, JA; Zhao, XX (2000a)

Reproductive aspects and storage of semen in camelidae.
Animal Reproduction Science 62, S. 173–193.

Bravo, PW; Solis, P; Ordoñez, C; Alarcon, V (1997b)

Fertility of the male alpaca. Effect of daily consecutive breeding.
Animal Reproduction Science 46, S. 305–312.

Brito, LFC; Silva, A; Unanian, MM; Dode, MAN; Barbosa, RT; Kastelic, JP (2004)
Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil.

Theriogenology 62, S. 1198–1217.

Buendia, P; Soler, C; Paolicchi, F; Gago, G; Urquieta, B; Perez-Sanchez, F; Bustos-Obregon, E (2002)

Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the sperm-class analyzer computer-assisted system.

Theriogenology 57, S. 1207–1218.

Carretero, MI; Neild, DM; Ferrante, A; Caldevilla, M; Arraztoa, CC; Fumuso, FG; Giuliano, SM (2015)

Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of *Lama glama* spermatozoa.

Andrologia 47, S. 685–693.

Caturla-Sánchez, E; Sánchez-Calabuig, MJ; Pérez-Gutiérrez, JF; Cerdeira, J; Castaño, C; Santiago-Moreno, J (2018)

Vitrification of dog spermatozoa. Effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures.

Cryobiology 80, S. 126–129.

Cha, KY; Oum, KB; Kim, HJ (1997)

Approaches for obtaining sperm in patients with male factor infertility.

Fertility and Sterility 67, S. 985–995.

Choez, KA; Evangelista, S; Ruiz, L; Sandoval, R; Santiani, AA (2014)

Efecto de la concentración de tres crioprotectores sobre la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de espermatozoides criopreservados de epidídimo de alpaca.

Spermova 4, S. 80–82.

Choez, KA; Ruiz, LG; Sandoval, RM; Evangelista, SV; Santiani, AA (2017)

Determinación de la Concentración Óptima de Tres Crioprotectores para la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca.

Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 28, S. 619–628.

Comhaire, FH; Huysse, S; Hinting, A; Vermeulen, L; Schoonjans, F (1992)

Objective semen analysis: has the target been reached?

Human Reproduction 7, S. 237–241.

Cooper, TG (2011)

The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility.

Asian Journal of Andrology 13, S. 130–138.

Cuevas-Uribe, R; Hu, E; Daniels, H; Gill, AO; Tiersch, TR (2017)

Vitrification as an Alternative Approach for Sperm Cryopreservation in Marine Fishes.

North American Journal of Aquaculture 79, S. 187–196.

Daub, L. (2015)

Ein Vergleich zwischen den Vitalfärbungen Eosin, Eosin-Nigrosin und Bromphenolblau-Nigrosin und dem NucleoCounter SP-100® zur Beurteilung der Spermienmembranintegrität bei Spermaproben von Rüden und Bullen. Vet. Med. Dissertation, München.

Delhon, G; Lawzewitsch, I von (1994)

Ductus epididymidis compartments and morphology of epididymal spermatozoa in llamas.

Anatomia, Histologia, Embryologia 23, S. 217–225.

Durand, MGP; Aragón, JPZ; Guerra, UHP (2016)

Viabilidad in vitro e in vivo de los espermatozoides congelados/descongelados del conducto deferente de Alpacas (vicugna pacos).

Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research 18, S. 223–230.

EI-Bahrawy, KA; Rateb, S; Khalifa, M; Monaco, D; Lacalandra, GM (2017)

Physical and kinematic properties of cryopreserved camel sperm after elimination of semen viscosity by different techniques.

Animal Reproduction Science 187, S. 100–108.

Evangelista-Vargas, D; Evangelista-Vargas, S; Valdivia, M; Santiani, A (2017)

Assessment of spermatozoa in fertile alpaca (Vicugna pacos) males: Study of sperm head morphometry using a nonautomated digital method and sperm morphology based on strict criteria.

Reproduction in Domestic Animals 52, S. 312–318.

Fahy, GM; MacFarlane, DR; Angell, CA; Meryman, HT (1984)

Vitrification as an approach to cryopreservation.

Cryobiology 21, S. 407–426.

Firman, RC; Simmons, LW (2010)

Sperm midpiece length predicts sperm swimming velocity in house mice.

Biology Letters 6, S. 513–516.

Fleisch, A; Malama, E; Witschi, U; Leiding, C; Siuda, M; Janett, F; Bollwein, H (2017)

Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen.

Theriogenology 89, S. 255–262.

Flores, P; Garcia-Huidobro, J; Munoz, C; Bustos-Obregon, E; Urquieta, B (2002)

Alpaca semen characteristics previous to a mating period.

Animal Reproduction Science 72, S. 259–266.

Garcia-Alvarez, O; Maroto-Morales, A; Martinez-Pastor, F; Garde, JJ; Ramon, M; Fernandez-Santos, MR; Estes, MC; Perez-Guzman, MD; Soler, AJ (2009)

Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: electroejaculation and postmortem collection.

Theriogenology 72, S. 160–168.

Garnica, J; Achata, R; Bravo, PW (1993)

Physical and biochemical characteristics of alpaca semen.

Animal Reproduction Science 32, S. 85–90.

Gauly, M (2011)

Fruchtbarkeitsstörungen und ihre Erkennung. In: M. Gerken: Neuweltkameliden. Haltung, Zucht, Erkrankungen. 3., vollst. überarb. und erw. Aufl. Hg. v. Matthias Gauly, Jane Vaughan und Christopher Cebra. Stuttgart: Enke, S. 82–83.

Giuliano, SM; Chaves, MG; Trasorras, VL; Gambarotta, M; Neild, D; Director, A; Pinto, M; Miragaya, MH (2012)

Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen.

Animal Reproduction Science 131, S. 204–210.

Goericke-Pesch, S; Failing, K (2013)

Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS) test and acrosomal evaluation using Spermac.

Reproduction in Domestic Animals 48, S. 213–217.

Goericke-Pesch, S; Klaus, D; Failing, K; Wehrend, A (2012)

Longevity of chilled canine semen comparing different extenders.

Animal Reproduction Science 135, S. 97–105.

Gomez-Quispe, OE; Guido Perez, M; Ojeda-Guti, YG (2016b)

Survival to Freezing of Sperm Collected by Vas Deferens from Vicugna pacos with Tempol Antioxidant Addition.

Asian Journal of Animal and Veterinary Advances 11, S. 377–382.

Gómez-Quispe, OE; Guido Pérez, M; Machaca M., V (2016a)

Adición del Antioxidante Tempol en la Criopreservación de Espermatozoides de Alpaca (Vicugna pacos) Colectados por Desviación del Conducto Deferente.

Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 27, S. 294–302.

Gottardo, F; Kliesch, S (2011)

Ejakulatdiagnostik.

Der Urologe 50, S. 101–108.

Herold, FC; Aurich, JE; Gerber, D (2004)

Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed and with Triladyl but the addition of bovine seminal plasma is detrimental.

Theriogenology 61, S. 715–724.

Hewitt, DA; Leahy, R; Sheldon, IM; England, GC (2001)

Cryopreservation of epididymal dog sperm.

Animal Reproduction Science 67, S. 101–111.

Hoffmann, B (2003a)

Epididymale Spermienreifung. In: B. Hoffmann (Hg.): Andrologie. Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung. Berlin: Lehmanns Fachbuchhandlung GmbH, S. 47–50.

Hoffmann, B (2003b)

Samenbeurteilung. In: B. Hoffmann (Hg.): Andrologie. Physiologie, Pathologie und Biotechnologie der männlichen Fortpflanzung. Berlin: Lehmanns Fachbuchhandlung GmbH, S. 19–28.

Holt, WV (2000b)

Basic aspects of frozen storage of semen.
Animal Reproduction Science 62, S. 3–22.

Holt, WV (2000a)

Fundamental aspects of sperm cryobiology. The importance of species and individual differences.
Theriogenology 53, S. 47–58.

Hori, T; Atago, T; Kobayashi, M; Kawakami, E (2015)

Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality.
The Journal of Veterinary Medical Science 77, S. 625–630.

Hori, T; Uehara, Y; Kawakami, E; Tsutsui, T (2009)

Influence of the time between removal and cooling of the canine epididymis on post-thaw caudal epididymal sperm quality.
The Journal of Veterinary Medical Science 71, S. 811–815.

Horta, F; Alzobi, H; Jitanantawittaya, S; Catt, S; Chen, P; Pangestu, M; Temple-Smith, P (2017)

Minimal volume vitrification of epididymal spermatozoa results in successful in vitro fertilization and embryo development in mice.
Asian Journal of Andrology 19, S. 107–112.

Ibrahim, ZH; Singh, SK (2014)

Histological and morphometric studies on the dromedary camel epididymis in relation to reproductive activity.
Animal Reproduction Science 149, S. 212–217.

Iguer-Ouada, M; Verstegen, JP (2001)

Evaluation of the „Hamilton Thorn computer-based automated system“ for dog semen analysis.
Theriogenology 55, S. 733–749.

Isachenko, E; Isachenko, V; Katkov, II; Rahimi, G; Schöndorf, T; Mallmann, P; Dessole, S; Nawroth, F (2004)

DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification.

Human Reproduction 19, S. 932–939.

Isachenko, V; Isachenko, E; Petrunkina, AM; Sanchez, R (2012)

Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: birth of two healthy babies.

Reproduction, Fertility, and Development 24, S. 323–326.

Jeyendran, RS; Van der Ven, H; Perez-Pelaez, M; Crabo, BG; Zaneveld, LJ (1984)

Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.

Journal of Reproduction and Fertility 70, S. 219–228.

Jimenez, E; Perez-Marin, CC; Vizquete, G; Millan, Y; Aguera, EI (2013)

Effect of different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation.

Reproduction in Domestic Animals 48, S. 665–672.

Jones, AR; Chantrill, LA; Cokinakis, A (1992)

Metabolism of glycerol by mature boar spermatozoa.

Journal of Reproduction and Fertility 94, S. 129–134.

Karabulut, S; Keskin, İ; Kutlu, P; Delikara, N; Atvar, Ö; Öztürk, Mİ (2018)

Male infertility, azoospermia and cryptozoospermia incidence among three infertility clinics in Turkey.

Turkish Journal of Urology 44, S. 109–113.

Karacan, M; Ulug, M; Arvas, A; Cebi, Z; Erkan, S; Camlibel, T (2014)

Live birth rate with repeat microdissection TESE and intracytoplasmic sperm injection after a conventional testicular biopsy in men with nonobstructive azoospermia.

European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology 183, S. 174–177.

Karger, S; Geiser, B; Grau, M; Burfeind, O; Heuwieser, W; Arlt, SP (2016)

Prognostic value of a pre-freeze hypo-osmotic swelling test on the post-thaw quality of dog semen.

Animal Reproduction Science 166, S. 141–147.

Kershaw-Young, Claire M; Maxwell, W. MC (2012)

Advancing artificial insemination in camelids, particularly the alpaca. Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC Publication, No. 12/016), S. 1-9.

Kershaw-Young, CM; Maxwell, WMC (2011)

The effect of seminal plasma on alpaca sperm function.

Theriogenology 76, S. 1197–1206.

Knauf, S; Schwalm, A; Wehrend, A (2008)

Fortpflanzungsphysiologie domestizierter Neuweltkameliden.

Tierärztliche Praxis Großtiere 36, S. 313–318.

Kova, BZ; Gaulty, M; Stranzinger, G (1999)

Synaptonemal complex investigations on lamas (*Lama glama*) with differing fertility recordings.

Journal of Animal Breeding and Genetics 116, S. 235–242.

Krausz, C; Cioppi, F; Riera-Escamilla, A (2018)

Testing for genetic contributions to infertility: potential clinical impact.

Expert Review of Molecular Diagnostics 18, S. 331–346.

Li, Y-X; Zhou, L; Lv, M-Q; Ge, P; Liu, Y-C; Zhou, D-X (2019)

Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation:

A systematic review and meta-analysis.

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, S. 84–92.

Lichtenwalner, AB; Woods, GL; Weber, JA (1996)

Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas.

Theriogenology 46, S. 293–305.

Liguori, G; Paino, S; Squillacioti, C; Luca, AD; Ali, S; Langella, E; Mirabella, N (2013)

Innervation and Immunohistochemical Characteristics of Epididymis in Alpaca Camelid (Vicugna Pacos).

Italian Journal of Animal Science 12, S. 88–94.

Lin, YM; Hsu, CC; Kuo, TC; Lin, JS; Wang, ST; Huang, KE (2000)

Percutaneous epididymal sperm aspiration versus microsurgical epididymal sperm aspiration for irreparable obstructive azoospermia - experience with 100 cases.

Journal of the Formosan Medical Association 99, S. 459–465.

Mahmud, MA; Onu, J; Shehu, SA; Umaru, A; Danmaigoro, A; Atabo, MS (2015)

Morphological Studies on Epididymis and Vas Deferens of One - Humped Camel Bull (Camelus dromedaries), Uda Ram and Red Sokoto Buck.

American Journal of Bioscience and Bioengineering 3, S. 65–71.

Mamani-Mango, G; Moina Gonzales, M; Ramos Hidalgo, M; Mendoza Mallma, J; Ruiz Bejar, J; Rivas Palma, V; Mellisho Salas, E (2019)

Effect of extender and freezing rate on quality parameters and in vitro fertilization capacity of alpaca spermatozoa recovered from cauda epididymis.

Biopreservation and Biobanking 17, S. 39–45.

Martins, MIM; Padilha, LC; Souza, FF; Lopes, MD (2009)

Fertilizing capacity of frozen epididymal sperm collected from dogs.

Reproduction in Domestic Animals 44, S. 342–344.

Mazur, P (1984)

Freezing of living cells. Mechanisms and implications.

The American Journal of Physiology 247, S. C125-C142.

McEvoy, TG; Kyle, CE; Young, P; Adam, CL; Bourke, DA (1992)

Aspects of artificial breeding and establishment of pregnancy in South American camelids. In: Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, S. 1963–1965.

Meniru, GI; Gorgy, A; Batha, S; Clarke, RJ; Podsiadly, BT; Craft, IL (1998)

Studies of percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) and intracytoplasmic sperm injection.

Human Reproduction Update 4, S. 57–71.

Meza, A; Caldeira, C; Valverde, A; Ordonez, C; Ampuero, E; Cucho, H; Soler, C (2018)

Sperm kinematic characterization of alpaca (*Vicugna pacos* L.) during the reproductive season.

Reproduction in Domestic Animals 53, S. 1415–1423.

Miss, N (2012)

Untersuchungen zur Optimierung der Kryokonservierung caniner Spermien unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Verdüner. Vet. Med. Dissertation, Gießen.

Monaco, D; Batista, M; Zagorskaia, A; Amann, O; Lacalandra, GM (2016)

Retrograde flushing of dromedary camel bull epididymis: A lesson learned.

Animal Reproduction Science 169, S. 99–135.

Morrell, JM; Mayer, I (2017)

Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review.

Zygote 25, S. 545–557.

Morton, KM; Bathgate, R; Evans, G; Maxwell, WMC (2007)

Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws.

Reproduction, Fertility, and Development 19, S. 792–796.

Morton, KM; Evans, G; Maxwell, WMC (2010b)

Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm.

Theriogenology 74, S. 311–316.

Morton, KM; Thomson, PC; Bailey, K; Evans, G; Maxwell, WMC (2010a)

Quality parameters for alpaca (*Vicugna pacos*) semen are affected by semen collection procedure.

Reproduction in Domestic Animals 45, S. 637–643.

Morton, KM; Vaughan, JL; Maxwell, WMC (2008a)

Collection of alpaca semen. In: K. M. Morton, J. L. Vaughan und W. M. C. Maxwell (Hg.): Continued development of artificial insemination technology in alpacas. Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC publication, no. 08/057), S. 56–71.

Morton, KM; Vaughan, JL; Maxwell, WMC (2008b)

Cryopreservation of alpaca sperm. In: K. M. Morton, J. L. Vaughan und W. M. C. Maxwell (Hg.): Continued development of artificial insemination technology in alpacas. Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC publication, no. 08/057), S. 106–116.

Morton, KM; Vaughan, JL; Maxwell, WMC (2008c)

Liquefaction of alpaca semen. In: K. M. Morton, J. L. Vaughan und W. M. C. Maxwell (Hg.): Continued development of artificial insemination technology in alpacas. Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC publication, no. 08/057), S. 83–91.

Morton, KM; Vaughan, JL; Maxwell, WMC (2008d)

Liquid-storage of alpaca sperm. In: K. M. Morton, J. L. Vaughan und W. M. C. Maxwell (Hg.): Continued development of artificial insemination technology in alpacas. Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC publication, no. 08/057), S. 92–105.

Morton, KM; Vaughan, JL; Maxwell, WMC (2008e)

Review of literature. In: K. M. Morton, J. L. Vaughan und W. M. C. Maxwell (Hg.): Continued development of artificial insemination technology in alpacas. Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC publication, no. 08/057), S. 4–44.

Nagai, T; Takahashi, T; Masuda, H; Shioya, Y; Kuwayama, M; Fukushima, M; Iwasaki, S; Hanada, A (1988)

In-vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility 84, S. 585–591.

Neuhauser, S; Gösele, P; Handler, J (2018)

The Effect of Four Different Commercial Semen Extenders on the Motility of Stallion Epididymal Sperm.

Journal of Equine Veterinary Science 62, S. 8–12.

Novoa, C (1970)

Reproduction in Camelidae.

Journal of Reproduction and Fertility 22, S. 3–20.

O'Brien, E; Estes, MC; Castano, C; Toledano-Diaz, A; Boveda, P; Martinez-Fresneda, L; Lopez-Sebastian, A; Martinez-Nevado, E; Guerra, R; Lopez Fernandez, M; Vega, RS; Guillamon, FG; Santiago-Moreno, J (2019)

Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means.

Theriogenology 129, S. 160–167.

Ordóñez, C; Ampuero, E; Cucho, H; Chalco, G (2012)

Caracterización morfométrica de los espermatozoides de alpacas usando el integrated sperm analysis system (ISAS - CASA). Morphometric characterization of alpaca sperms using the Integrated Sperm Analysis System (ISAS).

Spermova, S. 67–68.

Pacheco, JI; Mamani-Cato, R; Vélez, V (2017)

Effect of Seminal Plasma on Hypoosmotic Swelling Test in Fresh Alpaca Spermatozoa.

MedCrave Online Journal of Biology and Medicine 2, S. 127–128.

Pacheco-Curie, JI; Mamani-Cato, R; Franco, F; Zea, O; Pezo, D; Vélez, V (2014)

efecto de la osmolaridad sobre la respuesta endosmótica en espermatozoides de epididimo y eyaculados de alpaca (*Vicugna pacos*).

Spermova 4, S. 36–38.

Papa, FO; Melo, CM; Fioratti, EG; Dell'aqua, JA, JR; Zahn, FS; Alvarenga, MA (2008)

Freezing of stallion epididymal sperm.

Animal Reproduction Science 107, S. 293–301.

- Papa, PM; Papa, FO; Oliveira, LA; Guasti, PN; Castilho, C; Giometti, IC (2015)**
Different extenders in the cryopreservation of bovine epididymal spermatozoa.
Animal Reproduction Science 161, S. 58–63.
- Parillo, F; Supplizi, AV; Macrì, D; Catone, G (2009)**
The Ductus Epididymis of the Alpaca: Immunohistochemical and Lectin Histochemical Study.
Reproduction in Domestic Animals 44, S. 284–294.
- Paulenz, H; Soderquist, L; Perez-Pe, R; Berg, KA (2002)**
Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen.
Theriogenology 57, S. 823–836.
- Perez, MG; Zevallos, J; Perez, UH (2014)**
Recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva. Recovery of alpaca sperm from vas deferens during the breeding season.
Spermova 4, S. 139–144.
- Philipp, E (2011)**
Funktionelle Morphologie des Nebenhodens des Hundes (*Canis familiaris*) unter besonderer Berücksichtigung der Basalzellen. Vet. Med. Dissertation, München
- Piasecka, M; Laszczynska, M; Gaczarzewicz, D (2003)**
Morphological and functional evaluation of spermatozoa from patients with asthenozoospermia.
Folia morphologica 62, S. 479–481.
- Pintus, E; Ros-Santaella, JL; Garde, JJ (2015)**
Beyond Testis Size: Links between Spermatogenesis and Sperm Traits in a Seasonal Breeding Mammal.
PLoS ONE 10, ePub.
- Piomboni, P; Focarelli, R; Stendardi, A; Ferramosca, A; Zara, V (2012)**
The role of mitochondria in energy production for human sperm motility.
International Journal of Andrology 35, S. 109–124.

Polge, C; Smith AU; Parkes, A (1949)

Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures.
Nature 164, S. 666.

Pradiee, J; Estes, MC; Castano, C; Toledano-Diaz, A; Lopez-Sebastian, A; Santiago-Moreno, J (2014)

Cryopreservation of epididymal sperm from ibexes (*Capra pyrenaica*) using short equilibration time with glycerol.

Theriogenology 82, S. 525–528.

Pradiee, J; Estes, MC; Castaño, C; Toledano-Díaz, A; Lopez-Sebastián, A; Guerra, R; Santiago-Moreno, J (2017)

Conventional slow freezing cryopreserves mouflon spermatozoa better than vitrification.

Andrologia 49, S. ePub.

Pradiee, J; Estes, MC; Lopez-Sebastian, A; Toledano-Diaz, A; Castano, C; Carrizosa, JA; Urrutia, B; Santiago-Moreno, J (2015)

Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa.

Theriogenology 84, S. 1513–1522.

Prapaiwan, N; Tharasanit, T; Punjachaipornpol, S; Yamtang, D; Roongsitthichai, A; Moonarmart, W; Kaeoket, K; Manee-In, S (2016)

Low-density Lipoprotein Improves Motility and Plasma Membrane Integrity of Cryopreserved Canine Epididymal Spermatozoa.

Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 29, S. 646–651.

Ratto, MH; Huanca, WL; Singh, J; Adams, GP (2006)

Comparison of the effect of ovulation-inducing factor (OIF) in the seminal plasma of llamas, alpacas, and bulls.

Theriogenology 66, S. 1102–1106.

Rijsselaere, T; Soom, A van; Maes, D; Kruif, A de (2003)

Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer.

Theriogenology 60, S. 1553–1568.

- Rijsselaere, T; Soom, A van; Maes, D; Verberckmoes, S; Kruif, A de** (2004)
Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen–thawed canine spermatozoa.
Theriogenology 61, S. 1589–1602.
- Rodriguez, J; Huanca, WL; Ramos, M; Vasquez, M; Espinoza, J** (2014)
249 biophysical and biochemical characteristics of alpaca semen after electroejaculation.
Reproduction, Fertility and Development 25, S. 1181–1186.
- Rodriguez-Wallberg, KA; Waterstone, M; Anastacio, A** (2019)
Ice age: Cryopreservation in assisted reproduction - An update.
Reproductive biology, S. 119–126.
- Ruiz, J; Landeo, L; Mendoza, J; Artica, M; Correa, JE; Silva, M; Miragaya, M; Ratto, MH** (2013)
Vitrification of in vitro mature alpaca oocyte: effect of ethylene glycol concentration and time of exposure in the equilibration and vitrification solutions.
Animal Reproduction Science 143, S. 72–78.
- Runcan, EE; Pozor, MA; Zambrano, GL; Benson, S; Macpherson, ML** (2014)
Use of two conventional staining methods to assess the acrosomal status of stallion spermatozoa.
Equine Veterinary Journal 46, S. 503–506.
- Salamon, S; Maxwell, WM** (2000)
Storage of ram semen.
Animal Reproduction Science 62, S. 77–111.
- San-Martin, M; Copaira, M; Zuniga, J; Rodreguez, R; Bustinza, G; Acosta, L** (1968)
Aspects of reproduction in the alpaca.
Journal of Reproduction and Fertility 16, S. 395–399.
- Santiago-Moreno, J; Astorga, RJ; Luque, I; Coloma, MA; Toledano-Diaz, A; Pulido-Pastor, A; Gomez-Guillamon, F; Salas-Vega, R; Lopez-Sebastian, A** (2009)
Influence of recovery method and microbial contamination on the response to freezing-thawing in ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa.
Cryobiology 59, S. 357–362.

Santiani, A; Huanca, WL; Sapana, R; Huanca, T; Sepulveda, N; Sanchez, R (2005)

Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders.

Asian Journal of Andrology 7, S. 303–309.

Santiani, A; Ugarelli, A; Evangelista-Vargas, S (2016)

Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry.

Animal Reproduction Science 173, S. 49–55.

Schafer, S; Holzmann, A (2000)

The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa.

Animal Reproduction Science 59, S. 201–211.

Schlegel, PN (2004)

Causes of azoospermia and their management.

Reproduction, Fertility, and Development 16, S. 561–572.

Schwalm, A (2006)

Einfluss von Hitzestress auf Parameter der Reproduktion, Thermoregulation und das Verhalten männlicher Lamas (*Lama glama*) unter. Vet. Med. Dissertation, Gießen.

Silva, AM; Bezerra, JAB; Campos, LB; Praxedes, ÉCG; Lima, GL; Silva, AR (2017)

Characterization of epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831) recovered by different methods.

Acta Zoologica 98, S. 285–291.

Smith, CL; Peter, AT; Pugh, DG (1994)

Reproduction in llamas and alpacas. A review.

Theriogenology 41, S. 573–592.

Soler, C; Sancho, M; Garcia, A; Fuentes, M; Nunez, J; Cucho, H (2014a)

Ejaculate fractioning effect on llama sperm head morphometry as assessed by the ISAS(®) CASA system.

Reproduction in Domestic Animals 49, S. 71–78.

Soler, C; Sancho, M; García-Molina, A; Núñez, J; Parráquez, VH; Contell, J; Bustos-Obregón, E (2014b)

Llama and alpaca comparative sperm head morphometric analysis.

Journal of Camelid Science 7, S. 48–58.

Steele, EK; McClure, N; Lewis, S (2000)

A comparison of the morphology of testicular, epididymal, and ejaculated sperm from fertile men and men with obstructive azoospermia.

Fertility and Sterility 73, S. 1099–1103.

Stelletta, C;.Juyena, NS; Ponce Salazar, D; Ruiz, J; Gutierrez, G (2011)

Testicular cytology of alpaca: Comparison between impressed and smeared slides.

Animal Reproduction Science 125, S. 133–137.

Talarczyk-Desole, J; Berger, A; Taszarek-Hauke, G; Hauke, J; Pawelczyk, L; Jedrzejczak, P (2017)

Manual vs. computer-assisted sperm analysis: can CASA replace manual assessment of human semen in clinical practice?

Ginekologia Polska 88, S. 56–60.

Terreros, MC; Huanca, WL; Arriaga, IC; Ampuero, AB (2015)

Efecto de Tres Crioprotectores en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca.

Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 26, S. 420–426.

Tibary, A; Anouassi, A; Khatir, H (2005)

Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids.

Theriogenology 64, S. 618–638.

Tibary, A; Vaughan, J (2006)

Reproductive physiology and infertility in male South American camelids. A review and clinical observations.

Small Ruminant Research 61, S. 283–298.

Tingari, MD (1989)

The fine structure of the epithelial lining of the epididymis of the camel (*Camelus dromedarius*) with special reference to regional differences.

Journal of Anatomy 165, S. 201–214.

Tomkins, JL; Kotiaho, JS (2002)

Fluctuating Asymmetry.

Encyclopedia of Life Sciences, S 1-5.

Tornquist, SJ; Cebra, C (2014)

Clinical Pathology. In: C. Cebra, D. E. Anderson, A. Tibary, R. J. van Saun und L.R.W. Johnson (Hg.): Llama and Alpaca Care - Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health: Elsevier, S. 338–348.

Tourmente, M; Gomendio, M; Roldan, ERS (2011)

Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals.

BMC Evolutionary Biology 11, S. 12.

Trasorras, VL; Carretero, MI; Neild, DM; Chaves, MG; Giuliano, SM; Miragaya, MH (2017)

Production, Preservation, and Transfer of South American Camelid Embryos.

Frontiers in Veterinary Science 4, S. 190.

Tsutsui, T; Wada, M; Anzai, M; Hori, T (2003)

Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats.

The Journal of Veterinary Medical Science 65, S. 397–399.

Turri, F; Madeddu, M; Gliozzi, TM; Gandini, G; Pizzi, F (2012)

Influence of recovery methods and extenders on bull epididymal spermatozoa quality.

Reproduction in Domestic Animals 47, S. 712–717.

Ungerfeld, R; Villagran, M; Lacuesta, L; Vazquez, N; Perez, W (2017)

Asymmetrical size and functionality of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*)

testes: Right testis is bigger but left testis is more efficient in spermatogenesis.

Anatomia, Histologia, Embryologia 46, S. 547–551.

Urquieta, B; Flores, P; Munoz, C; Bustos-Obregon, E; Garcia-Huidobro, J (2005)

Alpaca semen characteristics under free and directed mounts during a mating period.

Animal Reproduction Science 90, S. 329–339.

Vajta, G; Holm, P; Kuwayama, M; Booth, PJ; Jacobsen, H; Greve, T; Callesen, H (1998)

Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.

Molecular Reproduction and Development 51, S. 53–58.

Vasquéz, J; Florentini, EA; Valdivia, M (2012)

Hypoosmotic swelling test in alpaca (*Vicugna pacos*) epididymal spermatozoa.

Reproduction in Domestic Animals 47, S. e83-e87.

Vásquez, JH; Núñez, VH; Florentini, EA; Gonzales, JM; Camargo, LA; Valdivia, ME (2013)

Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing.

Livestock Science 152, S. 94–99.

Vaughan, J; Galloway, D; Hopkins, D (2003a)

Collection of alpaca semen. In: J. Vaughan, D. Galloway und D. Hopkins (Hg.): Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation

(RIRDC publication, no. 03/104), S. 35–45.

Vaughan, J; Galloway, D; Hopkins, D (2003b)

Freezing and thawing alpaca semen. In: J. Vaughan, D. Galloway und D. Hopkins (Hg.): Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation

(RIRDC publication, no. 03/104), S. 67–73.

Vaughan, J; Galloway, D; Hopkins, D (2003c)

Introduction and review of the literature - Collection of semen. In: J. Vaughan, D. Galloway und D. Hopkins (Hg.): Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation

(RIRDC publication, no. 03/104), S. 13–21.

Vaughan, J; Galloway, D; Hopkins, D (2003d)

Storing liquid alpaca semen. In: J. Vaughan, D. Galloway und D. Hopkins (Hg.): Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Barton, A.C.T.: Rural Industries Research and Development Corporation

(RIRDC publication, no. 03/104), S. 60–66.

Verstegen, J; Iguer-Ouada, M; Onclin, K (2002)

Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice.
Theriogenology 57, S. 149–179.

Wani, NA (2009)

In vitro embryo production in camel (*Camelus dromedarius*) from in vitro matured oocytes fertilized with epididymal spermatozoa stored at 4 degrees C.
Animal Reproduction Science 111, S. 69–79.

Watson, PF (2000)

The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.
Animal Reproduction Science 60-61, S. 481–492.

Woelders, H; Windig, J; Hiemstra, SJ (2012)

How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (farm) animals.
Reproduction in Domestic Animals 47, S. 264–273.

Wosnitzer, MS; Goldstein, M (2014)

Obstructive azoospermia.
The Urologic Clinics of North America 41, S. 83–95.

Zhao, W; Li, Z; Ping, P; Wang, G; Yuan, X; Sun, F (2018)

Outer dense fibers stabilize the axoneme to maintain sperm motility.
Journal of cellular and molecular medicine 22, S. 1755–1768.

Zubair, M; Ahmad, M; Jamil, H (2015)

Review on the screening of semen by hypo-osmotic swelling test.
Andrologia 47, S. 744–750.

9 Anhang

9.1 Einstellungen des SpermVision®- und AndroVision®-Analysesystems

Tab. 12: Einstellungen SpermVision® und AndroVision®

Parameter	Anwendung/ Einstellung
Tiefe der Probenkammer	20 µm
Eingesetztes Volumen pro Kammer	2,50 µl
Analysentemperatur	37 C
Fläche zur Erkennung des Spermienkopfes	10 – 22 µm ²
Formfaktor bei AndroVision®	1,30
Anzahl untersuchter Spermien bzw. Felder	Min. 500 Spermien oder 10 Felder
Bildwiederholungsrate	60 /sec
Videosequenzdauer	0,50 sec
Immotile Spermien	ALH < 1,00 µm VCL < 24,00 µm/s
Gesamtmotile Spermien	ALH > 1,00 µm VCL > 24,00 µm/s

9.2 Rezepte

9.2.1 Eosin-Färbelösung

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

9.2.2 Hypoosmotische Lösung (150 mosmol)

(Jeyendran et al., 1992; Hoffmann, 2003)

- 0,735 g Natriumcitrat (Fa. Merck, Darmstadt)
- 1,351 g Fruktose (Fa. Merck, Darmstadt)
- ad 100 ml Aqua destillata

9.2.3 Materialien und Durchführungen zur histologischen Aufbereitung

Tab. 13: Zusammensetzung des neutral gepufferten 10 %-igen Formalins (Formol nach Lillie) für 1 Liter Lösung

Formaldehyd (37 %) (Merck; Darmstadt)	100 ml
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck)	4,00 g
Di-Natriumhydrogenphosphat (Merck)	6,50 g
Aqua destillata	900 ml

Tab. 14: Zusammensetzung des neutralen Puffers (für 1 Liter Lösung)

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, Darmstadt)	13,80 g
Di-Natriumhydrogenphosphat (Merck)	17,80 g
Aqua destillata	1000 ml

Tab. 15: Zusammensetzung des 70 %-igen Isopropanols (für 1 Liter Lösung)

98 %-iges Isopropanol	700 ml
Aqua destillata	300 ml

Tab. 16: Ablauf und Durchführung der aufsteigenden Alkoholreihe, alle verwendeten Lösungen wiesen Raumtemperatur auf

Schritt	Lösung	Zeit in Minuten
Dehydratation	Isopropanol 70 % (Carl Roth; Karlsruhe)	15
	Isopropanol 80 % (Carl Roth; Karlsruhe)	15
	Isopropanol 96 % (Carl Roth; Karlsruhe)	15
	Isopropanol 100 % (Carl Roth; Karlsruhe)	15
	Isopropanol 100 % (Carl Roth; Karlsruhe)	15
Waschen	Xylol (Merck; Darmstadt)	15
	Xylol (Merck; Darmstadt)	15

Tab. 17: Ablauf und Durchführung der APES Beschichtung zur besseren Anheftung des Schnittes auf dem Objektträger

Schritt	Lösung	Zeit / Häufigkeit
Inkubation	APES 2% (Merck; Darmstadt)	20 Sekunden
Waschen	Aceton (Merck; Darmstadt)	2 Mal
	Aqua destillata	2 Mal

Tab. 18: Protokoll zur Hämatoxylin Eosin-Färbung (HE Färbung)

Schritt	Lösung	Zeit in Minuten
Reinigung	Xylol (Merck; Darmstadt)	10
	Xylol (Merck; Darmstadt)	10
Rehydrierung	Ethanol 100 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
	Ethanol 96 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
	Ethanol 80 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
	Ethanol 70 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
	Ethanol 60 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
	Ethanol 50 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
Waschen	Aqua destillata	5
Färbung	Hämatoxylin (Merck; Darmstadt)	3
Waschen	Leitungswasser	3 - 5
Färbung	Eosin 0,1 %	3 - 5
Waschen	Leitungswasser	0,5
Rehydrierung	Ethanol 50 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
	Ethanol 60 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
	Ethanol 70 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
	Ethanol 80 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
	Ethanol 96 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
	Ethanol 100 % (Carl Roth; Karlsruhe)	5
Reinigung	Xylol (Merck; Darmstadt)	10
	Xylol (Merck; Darmstadt)	10

9.3 Ergebnistabellen

Tab. 19: Hodenmaße und -volumina der Probanden (n = 7), deren Nebenhoden histologisch untersucht wurden. Je Zeile sind die Daten eines Hengstes nach Seiten getrennt (links/ rechts) dargestellt

Länge (cm)		Breite (cm)		Höhe (cm)		Volumen (cm ³)	
links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
4,00	3,70	2,00	2,00	2,50	2,00	10,50	7,70
4,50	5,00	2,80	2,50	3,00	3,00	19,80	19,60
3,50	3,50	2,50	3,00	2,00	2,50	9,20	13,70
4,00	8,80	1,50	4,50	1,30	5,00	4,10	91,90
5,00	*	4,00	*	3,50	*	36,70	*
4,30	3,7	2,00	2,00	2,50	2,00	11,30	7,70
4,00	4,00	2,50	2,00	2,30	2,50	12,00	10,50

* kein Eintrag, da kein rechter Hoden vorliegend (kryptorchider Hengst)

Tab. 20: Hodenmaße und -volumina der Probanden (n = 29), von denen Spermien gewonnen und analysiert wurden. Eine Zeile gibt die Daten eines Hengstes nach Seiten getrennt (links/ rechts) wieder

Länge (cm)		Breite (cm)		Höhe (cm)		Volumen (cm ³)	
links	rechts	links	rechts	links	rechts	links	rechts
6,00	6,00	2,50	2,70	3,50	3,40	27,50	28,80
4,50	4,70	3,00	2,80	2,30	2,40	16,30	16,500
5,00	4,90	3,10	3,00	2,30	2,40	18,70	18,50
5,50	5,70	3,50	3,00	3,50	3,50	35,30	31,30
6,30	6,30	4,00	4,00	3,50	3,40	46,20	44,90
4,00	4,00	3,50	3,50	3,00	3,00	22,00	22,00
3,70	4,00	3,40	3,40	2,70	2,80	17,80	19,90
6,00	5,80	4,20	4,20	3,50	3,50	46,20	44,60
5,50	5,80	3,00	3,80	3,30	3,50	28,50	40,40
5,50	5,80	3,20	3,30	3,50	3,80	32,30	38,10
5,00	5,20	3,00	3,20	2,50	2,30	19,60	20,00
6,00	6,00	4,40	4,00	3,80	3,50	52,50	44,00
5,50	5,70	3,50	3,50	3,00	3,20	30,20	33,40
7,50	7,80	5,00	5,30	4,30	4,00	84,40	86,60
6,00	6,40	4,30	4,20	3,00	3,20	40,50	45,00
5,30	5,50	3,00	3,00	2,70	2,50	22,50	21,60
7,50	7,20	5,00	4,70	4,50	5,00	88,40	88,60
4,50	4,50	3,50	3,00	3,00	3,00	24,70	21,20
4,70	4,50	3,50	3,50	3,50	4,00	30,10	33,00
6,00	6,00	4,50	4,50	4,00	4,30	56,50	60,80
6,30	6,50	5,00	5,00	4,30	4,00	70,90	68,10
4,00	4,00	3,00	3,50	3,50	3,00	22,00	22,00
5,20	5,50	4,00	4,00	3,50	3,50	38,10	40,30
4,00	4,00	3,50	3,50	2,50	2,50	18,30	18,30
4,50	4,50	2,60	3,20	2,30	2,50	14,10	18,80
5,00	5,00	3,50	3,50	3,00	3,00	27,50	27,50
5,50	5,50	3,90	4,00	3,50	3,50	39,30	40,30
5,00	5,00	3,80	4,30	3,50	3,70	34,80	41,70
4,50	4,50	3,50	3,00	3,50	3,00	28,90	21,20

Tab. 21: Prozentuale Anteile morphologisch veränderter Spermien in den frischen Proben mit Andromed®-Zusatz (n = 29). Darstellung anhand von arithmetischem Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum

Morphologische Veränderung	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Akrosom nicht vorhanden	7,43 ± 6,43	1,00	27,50
Zwergkopf	3,86 ± 3,70	0,00	16,50
Riesenkopf	0,12 ± 0,26	0,00	1,00
Lanzenform	0,76 ± 0,64	0,00	2,00
Kolbenform	1,69 ± 1,70	0,00	9,50
schmal	1,48 ± 1,43	0,00	7,00
deformiert	3,09 ± 1,86	0,00	7,50
Doppelkopf	0,34 ± 0,48	0,00	1,50
Spatelform	0,72 ± 0,89	0,00	4,00
abaxialer Schwanzansatz	0,67 ± 0,74	0,00	3,00
paraxialer Schwanzansatz	0,43 ± 0,55	0,00	1,50
retroaxialer Schwanzansatz	0,29 ± 0,39	0,00	1,00
Halsbruch	2,26 ± 2,90	0,00	12,50
Schleifenform	5,53 ± 4,11	0,00	13,00
aufgerollt	2,67 ± 2,75	0,00	13,00
um Kopf gerollt	1,47 ± 2,36	0,00	10,50
abgeknickt	2,21 ± 1,61	0,00	6,00
Doppelschwanz	0,03 ± 0,19	0,00	1,00
lose Köpfe	5,43 ± 4,03	0,50	18,50
Plasmatropfen Hals	24,48 ± 13,89	3,00	57,00
Plasmatropfen Mittelstück	3,36 ± 4,56	0,00	17,00
Plasmatropfen Schwanz	0,10 ± 0,31	0,00	1,00
Plasmatropfen gesamt	27,95 ± 15,23	5,50	60,00
Pathomorphologische Samenzellen gesamt (ohne Plasmatropfen)	39,43 ± 13,76	18,00	72,50

Tab. 22: Prozentuale Anteile morphologisch veränderter Spermien (%) in den frischen Proben die Triladyl® enthielten (n = 29). Darstellung anhand von arithmetischem Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum (Max.)

Morphologische Veränderung	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Akrosom nicht vorhanden	5,28 ± 5,53	0,00	22,00
Zwergkopf	3,64 ± 2,37	0,50	11,50
Riesenkopf	0,07 ± 0,18	0,00	0,50
Lanzenform	0,84 ± 0,76	0,00	2,50
Kolbenform	1,72 ± 1,84	0,00	10,00
schmal	1,50 ± 1,33	0,00	4,50
deformiert	3,12 ± 1,63	0,00	7,50
Doppelkopf	0,29 ± 0,45	0,00	1,50
Spatelform	0,83 ± 0,95	0,00	3,00
abaxialer Schwanzansatz	0,41 ± 0,67	0,00	3,00
paraxialer Schwanzansatz	0,26 ± 0,37	0,00	1,00
retroaxialer Schwanzansatz	0,16 ± 0,30	0,00	1,00
Halsbruch	2,31 ± 2,98	0,00	11,50
Schleifenform	4,00 ± 3,18	0,00	14,50
aufgerollt	2,69 ± 3,32	0,00	13,50
um Kopf gerollt	1,31 ± 1,58	0,00	5,50
abgeknickt	2,17 ± 2,17	0,00	7,50
Doppelschwanz	0,00 ± 0,00	0,00	0,00
lose Köpfe	5,26 ± 4,45	0,50	18,50
Plasmotropfen Hals	29,72 ± 13,58	7,50	56,50
Plasmotropfen Mittelstück	4,17 ± 3,87	0,00	15,50
Plasmotropfen Schwanz	0,10 ± 0,34	0,00	1,50
Plasmotropfen gesamt	34,00 ± 14,91	7,50	57,50
Pathomorphologische Samenzellen gesamt (ohne Plasmotropfen)	37,33 ± 11,93	7,00	65,00

Tab. 23: Darstellung morphologisch veränderter Spermien (%) in den 29 aufgetauten Proben mit Andromed® ($\bar{x} \pm SD$, Min., Max., Med.)

Morphologische Veränderung	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Akrosom nicht vorhanden	10,50 ± 8,94	1,50	36,00
Zwergkopf	3,55 ± 3,16	0,50	15,00
Riesenkopf	0,03 ± 0,13	0,00	0,50
Lanzenform	0,84 ± 0,75	0,00	2,50
Kolbenform	1,72 ± 1,61	0,00	9,00
schmal	1,81 ± 1,07	0,00	4,00
deformiert	3,21 ± 2,30	0,00	12,50
Doppelkopf	0,22 ± 0,41	0,00	1,50
Spatelform	1,05 ± 0,89	0,00	3,50
abaxialer Schwanzansatz	0,38 ± 0,32	0,00	1,00
paraxialer Schwanzansatz	0,31 ± 0,45	0,00	1,50
retroaxialer Schwanzansatz	0,22 ± 0,32	0,00	1,00
Halsbruch	2,79 ± 3,56	0,00	13,00
Schleifenform	7,40 ± 4,87	1,50	20,00
aufgerollt	2,24 ± 2,31	0,00	8,00
um Kopf gerollt	0,69 ± 0,89	0,00	3,00
abgeknickt	2,90 ± 2,56	0,00	10,50
Doppelschwanz	0,02 ± 0,09	0,00	0,50
lose Köpfe	4,24 ± 3,51	0,50	18,00
Pathomorphologische (ohne Plasmotropfen) gesamt	44,22 ± 12,40	17,00	69,50

Tab. 24: Pathomorphologien (%) in den aufgetauten Samenproben mit Triladyl®-Zusatz (n = 29). Darstellung anhand von arithmetischem Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.) und Maximum (Max.)

Morphologische Veränderung	$\bar{x} \pm SD$	Min.	Max.
Akrosom nicht vorhanden	9,19 ± 7,94	1,00	33,00
Zwergkopf	4,40 ± 4,45	1,00	18,50
Riesenkopf	0,07 ± 0,18	0,00	0,50
Lanzenform	0,57 ± 0,64	0,00	2,50
Kolbenform	1,81 ± 1,82	0,00	10,00
schmal	1,84 ± 1,43	0,00	5,00
deformiert	3,36 ± 3,30	0,00	18,00
Doppelkopf	0,26 ± 0,34	0,00	1,00
Spatelform	1,05 ± 1,06	0,00	4,00
abaxialer Schwanzansatz	0,16 ± 0,30	0,00	1,00
paraxialer Schwanzansatz	0,19 ± 0,31	0,00	1,00
retroaxialer Schwanzansatz	0,22 ± 0,39	0,00	1,50
Halsbruch	3,74 ± 4,61	0,00	16,50
Schleifenform	6,28 ± 3,29	2,50	18,00
aufgerollt	2,53 ± 2,96	0,00	13,00
um Kopf gerollt	0,88 ± 1,05	0,00	3,50
abgeknickt	2,90 ± 2,39	0,00	9,00
Doppelschwanz	0,02 ± 0,09	0,00	0,50
lose Köpfe	4,41 ± 4,65	0,50	23,00
Pathomorphologische gesamt (ohne Plasmatrophen)	43,98 ± 12,86	19,00	66,00

Tab. 25: Zusammenhang zwischen Hodenvolumen, Verdünner und Einfrieren auf die morphologischen Veränderungen. Die Darstellung erfolgt als Wahrscheinlichkeit (p)

Variablen	Faktoren			Wechselwirkung
	Hodenvolumen	Verdünner	Einfrieren	Verdünner x Einfrieren
Riesenkopf	0,50	0,23	0,04	0,12
Lanzenform	0,53	0,49	0,52	0,05
Kolbenform	0,75	0,85	0,86	0,86
schmal	0,93	0,94	0,17	0,97
deformiert	0,96	0,91	0,70	0,79
Doppelkopf	0,89	0,65	0,27	0,58
Spatelform	0,61	0,50	0,04	0,60
abaxialer Schwanzansatz	0,21	0,02	0,01	0,28
paraxialer Schwanzansatz	0,64	0,06	0,21	0,97
retroaxialer Schwanzansatz	0,79	0,06	0,38	0,18
Halsbruch	0,64	0,93	0,33	0,37
aufgerollt	0,42	0,96	0,29	0,61
um Kopf gerollt	0,14	0,45	0,0009	0,24
abgeknickt	0,11	0,90	0,06	0,94
Doppelschwanz	0,33	1,00	0,05	1,00
lose Köpfe	0,97	0,78	0,10	0,98
Zwergkopf	0,19	0,53	0,71	0,53
Schleifenform	0,35	0,06	0,04	0,42
Akrosom nicht vorhanden	0,64	0,01	0,02	0,14

9.4 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.	35
Abb. 2: Ansicht des AndroVision®-Monitorbildes.	39
Abb. 3: Darstellung der Altersverteilung der Hengste (n = 40) mittels Box-and-Whisker-Plot.	48
Abb. 4: Dichte (Mio./ ml) der Samenproben (n = 58) einzelner Hengste aus den Nebenhoden von Alpakas.	52
Abb. 5: Box-and-Whisker-Plot für die initiale Dichte (Mio./ ml).	53
Abb. 6: Anschnitt des Nebenhodenganges eines Alpakahengstes (2 Jahre alt) ohne Spermien.	55
Abb. 7: Anschnitt des Nebenhodenganges eines Alpakahengstes (2 Jahre alt) mit Spermien.	55
Abb. 8: Box-and-Whisker-Plot für Motilität der Andromed®- und Triladyl®-konservierten Samenproben (n = 58) vor und nach Kryokonservierung.	60
Abb. 9: Vitalität der Nebenhodenspermien von Alpakas in Eosin-G-Ausstrich und hypoosmotischem Schwelltest (HOS-Test) für Andromed®- und Triladyl®- behandelte Proben (n = 58) jeweils frisch und aufgetaut aufgezeigt.	62
Abb. 10: Box-and-Whisker-Plot für den Anteil pathologisch veränderter Spermien von Alpakahengsten Andromed®- und Triladyl®-konservierter Proben (n = 58) vor und nach Kryokonservierung.	63
Abb. 11: Spermac®-Färbung, kryokonserviertes Alpakasperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl.	64
Abb. 12: Spermac®-Färbung, kryokonserviertes Alpakasperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl.	64
Abb. 13: Spermac®-Färbung, kryokonserviertes Alpakasperma, 1000-fache Vergrößerung mit Immersionsöl.	65

9.5 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenstellung der bei Morton et al. (2007) verwendeten Verdüner und deren Bestandteile für Alpakasperma	24
Tab. 2: Zusammensetzung der zur Gewinnung von Nebenhodensperma eingesetzten Verdüner	34
Tab. 3: Pathomorphologische Spermienformen; Modifizierte Einteilung nach Hoffmann (2003)	38
Tab. 4: Anteil lebender und toter Spermien (%) der aus 58 Nebenhoden gewonnenen Samenzellen vor Kryokonservierung	49
Tab. 5: Anteil Spermien mit „curled tail“ und „not curled“ (%) vor Kryokonservierung (n = 58); arithmetischer Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Median (Med.) aufgeführt	50
Tab. 6: Darstellung der prozentualen Anteile morphologisch veränderter Spermien (%) in den Proben direkt nach Gewinnung (n = 58)	51
Tab. 7: Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (SD), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Median (Med.) motiler und immotiler Nebenhodenspermien (%) von Alpakahengsten vor der Kryokonservierung (n = 58)	54
Tab. 8: Prozentsatz lebender und toter Nebenhodenspermien von Alpakahengsten in den Proben nach Kryokonservierung (n = 58)	56
Tab. 9: Anteil Spermien mit „curled tail“ und „not curled“ (%) von Alpakahengsten nach dem Auftauen	57
Tab. 10: Prozentualer Anteil morphologisch veränderter Nebenhodenspermien von Alpakas insgesamt nach dem Auftauen (n = 58)	58
Tab. 11: Prozentualer Anteil motiler und immotiler Spermien von Alpakas nach der Kryokonservierung in 58 Proben	59
Tab. 12: Einstellungen SpermVision® und AndroVision®	120
Tab. 13: Zusammensetzung des neutral gepufferten 10 %-igen Formalins	121

Tab. 14: Zusammensetzung des neutralen Puffers	121
Tab. 15: Zusammensetzung des 70 %-igen Isopropanols	121
Tab. 16: Ablauf und Durchführung der aufsteigenden Alkoholreihe	122
Tab. 17: Ablauf und Durchführung der APES Beschichtung	122
Tab. 18: Protokoll zur Hämatoxylin Eosin-Färbung (HE Färbung)	123
Tab. 19: Hodenmaße und -volumina der Probanden (n = 7), deren Nebenhoden histologisch untersucht wurden	124
Tab. 20: Hodenmaße und -volumina der Probanden (n = 29), von denen Spermien gewonnen und analysiert wurden	125
Tab. 21: Prozentuale Anteile morphologisch veränderter Spermien in den frischen Proben mit Andromed®-Zusatz (n = 29)	126
Tab. 22: Prozentuale Anteile morphologisch veränderter Spermien (%) in den frischen Proben die Triladyl® enthielten (n = 29)	127
Tab. 23: Darstellung morphologisch veränderter Spermien (%) in den 29 aufgetauten Proben mit Andromed®	128
Tab. 24: Pathomorphologien (%) in den aufgetauten Samenproben mit Triladyl®-Zusatz (n = 29)	129
Tab. 25: Zusammenhang zwischen Hodenvolumen, Verdünner und Einfrieren auf die morphologischen Veränderungen	130

10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Wehrend für die Überlassung des Themas, der Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit und den Korrekturen.

Herrn Dr. H. Wagner danke ich für seine Hilfe bei den Kastrationen und dass er stets sein Wissen über Neuweltcameliden teilte.

Dem Alpaka Zucht Verband Deutschland e.V. möchte ich meinen Dank für die finanzielle Unterstützung dieser Dissertation aussprechen.

Dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie der Justus-Liebig-Universität danke ich für die Hilfe bei der histologischen Aufbereitung und Färbung der Präparate.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. K. Failing und Frau M. Sparenberg der AG Biomathematik für die Hilfe bei der statistischen Datenauswertung und die geduldige Erklärung statistischer Fragestellungen.

Des Weiteren möchte ich Frau S. Heerdt, Frau E. Lindenstruth, Frau F. Kotarski und Frau J. Blad-Stahl für die stets freundliche Unterstützung bei Fragen zu den Labor-tätigkeiten danken.

Den Mitarbeitern der KGGGA sage ich Dank für die lehrreiche Zeit.

Ich bedanke mich herzlich bei Frau PD Dr. M. Sickinger für ihre kompetente Hilfe bei fachlichen Fragen und bei Herrn Dr. M. Klymiuk für seine Unterstützung bei Problemen mit der Literaturverwaltung.

Frau Dr. D. Dehn und Frau Dr. C. Blaschka danke ich aufrichtig für ihre Unterstützung bei Anfertigung dieser Arbeit.

Meinen Eltern und Freunden danke ich von Herzen für ihren bedingungslosen und tatkräftigen Beistand.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig 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 nicht veröffentlichten 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.

Marlen Auer

ISBN: 978-3-86345-563-7



Verlag der DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17 • 35392 Gießen
Tel.: 0641 / 24466 • Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de