

Christoph Schepull

UNTERSUCHUNG ZUM EINFLUSS DER
EJAKULATIONSHÄUFIGKEIT AUF DIE
TIEFGEFRIEREIGNUNG BEI DECKHENGSTEN
NACH DECKRUHE



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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

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

1. Auflage 2020

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

1st Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und
Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

**UNTERSUCHUNG ZUM EINFLUSS DER
EJAKULATIONSHÄUFIGKEIT AUF DIE
TIEFGEFRIEREIGNUNG BEI DECKHENGSTEN
NACH DECKRUHE**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Christoph Schepull

Tierarzt aus Demmin

Gießen 2019

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

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

Gutachter: Prof. Dr. Axel Wehrend

PD Dr. Daniela Fietz

Prof.in Dr. Stephanie Krämer

Tag der Disputation: 30.04.2020

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Schrifttum	2
2.1	<i>Bedeutung der Besamung beim Pferd</i>	2
2.1.1	Entwicklung und gegenwärtiger Stand der Besamung beim Pferd	2
2.1.2	Moderne Entwicklung der Besamung	9
2.2	<i>Anforderungen und Aufbereitung der Ejakulate zur Kryokonservierung</i>	9
2.2.1	Anforderungen an den Nativsamen zur Kryokonservierung	10
2.2.2	Aufbereitung der nativen Ejakulate	12
2.2.3	Einfluss des Seminalplasmas und der Zentrifugation auf die Samenqualität	12
2.2.4	Tiefgefriererdünnung	15
2.2.5	Kryoprotektiva	16
2.2.6	Einfluss der Samenzellkonzentration auf die Fertilität und Motilität	16
2.2.7	Einfriervorgang	18
2.3	<i>Vorbereitung der Deckhengste auf die Samengewinnung zur Kryokonservierung</i>	19
2.4	<i>Konstanz von spermatologischen Parameter bei wiederholter Samenentnahme</i>	22
3	Material und Methoden	26
3.1	<i>Hengste</i>	26
3.2	<i>Gewinnung der Ejakulate</i>	26
3.3	<i>Spermatologische Untersuchung des Nativsamens</i>	26
3.3.1	Makroskopische Untersuchung	27
3.3.2	Mikroskopische Untersuchung	27
3.4	<i>Kryokonservierung</i>	28
3.5	<i>Tiefgefriersamenlagerung und Transport</i>	30
3.6	<i>Untersuchung des Tiefgefriersamens</i>	30
3.6.1	Computer-assistierte Samenanalyse	30
3.6.2	Morphologische Untersuchung der Samenzellen	33
3.6.3	Lebend-Tot-Färbung	33
3.7	<i>Statistische Auswertung</i>	34
4	Ergebnisse	36
4.1	<i>Spermatologische Parameter der nativen Ejakulate</i>	36
4.1.1	Untersuchungsergebnisse der makroskopischen Untersuchung	36
4.1.2	Untersuchungsergebnisse der mikroskopischen Untersuchung	39

4.2	<i>Spermatologische Parameter der aufgetauten Besamungsportionen</i>	42
4.2.1	Motilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse der aufgetauten Samenportionen	42
4.2.1.1	Progressive- und Gesamtmotilität der Samenzellen	42
4.2.1.2	Einzelmotilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse	43
4.2.2	Pathomorphologie der Samenzellen in den aufgetauten Besamungsportionen	46
4.2.2.1	Spermienkopfveränderungen	46
4.2.2.2	Spermien mit Halsbruch	48
4.2.2.3	Spermienschwanzveränderungen	50
4.2.2.4	Plasmatrophen	51
4.2.3	Lebend-Tot Untersuchung der aufgetauten Besamungsportionen	53
4.3	<i>Mindestanforderungen an die spermatologischen Parameter nativer Ejakulate</i>	54
4.4	<i>Einflussfaktoren auf die spermatologischen Parameter</i>	55
4.4.1	Einfluss des Alters der Hengste	55
4.4.1.1	Spermatologische Parameter der nativen Ejakulate	55
4.4.1.1.1	Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung	55
4.4.1.1.2	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung	56
4.4.1.2	Motilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse der aufgetauten Besamungsportionen	56
4.4.1.2.1	Progressive- und Gesamtmotilität der Samenzellen	56
4.4.1.2.2	Einzelmotilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse	56
4.4.1.3	Pathomorphologie der Samenzellen	56
4.4.1.3.1	Spermienkopfveränderungen	56
4.4.1.3.2	Spermien mit Halsbruch	57
4.4.1.3.3	Spermienschwanzveränderungen	57
4.4.1.3.4	Plasmatrophen	57
4.4.1.4	Lebend-Tot-Färbung	57
4.4.1.5	Einfluss des Alters auf die Entwicklung der Mindestanforderung an die nativen Ejakulate	57
4.4.2	Einfluss der Samenentnahmehäufigkeit auf die spermatologischen Parameter	58
4.4.2.1	Spermatologische Parameter der nativen Ejakulate	58
4.4.2.1.1	Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung	58
4.4.2.1.2	Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung	58

4.4.2.2	Motilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse der aufgetauten Besamungsportionen	58
4.4.2.2.1	Progressive- und Gesamtmotilität der Samenzellen	58
4.4.2.2.2	Einzelmotilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse	59
4.4.2.3	Pathomorphologie der Samenzellen.....	59
4.4.2.3.1	Spermienkopfveränderungen	59
4.4.2.3.2	Spermien mit Halsbruch	59
4.4.2.3.3	Spermienschwanzveränderungen	59
4.4.2.3.4	Plasmatrophen	59
4.4.2.4	Lebend-Tot-Färbung	60
4.4.2.5	Entwicklung der Mindestanforderung an die nativen Ejakulate	60
5	<i>Diskussion</i>	61
5.1	<i>Diskussion der Fragestellung</i>	61
5.2	<i>Diskussion der Methodik</i>	62
5.2.1	Auswahl der Probanden	62
5.2.2	Untersuchung des Nativsamens und Kryokonservierung	62
5.2.3	Untersuchung des aufgetauten Tiefgefrierspermas	65
5.3	<i>Diskussion der Ergebnisse</i>	66
5.3.1	Spermatologische Parameter der nativen Ejakulate	66
5.3.2	Spermatologische Parameter der aufgetauten Besamungsportionen	72
5.4	<i>Fazit für die Praxis</i>	76
6	<i>Zusammenfassung</i>	77
7	<i>Summary</i>	79
8	<i>Anhang</i>	81
9	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	112
10	<i>Tabellenverzeichnis</i>	114
11	<i>Literaturverzeichnis</i>	116

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abgekni	abgeknickt
ALH	Amplitude of lateral head displacment, Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung der Spermien (μm)
bzw.	beziehungsweise
aufgero	aufgerollt
BCF	Beat Cross Frequency, Frequenz der Kopfbewegung (pro Sekunde)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
ca.	circa
CASA	Computer-assisted-semen-analysis, Computer-assistierte Samenanalyse
cm	Zentimeter
D	Doppelköpfe
DAP	Distance Average Path, durchschnittliche Distanz (μm)
DCL	Distance Curved Line, kurvilineare Distanz (μm)
Def.	Definition
Diss.	Dissertation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DosisVol.	Dosisvolumen
DSL	Distance Straight Line, Geradlinige Distanz (μm)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et al., et alii (Maskulinum), et aliae (Femininum), et alia (Neutrum), „und andere“
g	Gramm
G	Gravitationskonstante, $G = 6,67384(80) \cdot 10^{-11} \text{ m}^3/\text{kg} \cdot \text{s}^2$
GB	Gigabyte
gMot	Gesamtmotilität (%)
GSZ	Gesamtpermienzahl
L	lose Köpfe
LIN	Linearity, Linearität (VSL/VCL)
Max.	Maximum

n.	nicht
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
min.	mindestens
Min.	Minimum
ml	Milliliter
Mio.	Millionen
Mrd.	Milliarden
n	Anzahl der Beobachtungen, Probenanzahl
p	p-Wert
PC	Personal Computer, persönlicher oder privater Computer
pMot	progressive Motilität (%)
R	Riesenköpfe
S	schmale Köpfe
sec.	Sekunde
schleif	schleifenförmig
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SF	Streu faktor
STR	Straightness, Geradlinigkeit, (VSL/VAP)
SZ	Samenzellen
Tab.	Tabelle
TG-Sperma	tiefgefrorenes (kryokonserviertes) Sperma
u.a.	unter anderem
VAP	Velocity Avarage Path, mittlere Geschwindigkeit (µm/Sekunde)
VCL	Velocity Curve Linear, kurvilineare Geschwindigkeit (µm/Sekunde)
VSL	Velocity Straight Line, lineare Geschwindigkeit (µm/Sekunde)
Vol.	Volumen
WOB	Wobble (VAP/VCL)
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
x	Multiplikation
\bar{x}_G	geometrischer Mittelwert
z.B.	zum Beispiel
10 ⁶	Million

1 Einleitung und Fragestellung

In der modernen Pferdezucht hat sich die Besamung zu einem etablierten und standardisierten Verfahren entwickelt. Die Vorteile dieses Verfahrens gegenüber dem Natursprung sind die Verwendung von bestimmten Vatertieren auch über weite Entfernungen, eine Verminderung von Deckinfektionen und Verletzungen der Tiere bzw. des Personals sowie eine Entlastung stark frequentierter Vatertiere durch Portionierung der Ejakulate, wodurch eine höhere Anzahl Stuten von einem Vatertier besamt werden können.

Das Ziel der Tiefgefrierung von Samenzellen besteht in der Erhaltung der Fruchtbarkeit und einer unbegrenzt langen Lagerung des Spermas. Als Nachteil der Tiefgefrierung von Sperma gilt eine im Vergleich zu flüssigkonserviertem Samen deutlich reduzierte Zellvitalität, welche schlechtere Befruchtungsergebnisse nach sich zieht.

Es hat sich in der Praxis etabliert, die Hengste nach Deckruhe mehrmalig im Abstand von jeweils 48 Stunden abzusamen und diese Ejakulate zu verwerfen, bevor ein Ejakulat zur Tiefgefriersamenproduktion verwendet wird. Dieses Vorgehen ist mit einem potentiellen finanziellen Verlust verbunden. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob bereits das erste gewonnene Ejakulat von Deckhengsten nach einer Deckruhe von 60 Tagen für die Herstellung von Tiefgefrierbesamungsportionen geeignet ist. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass zwischen den ersten drei Ejakulaten, die nach Deckruhe entnommen werden, keine qualitativen Unterschiede in der Tiefgefriereignung gefunden werden können.

2 Schrifttum

2.1 Bedeutung der Besamung beim Pferd

2.1.1 Entwicklung und gegenwärtiger Stand der Besamung beim Pferd

Nach einer arabischen Erzählung soll die erste Besamung beim Pferd bereits im Jahre 1322 stattgefunden haben. Der Übermittlung zufolge soll ein arabischer Stammesführer Samen eines Hengstes, der sich im Besitz eines Rivalen befand, entwendet haben, um damit seine eigene Stute zu besamen. Vermutlich wurden aber schon vor Jesu Geburt Samenübertragungen an Pferden und Menschen durch die Araber vorgenommen (BOWEN, 1969). Der erste gesicherte Fall einer Besamung bei einem Säugetier wurde am Ende des 18. Jahrhundert durch den italienischen Priester und Biologen Lazzaro Spallanzani dokumentiert. Spallanzani besamte nach vorheriger manueller Samementnahme eine Hündin, welche nach 62 Tagen Trächtigkeitsdauer drei Welpen zur Welt brachte (CAPANNA, 1999). 1888 stellte der französische Tierarzt Repiquet seine Gedanken zur Besamung bei Pferden und Rindern der Société de Médecine Vétérinaire vor. Er beschrieb diese Biotechnologie als ein hervorragendes Instrument, um die Subfertilität von Pferden und Rindern zu behandeln. Auch können mit diesem Verfahren mehrere Stuten mit nur einem Hengst belegt und Hybride wie z. B. Maultiere produziert werden (RAILLET, 1888). Um die Jahrhundertwende des 19. Jahrhunderts gelang es Professor Sand aus Kopenhagen, die Samementnahme von Hengsten mittels eines speziell entwickelten Kondoms durchzuführen. Dieses wurde vorrangig aus der Harnblase von Schweinen hergestellt. Zusammen mit dem Kollegen Stribolt konnte er mit dem aufgefangenen Spermia in einer Versuchsreihe mit acht Stuten bei vier Tieren eine Trächtigkeit erreichen (SAND, 1903). Die ersten wissenschaftlichen Abhandlungen zum Thema der künstlichen Besamung beim Pferd sind dem russischen Forscher Ilya Ivanoff zu verdanken. Ivanoff gilt als Pionier der künstlichen Besamung beim Pferd und konnte durch seine Forschungen in der Vorkriegszeit des 1. Weltkrieges die Vorzüge dieses Verfahrens gegenüber dem natürlichen Deckakt durch Besamung mehrerer tausend Stuten und daraus resultierenden Trächtigkeitsergebnissen von bis zu neunzig Prozent darlegen (IVANOFF, 1922). Nichts desto trotz wurde die künstliche Besamung hauptsächlich in

der Zucht von landwirtschaftlichen Nutztieren, in erster Linie bei Rindern und Schafen, eingesetzt. So wurde im Jahre 1932 mit dem Buch „Die künstliche Besamung bei Rindern und Schafen“ das gesamte Wissen um dieses Thema einschließlich der neu gewonnenen Erkenntnisse von russischen Autoren zusammengefasst (GÖTZE, 1949). Die Samenübertragung in der Pferdezucht konnte aufgrund des mangelnden wirtschaftlichen und züchterischen Nutzens noch keine Bedeutung erlangen. In Deutschland sind wissenschaftliche Darlegungen zur Pferdebesamung vor allem durch Professor Götze aus Hannover mit dem Werk „Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere“ dargelegt worden (GÖTZE, 1949), der schon 1944 eine Besamungsstation unter Praxisverhältnissen gründete und mit dem Einsatz von Frischsamen im ersten Jahr des Bestehens 118 Stuten besamte und Konzeptionsraten von 41% erzielte (MERKT und KLUG, 1976). Eine weitere Besamungsstation wurde Ende der fünfziger Jahre zur Bekämpfung der Beschälseuche eingerichtet (MERKT und KLUG, 1976). Die künstliche Besamung fand nach dem zweiten Weltkrieg eine weitreichende Anwendung zur Bekämpfung von Deckseuchen (KLUG, 1993a). Die Entwicklung der künstlichen Besamung in der Pferdezucht wurde von den Tierärzten zunächst sehr skeptisch betrachtet (BOLLE, 1949; SAENGER, 1959). Es bestand große Sorge hinsichtlich der anscheinend ausufernden Kosten für Staat und Züchter, welche durch weitere Untersuchungen anfallen sollten (SAENGER, 1959). Auch wurde befürchtet, dass aufgrund fehlender Reizwirkung des Natursprungs das innersekretorische Drüsensystem nicht in Funktion tritt, mit der Zeit erschlafft und schließlich verkümmert. Dadurch wäre die Hormonproduktion, welche essentiell für die Eizellreifung und Einbettung ist, gestört (BOLLE, 1949). Auf der anderen Seite war auch die Züchterschaft zunächst gegen die Einführung der künstlichen Besamung in der Pferdezucht. Viele Züchter glaubten, dass die Fohlen schwach bzw. missgebildet sein könnten und dass sich das Sexualverhalten des Hengstes als auch der Stute ändern könnte. Diese Ängste waren jedoch unbegründet und konnten mit den Erfahrungen aus den hohen Besamungszahlen der Rinderzucht widerlegt werden (MEDL, 1993). Nach dem zweiten Weltkrieg sank die Zahl der besamten Stuten dramatisch ab (AURICH, 2012) und die Pferdezucht im Allgemeinen war rückläufig (MERKT und KLUG, 1976; AEHNELT 1953). 1973 wurde durch die Kooperation des Landgestüts Celle mit der tierärztlichen Hochschule Hannover im Landgestüt versuchsweise eine Besamungsstation gegründet (KLUG et. al., 1977), in welcher

hauptsächlich mit kryokonserviertem Sperma gearbeitet wurde und Trächtigkeitsergebnisse von 40 bis 45 % erzielt wurden (MERKT & KLUG, 1976). Durch die Landgestüte und Privathengsthalter erfolgte bald darauf die Gründung von weiteren Besamungsstationen (AURICH, 2011). In den osteuropäischen Ländern spielte die künstliche Besamung eine untergeordnete Rolle. In der ehemaligen Tschechoslowakei betrug die Rate an künstlich besamten Stuten lediglich 9 % der Gesamtstutenzahl. Ähnlich niedrige Zahlen stammen aus Polen, Ungarn und Jugoslawien, wobei in Jugoslawien das Hauptaugenmerk in der Fohlenproduktion für den menschlichen Verzehr bestand (TISCHNER, 1992).

Mit Wechsel der Bedeutung des Pferdes vom landwirtschaftlichen Nutztier zum Freizeitpartner bzw. für den Pferdesport bestand weltweit wieder mehr Interesse an dieser Biotechnologie, sodass es in vielen Ländern Anfang der neunziger Jahre zum endgültigen Durchbruch der Besamung in der Pferdezucht kam (AURICH, 2012). Sie wird vor allem in der westeuropäischen Pferdezucht flächendeckend eingesetzt. Im nationalen Versand wird überwiegend flüssigkonserviertes Sperma, sogenannter Frischsamen, verwendet. Nur bei entsprechend geeigneter Spermaqualität erfolgt auch ein internationaler Versand als gekühltes, flüssigkonserviertes Sperma. Das Tiefgefriersperma ist aufgrund seiner nahezu unbegrenzt langen Lagerung hauptsächlich für den Export bestimmt (SIEME, 2004).

Mit Einrichtungen von Besamungsstationen, welche im eigentlichem Sinne Stationen zur Entnahme von Samen sind (AURICH, 2011), erfolgte auch die gesetzliche Regelung zum Betrieb dieser Einrichtung auf nationaler und internationaler Ebene. Die ursprünglichen Ziele der Besamung, die Vermeidung der Übertragung von Deckseuchen und bestmögliche Nutzung der Vartiere haben dabei bis heute Bestand. Erst nach Sicherstellung dieser Grundsätze kann sie als Instrument der Züchtung gesehen werden (KLUG, 1993a). MERTENS (2002) sieht den Zweck der Besamung in der Verbesserung der genetischen Population und in der Unabhängigkeit der Zuchtbetriebe von der Hengsthaltung. Die bestmögliche Ausnutzung der Spenderhengste wird durch die reproduktionsbiologische Überwachung durch tierärztliches Fachpersonal gewährleistet, welches z. B. bei abnehmender Qualität der Ejakulate durch Überanstrengung oder Krankheit der Hengste (GÖTZE, 1949; MEDL, 1993) einschreiten würde. Durch entsprechende Portionierung der Ejakulate können eine Vielzahl von Stuten besamt werden (MEDL, 1993; SAND, 1903; PICKETT und

SHINER, 1994). Die tierärztliche, gynäkologische Untersuchung der Empfängerstuten leistet einen weiteren wichtigen Beitrag zur Steigerung der Reproduktionsleistung (GÖTZE, 1949). MERKT (1983) berichtete, dass durch Herbstuntersuchungen von Stuten und Hengsten in der westdeutschen Vollblutzucht die Fruchtbarkeit von anfänglich 54 auf über 70 % gesteigert werden konnte. Entsprechende hygienische Anforderungen an die Spenderhengste, u. a. der ausschließliche Einsatz gesunder Hengste, kein wechselnder Einsatz der Hengste zwischen Natursprung und Besamung sowie vorbeugende Maßnahmen bei der Samenbehandlung durch entsprechende Laborstandards und Aufbereitung sind wesentliche Bestandteile zur Prophylaxe von Reproduktionserkrankungen (KLUG et. al., 1998). Paarungsbedingte Verletzungen von Hengst und Stute bzw. dem betreuendem Personal werden verhindert (GÖTZE, 1949; MEDL, 1993). Der Versand von Samen und der damit wegfallende Transport der Stute ist ein weiterer ökonomischer Vorteil zur Nutzung wertvoller Hengste, die außerhalb des eigenen Zuchtgebietes stationiert sind (AURICH und AURICH, 2006; MEDL, 1993). Durch den Einsatz der Besamung konnten Trächtigkeitsergebnisse erzielt werden, die denen des Natursprungs entsprechen (MERKT und KLUG, 1976) bzw. bei fachgerechter Durchführung deutlich bessere Konzeptionsraten als im Natursprung (PICKETT und SHINER, 1994) erreichen. AEHNELT (1953) berichtete von Trächtigkeitsergebnissen von 75 %.

Zusammenfassend konnte durch die Einführung der Besamung in der Pferdezucht die Fruchtbarkeitsleistung in den vergangenen 20 Jahren deutlich verbessert werden (KLUG und SIEME, 2003). Die Vorurteile zur Besamung (BOLLE, 1949; SAENGER 1959; MEDL 1993) konnten somit widerlegt werden. Als wesentlicher Nachteil der Besamung ist die Gefahr der Einschränkung der genetischen Vielfalt und die damit verbundene Einschränkung der Nutzbarkeit wertvoller Hengste für folgende Generationen zu nennen, um eine Erhöhung des Inzuchtgrades zu vermeiden (MERTENS, 2002). Die Besamung ist in der Warmblut- und Traberzucht Deutschlands sowie den Nachbarländern Belgien, Frankreich und den Niederlanden weitestgehend etabliert (KLUG et. al., 1998). 1985 betrug in Deutschland die Rate der im Natursprung gedeckten Warmblutstuten noch 98,6 %, wohingegen nur 1,4 % durch Besamung belegt wurden. Innerhalb von nur zehn Jahren änderte sich dies, sodass 1995 bereits über 50 % aller Warmblutstuten durch Besamung belegt und nur noch 46 % der Stuten im Natursprung gedeckt worden sind. Dieser Trend setzte sich über die Jahre fort,

sodass es im Jahr 2008 von insgesamt 49810 Warmblutstuten 84 % durch die Besamung mit Frischsperma besamt wurden (Abb. 1). Der Anteil der Besamungen mit kryokonserviertem Sperma lag bei 1,8%. Dadurch wird ersichtlich, dass die Besamung mit Frischsperma oder gekühltem, flüssigkonserviertem Samen die führende Art der instrumentellen Samenübertragung beim Pferd in Deutschland ist. Die Insemination mit kryokonserviertem Sperma stellt im Moment deutschlandweit nur einen geringen Anteil dar (FN, 2017).

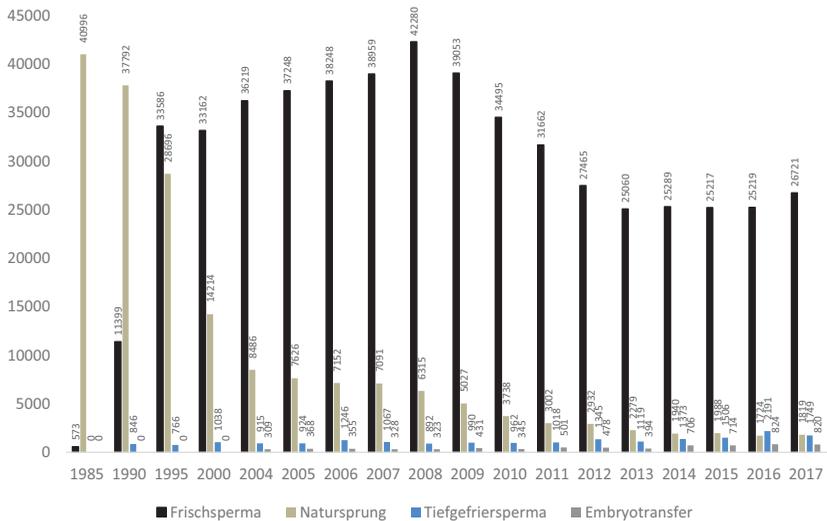


Abb. 1: Entwicklung der Bedeckungsarten in der Warmblutpferdezucht (FN, 2017)

In Frankreich dagegen werden mehr als 20 % der Stuten mit Tiefgefriersperma belegt. Für kleine Populationen ist der Transport von Samen eine wichtige Voraussetzung für die Pferdezucht bzw. zur Erhaltung der Zucht. Dies wird innerhalb der EU durch abgeglichene tierseuchenrechtliche Bestimmung für den innergemeinschaftlichen Handel möglich. Die Vielzahl der EU-Besamungsstation pro Land (Tab. 1) spiegeln dabei den Nutzen der Besamung in der Pferdezucht wieder (AURICH, 2012). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Verwendung der Besamung in vielen europäischen Ländern in Zukunft zunimmt (AURICH und AURICH, 2006).

Tab. 1: Anzahl der EU-zugelassenen Pferdebesamungsstationen in Europa.
 AURICH (2012)

Land	Anzahl der Stationen in verschiedenen Jahren		
	2006	2011	2012
Deutschland	120	139	119
Frankreich	22	30	39
Belgien	12	27	28
Schweden	28	25	26
Niederlande	19	21	21
Spanien	10	21	27
Ungarn	-	21	21
Vereinigtes Königreich	18	21	23
Dänemark	16	15	18
Italien	-	14	16
Österreich	11	9	9
Finnland	3	7	7
Polen	3	6	5
Tschechische Republik	3	5	5
Irland	6	4	5
Estland	1	2	2
Portugal	1	1	2
Slowakei	1	1	1

Weltweit existiert mittlerweile eine große Anzahl von Stationen, welche Samen in die EU importieren dürfen (Tab. 2). Dadurch wird das globale Ausmaß des Geschäfts mit Pferdesamen deutlich. Hierdurch wird jedoch die Gefahr der weltweiten Krankheitsübertragung gesteigert (AURICH, 2012).

Tab. 2: Anzahl der weltweiten zugelassenen Pferdebesamungsstationen für den Import von Samen in die EU (European Commission, 2015)

Land	Anzahl der Stationen
Argentinien	10
Australien	1
Brasilien	1
Island	1
Israel	1
Kanada	14
Marokko	1
Mexiko	1
Saudi-Arabien	1
Ukraine	1
USA	106
Uruguay	1
Vereinigte Arabische Emirate	3

Mittlerweile werden weltweit in allen Verbänden Fohlen anerkannt, welche durch Besamung produziert worden sind. Einzig und allein die englische Vollblutzucht erkennt nur Fohlen an, welche durch den Natursprung entstanden sind (AURICH, 2011). Seit 2001 sind Besamungen mit Tiefgefriersperma in den amerikanischen Verbänden American Quarter Horse Association und American Paint Horse Association akzeptiert (LOOMIS, 2001).

Durch die breite Anwendung der Besamung in der modernen Pferdezucht hat sich auch die Verantwortung der Veterinäre gesteigert. Die steigende Anzahl von Pferdeteräzten, die instrumentellen Samenübertragungen durchführen, macht eine permanente, professionelle Weiterbildung auf diesem Gebiet unerlässlich.

Es ist notwendig, diese Tätigkeit nicht an Techniker unter der Leitung von Tierzuchtwissenschaftlern zu verlieren (AURICH und AURICH, 2006). MERKT (1976) hat die Bedeutung des Tierarztes für die Pferdezucht mit einem fünf-Punkte Plan beschrieben. Dieser weist neben der Untersuchung der Spenderhengste auf Gesundheit und Zuchttauglichkeit der Vatertiere auch auf die Funktionsprüfung der Ovarien (Follikelkontrolle) und der Genitalschleimhaut hin.

2.1.2 Moderne Entwicklung der Besamung

In den vergangenen Jahren konnte die „low dose-insemination“ entwickelt werden (AURICH, 2011; ALLEN, 2005). Diese Technik wird vorwiegend dort eingesetzt, wo mit Fertilitätseinbußen zu rechnen ist (SIEME, 2009). Durch Versamung einer geringen Anzahl an Spermien tiefintraovular, in unmittelbarer Nähe der Eileiterpapille auf der Seite des Ovars mit dem zu besamendem Follikel, werden durch die hysteroskopische Insemination Spermienverluste im Uterus reduziert. Spezielle Besamungspipetten ermöglichen, unter rektaler Kontrolle, ebenfalls eine tiefintraovuläre Insemination in Nähe der Eileiterpapille (AURICH, 2011). Um die Vorteile dieses Verfahrens nutzen zu können, muss die Samendosis jedoch unter 25 Millionen vorwärtsbeweglicher Spermien liegen. Liegt die Dosis über 25 Millionen progressiver Samenzellen hat die hysteroskopische Besamung keinen Vorteil zu der konventionellen Besamung. Daher ist diese Methode für sehr geringe Samenzellkonzentrationen, z. B. bei gesextem Sperma zu empfehlen (SIEME, 2009). Der Einsatz von gesextem Sperma in der Pferdezucht ist jedoch aufgrund der aufwendigen Herstellung mit meist mangelhafter Qualität des Samens, einer nicht unerheblichen Fehlerquote bei der Herstellung der Besamungsportionen sowie den niedrigen Trächtigkeitsraten unbefriedigend und schränkt den Einsatz damit nicht unerheblich ein (AURICH, 2011).

2.2 Anforderungen und Aufbereitung der Ejakulate zur Kryokonservierung

Die Untersuchungen zur Kryokonservierung von Hengstsamen basieren zum großen Teil auf Methoden der Gefrierkonservierung von Bullensperma. Dies konnte aber nicht direkt übernommen werden (VON STERN, 2001). Ein limitierender Faktor für den

Einsatz von Tiefgefriersperma beim Hengst ist die reduzierte Fruchtbarkeit aufgetauter Samenproben von einigen Hengsten (SQUIRES et al., 2004). Mit der Tiefgefrierkonservierung wird die Erhaltung der Fertilität von Samenzellen für eine unbestimmte Zeit ermöglicht (AMANN und PICKETT, 1987), wobei Lagerungszeiten von bis zu 500 Jahren in flüssigem Stickstoff denkbar sind (AURICH, 2011). Um das Befruchtungsvermögen nach Kryokonservierung und sich anschließendem Auftauen zu erhalten, müssen Funktionen wie der Metabolismus, die progressive Motilität, die Unversehrtheit des Akrosoms sowie der Proteine der Plasmamembran, welche eine Bindung an die Eizelle ermöglichen, erhalten bleiben. Sind eine oder mehrere dieser Funktionen durch die Kryokonservierung oder dem Auftauprozess zerstört, ist die Befruchtungsfähigkeit der Samenzellen reduziert oder verloren (AMANN und PICKETT, 1987). Trotz optimierter Protokolle überleben ca. 40–50 % der Samenzellen den Vorgang des Einfrierens nicht (WATSON, 2000). Funktionsschäden betreffen besonders die Zellmembran der Spermien, welche durch die Kryokonservierung einem hohen osmotischen Stress, mit anschließender Schädigung, ausgesetzt ist (BALL und VO, 2001; WATSON, 2000).

2.2.1 Anforderungen an den Nativsamen zur Kryokonservierung

Zur Tiefgefrierkonservierung des Samens sind nicht alle Hengste geeignet (KLUG und SIEME, 2003). So können Hengste, welche unter normalen Bedingungen eine gute Fruchtbarkeit haben, nach dem Einfrieren und Auftauen ihres Spermias auch schlechte Trächtigkeitsergebnisse erzielen (SIEME, 2011a). Die Gründe hierfür sind vielfältig, können aber zum Teil auf eine mangelhafte Selektion der Zuchthengste hinsichtlich der fruchtbarkeitsrelevanten Parameter zurückgeführt werden (SIEME, 2009). Generell sollten die Hengste sexuell ausgeruht sein. Ein sporadisches Einfrieren von z. B. Sporthengsten zwischen Veranstaltungen führt nicht zur Gewinnung qualitativ akzeptabler Samenportionen (KLUG und SIEME, 2003).

TISCHNER (1979) unterteilte anhand der Samengefrierkonservierung die Hengste durch Untersuchung der Motilität, der Überlebenszeit bei 1°C und der Anzahl lebender Samenzellen an aufgetautem Tiefgefriersperma. Für die Tiefgefrierkonservierung sind insgesamt ca. 80 % der Hengste gute bzw. akzeptable Samenspendler. VIDAMENT (2005) konnte in den Jahren 2003-2005 von 344 Hengsten eine Gesamtmotilität von

über 40 % in aufgetauten Samenproben bei 80 % der Samenspender erzielen. Auch konnten 90 % der Ejakulate von 220 Hengsten gut eingefroren werden und lediglich 9 % der Samenspender hatte Sperma, welches sich nicht einfrieren ließ.

Als Hauptkriterium der Gefriereignung von Sperma gilt die progressive Motilität der Spermien in aufgetauten Samenproben. Sie sollte über ≥ 35 % liegen bzw. sollten die Spermien eine Bahngeschwindigkeit von min. 30 μm pro Sekunde haben. Sind diese Werte in über 33 % der Ejakulate eines Hengstes erreicht, gilt er für die Tiefgefrierkonservierung als geeignet (VIDAMENT et al., 1997). Die Mehrzahl der Labore sehen eine Gesamtmotilität von ≥ 35 % in aufgetauten Proben als akzeptabel an (SAMPER und MORRIS, 1998). Dieser Wert wurde auch von SIEME et al. (2001) empfohlen.

LOOMIS und GRAHAM (2008) berichteten, dass ein geeigneter Hengst für die Tiefgefrierkonservierung nach dem Auftauen ≥ 30 % progressive Spermien haben muss, die nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C noch eine Vorwärtsbeweglichkeit von mindestens 25 % aufweisen.

Der Anteil progressiver Spermien vor dem Einfrieren sollte nach LOOMIS et al. (1983) mindestens 40 % betragen, um zufriedenstellende Trächtigkeitsergebnisse mit Tiefgefriersperma zu erzielen.

Nach CRISTANELLI et al. (1985) sollte dieser Wert 50 % progressive Samenzellen betragen.

Da jedoch bisher kein einfacher und schneller Test zur Tiefgefriereignung von Samen entwickelt werden konnte, muss auf Empfehlungen und Erfahrungen zurückgegriffen werden. So sollte die Samendichte der nativen Ejakulate mindestens 200 Millionen Spermien pro Milliliter betragen. Die gesamt progressiven Samenzellen sollten 50 % der Gesamtspermienzahl nicht unterschreiten und es sollten mindestens 70 % formnormaler Samenzellen vorhanden sein (KLUG und SIEME, 2003; SIEME, 2009). Viele Labore empfehlen ähnliche Grundwerte des Nativsamens. Die Mehrzahl der Labore sieht natives Sperma mit einer Gesamtmotilität von über 50 % der Samenzellen, mindestens 60 % formnormaler Spermien und eine Samendichte ≥ 60 Millionen Spermien pro Milliliter als geeignet an (SAMPER und MORRIS, 1998).

Untersuchungen von VIDAMENT et al. (1998) belegen die Eignung des hypoosmotischen Schwelltests zur Beurteilung der Tiefgefriereignung durch Korrelationen mit der Gesamtmotilität nach Kryokonservierung und Auftauprozess.

Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um die Aussagekraft der Ergebnisse hinsichtlich der Tiefgefriereignung zu unterstützen.

2.2.2 Aufbereitung der nativen Ejakulate

Für die Kryokonservierung von Hengstspenna sind einige grundlegende Schritte notwendig (BRINSKO und VARNER, 1992). Das gewonnene Ejakulat wird durch Zentrifugation mit einem geeigneten Verdünnern konzentriert und vom Seminalplasma getrennt. Das nach der Zentrifugation entstandene Samenpellet wird mit dem für die Kryokonservierung vorgesehenen Verdünnern resuspendiert und auf die vorher festgelegte Samenzellkonzentration verdünnt. Die sich anschließende Abkühlung des Samens kann je nach Verfahren vor oder nach der Abpackung erfolgen. Nach Abkühlung auf 5°C folgt die Tiefgefrierung und Lagerung der Samenportionen in flüssigem Stickstoff bei -196°C (BRINSKO und VARNER, 1992; KLUG und SIEME, 2003). Die Auftaumethode sollte dem zuvor durchgeführten Einfrierprotokoll entsprechen (GRAHAM, 1996). Die aufgetauten Samenportionen sollten unmittelbar nach dem Auftauen versamt werden (BRINSKO und VARNER, 1992). Dabei sollte ein Zeitfenster von 24 Stunden vor der Ovulation bis 12 Stunden nach der Ovulation eingehalten werden, um befriedigende Trächtigkeitsergebnisse zu erzielen (KLOPPE et al., 1988). Bei Verwendung einer einzelnen Samenportion sollte die Besamung sechs bis acht Stunden post ovulationem erfolgen (SIEME, 2009).

2.2.3 Einfluss des Seminalplasmas und der Zentrifugation auf die Samenqualität

Die Zentrifugation, als erster Schritt der Aufbereitung der Ejakulate, wird angewendet, um schädliche Einflüsse des Seminalplasmas auf die Samenqualität zu minimieren und um die Spermienkonzentration zu erhöhen (BRINSKO und VARNER, 1992; SIEME, 2011b). Jedoch ist diese Methode in der Aufbereitung von Hengstspenna kontrovers diskutiert. Sie wird nach derzeitigem Stand des Wissens als unverzichtbar bei der Aufbereitung der Ejakulate zur Kryokonservierung gesehen (SIEME, 2009). Das Seminalplasma besitzt neben schützenden auch schädigende Einflüsse, die je

nach Tierart unterschiedlich ausgeprägt sein können (RODGER, 1975). Nach MOORE et al. (2005) hat das Seminalplasma, unter der Voraussetzung, dass das Sperma unmittelbar nach der Gewinnung eingefroren wird, nur geringe negative bzw. positive Einflüsse auf die Motilität bzw. Viabilität. Die Zentrifugation eignet sich, um die schädlichen Einflüsse des Seminalplasmas auf das Ejakulat zu vermindern (BRINSKO und VARNER, 1992). Bereits 1950 wurden von SMITH und POLGE vermutet, dass durch die Entfernung des Seminalplasmas die Überlebenszeit von Spermien verlängert werden kann. PICKETT et al. (1975a) konnten durch Abzentrifugieren des Seminalplasmas eine Verlängerung der Lagerungsdauer erzielen. Dem Seminalplasma wird zudem ein hemmender Einfluss auf die Motilität der Hengst spermien zugeschrieben (MARDEN und WERTHESEN, 1956). Dabei spielt die Konzentration des Seminalplasma im Tiefgefriersamen die zentrale Rolle. Eine Konzentration von 10 % Seminalplasma in der Endverdünnung hat förderliche Effekte auf die Motilität, sowohl vor als auch nach der Kryokonservierung. Wird die Konzentration jedoch auf zwei Prozent vermindert bzw. 20 % erhöht, resultiert daraus eine deutlich verminderte Motilität. Schlussfolgernd ist die Konzentration des Seminalplasmas ausschlaggebend, um maximale Motilitätsergebnisse zu erzielen (PICKETT et al., 1975a). Der Spermienverlust während der Zentrifugation ist ein deutlicher Nachteil dieses Verfahrens, gerade bei Hengsten, die nur eine geringe Anzahl an Spermien produzieren (SIEME, 2011b). Ein weiterer Nachteil ist zudem, dass Beimengungen und andere korpuskuläre Anteile im Ejakulat durch die Zentrifugation ebenfalls konzentriert werden und nur noch in geringem Maße von der Samenzellfraktion getrennt werden können (SIEME et al., 1998). Die Membranschäden der Samenzellen, die durch die Zentrifugation auftreten, sind ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens (WATSON, 2000).

WEISS (2004) untersuchte drei verschiedene Zentrifugationsverfahren, die sich in der Beschleunigung und der Dauer der Zentrifugation unterschieden. Sowohl der Spermienverlust als auch die Membranintegrität wurden von der jeweiligen Methode deutlich beeinflusst. Wird die Beschleunigung erhöht, die Dauer aber verringert, so ist der Spermienverlust erhöht. Daraus ist ersichtlich, dass bei einer geringen Zentrifugationsdauer die Beschleunigung erhöht werden muss, um den Spermienverlust gering zu halten. Ihrer Empfehlung nach sollte Pferdesperma mit 600 x G für die Dauer von 10 Minuten zentrifugiert werden, um den geringsten

Spermienverlust und somit bestmögliche Qualität zu erhalten. Die meisten Labore, in denen Tiefgefriersperma hergestellt wird, verwenden eine zehnmünütige Zentrifugation bei 600 x G bis 700 x G (SAMPER und MORRIS, 1998). Andere Autoren empfehlen eine Varianz bei der Zentrifugationsstärke von 400 x G bis 600 x G und eine Dauer von acht bis zwölf Minuten (BADER und SIEME, 2007).

Um den Verlust an Spermien bei der Zentrifugation weitgehend zu minimieren, sind Weiterentwicklungen dieses Verfahrens untersucht worden.

Die Kissenzentrifugation ist besonders geeignet, um mit hohen Zentrifugationskräften zu arbeiten und um die Rückgewinnungsrate zu erhöhen. Aufgrund einer kissenähnlichen Flüssigkeit, auf der die Spermien während der Zentrifugation schwimmen, wird der Schaden an den Samenzellen reduziert (MAKLER et al., 1984). Es wird über Rückgewinnungsraten von über 90 % berichtet (BADER und SIEME, 2007). ECOT et al. (2005) konnten durch das Kissenzentrifugationsverfahren eine Rückgewinnungsrate von 100 % erzielen. Beim Vergleich mit dem standardisierten Zentrifugationsverfahren konnten sie keine Unterschiede hinsichtlich der Motilität feststellen.

Ein anderes Verfahren, um das Seminalplasma möglichst schonend von der Spermienfraktion zu trennen, ist die Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei kommt es aufgrund von Dichte und Eigenmotilität der Spermien zu einer Sedimentation der Spermien (GORUS und PIPELEERS, 1981). Das am häufigsten verwendete Dichtegradientenmaterial ist Percoll. Dabei handelt es sich um ein mit Polyvinylpyrrolidon umhülltes polymerisiertes Kieselsäuregel. Bei der Herstellung einer Suspension von Percoll mit einem partikelreichen Medium stellt sich nach Veränderung der Gravität ein Dichtegradient ein, dessen Schichtung getrennt isoliert werden kann. Diese Art der Zentrifugation kann mit kontinuierlichen Gradienten, bei einer bestimmten Konzentration des Mediums, und mit diskontinuierlichen Gradienten, wenn die Konzentration des Mediums variiert, durchgeführt werden (SIEME et al., 1998). WALTER (1992) konnte mit diesem Verfahren unter Verwendung von Percoll eine Rückgewinnungsrate von 50-63 % erreichen. Der Prozentsatz lebender Spermien erhöhte sich deutlich. Jedoch neigten die Spermien vermehrt zu Agglutination. Die Verlustraten sind jedoch, verglichen mit dem Kissenzentrifugationsverfahren, schlechter, sodass es zurzeit noch nicht praktisch einsetzbar ist (BADER u. SIEME, 2007). Die Qualität des Hengstspermas kann im Zuge der Zentrifugation durch die

Kombination aus Gravitationskraft und Zentrifugationskraft beeinflusst werden (PICKETT et al., 1975a). Zusätzlich ist jedoch ein geeigneter Verdünner vor der Zentrifugation hinzuzufügen, um nach dem Auftauen verbesserte Motilitätswerte zu erzielen (MARTIN et al., 1979). Eine Zentrifugation ohne Vorverdünner geht mit einem Verlust der Motilität einher (BADER, 1968). Es wird generell eine Verdünnung von 1:1 oder besser eine Verdünnung des Nativsamens auf 50 Millionen Samenzellen pro Milliliter empfohlen (KLUG und SIEME, 2003; BADER und SIEME, 2007). Bei der Wahl des Zentrifugationsverdünners sowie Dauer und Zentrifugationskraft sind die individuellen Bedürfnisse des Hengstes zu beachten, da in der Trennung von Seminalplasma und Spermien erhebliche Unterschiede unter den Hengsten bestehen. Es sollte für jeden Hengst die günstigste Aufbereitungsform ermittelt werden (BADER und SIEME, 2007).

2.2.4 Tiefgefrierverdünner

Nach der Zentrifugation wird das entstandene Samenpellet mit dem vorgesehenen Verdünner für die Kryokonservierung verdünnt und die gewünschte Samenzellkonzentration eingestellt. Hinsichtlich des verwendeten Verdünners bzw. dessen Zusammensetzung gibt es große Unterschiede.

Tiefgefrierverdünner müssen eine Vielzahl an Komponenten enthalten. Dazu zählen Energiequellen (Zucker), Lipoproteine (z. B. Milch, Eigelb oder eine Kombination aus beiden), die den Spermien Schutz bei der Abkühlung verschaffen, Antibiotika, um bakterielles Wachstum zu verhindern, Puffer zur Ausbalancierung des pH-Wertes und osmotischen Druckes sowie ein Kryoprotektivum (SIEME, 2011b). Die Kryoprotektiva werden in penetrierende (z. B. Glycerol, Zuckeralkohole, DMSO) und nicht penetrierende (z. B. Zucker, Aminosäuren, Proteine) unterschieden (SIEME, 2009).

Die Zusammensetzung der Verdünner mit diesen Komponenten variiert (AMANN und PICKETT, 1987), wobei die Zusammensetzung von Puffersubstanzen und Kryoprotektivum von entscheidender Bedeutung für die Qualität des Samens ist (SIEME, 2009).

2.2.5 Kryoprotektiva

Mit Entdeckung des Glycerins ist es erst möglich geworden, tierische Zellen extrem tiefen Temperaturen auszusetzen. Diese Wirkung wurde nach Zugabe zu Geflügelsperma entdeckt, womit eine erstmalige Kryokonservierung von tierischem Sperma gelang (SMITH und POLGE, 1950). Es gehört zu den penetrierenden Kryoprotektiva und hat sowohl extra- als auch intrazelluläre Wirkungen (AMANN und PICKETT, 1987). Eine Glycerinkonzentration von 2 % ist nach BURNS und REASNER (1995) am besten geeignet, um eine maximale kryoprotektive Wirkung mit minimalen Schäden der Hengstsamen zu erhalten.

Der Einsatz von DMSO scheint im Vergleich zu Glycerin bei manchen Hengsten zu besseren Ergebnissen hinsichtlich Motilität, Akrosomenintegrität sowie Chromatinqualität zu führen (METCALF et al., 2008). SQUIRES et al. (2004) untersuchten die Anwendung alternativer Kryoprotektiva zur Tiefgefrierung von Hengstspemien. Sie verglichen Acetamid, Methyl-acetamid, Formamid, Methyl-formamid und Dimethyl-formamid mit dem standardmäßig eingesetzten Glycerin anhand der Gesamt- und progressiven Motilität der Spermien in aufgetauten Samenproben. Der Einsatz von Acetamid, Formamid und Methyl-formamid führte zu deutlich schlechteren Auftaumotilitäten im Vergleich zu Methyl-formamid und Dimethyl-formamid, die ähnlich effektiv wie Glycerin zu sein scheinen.

Neben dem Glycerin ist Eidotter von hoher Bedeutung als Bestandteil eines Tiefgefrierverdünners. Es scheinen synergistische Effekte mit Glycerin zu existieren, die zu einer Stabilisierung der Plasmamembran führen. Ähnliche synergistische Effekte scheinen synthetisch hergestellte Liposomen zu besitzen (SIEME, 2009).

2.2.6 Einfluss der Samenzellkonzentration auf die Fertilität und Motilität

Nach Verdünnung mit einem geeigneten Tiefgefrierverdünner spielt die Spermienkonzentration pro Besamungsdosis eine entscheidende Rolle, um optimale Konzeptionsraten zu erzielen.

Ein Zusammenhang zwischen der Samenzellkonzentration kryokonserviertem Spermas und der Abfohrate konnte von PACE und SULLIVAN (1975) gezeigt werden. Sie konnten nachweisen, dass durch eine Erhöhung von 40 auf 80 Millionen

motiler Spermien ein deutlicher Anstieg der Trächtigkeitsraten zu erreichen war. Eine weitere Steigerung auf 1,6 Mrd. motiler Samenzellen hatte jedoch keine weiteren förderlichen Effekte. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine bestimmte Konzentration Samenzellen vorhanden sein muss, um bestmögliche Konzeptionsraten zu erhalten. Eine weitere Steigerung der Konzentration erweist sich nur bis zu einer bestimmten Konzentration als förderlich.

Diese Ergebnisse konnten LEIPOLD et al. (1998) bestätigen. Sie konnten durch eine Erhöhung von etwa 320 Mio. motiler Samenzellen auf 800 Mio. beweglicher Spermien keine verbesserten Trächtigkeitsergebnisse erzielen. Sie vermuteten, dass eine Erhöhung über ein Konzentration von 320×10^6 Spermien pro Besamungsdosis zu keinen verbesserten Konzeptionsraten führt und hielten daher eine Samenzellkonzentration von 320 Mio. pro Besamungsdosis für ausreichend.

SIEME et al. (2001) haben beim Einsatz von Tiefgefriersamen eine Spermiedosis von 800×10^6 Samenzellen mit einer Auftaumotilität von $\geq 35\%$ empfohlen.

Bei der Wahl der Verpackungsform müssen qualitätsorientierte Faktoren als auch die Praxistauglichkeit berücksichtigt werden. Für die Kryokonservierung eignen sich Verpackungen, die eine große Oberfläche mit kleinen Volumina besitzen. Dadurch wird ein homogenes Einfrieren und Auftauen ermöglicht (SIEME, 2009). Als erste Verpackungsform für kryokonserviertes Hengstsperma wurden Glasampullen genutzt. Nach einer Lagerung von 30 Tagen bei -79°C und anschließender Insemination wurde das erste Fohlen nach Besamung durch Nutzung von kryokonserviertem Sperma produziert (BARKER und GANDIER, 1957). Der Einsatz von Pellets zur Konfektionierung von Hengstsperma wurde durch MERKT und KRAUSE (1966) durchgeführt. Sie konnten jeweils 0,1 ml verdünntes Hengstsperma auf diese Weise einfrieren. Die Vorwärtmotilität hatte sich, im Vergleich zum Nativsperma, um lediglich 10 % reduziert.

Das Makrotüb®-Verfahren wurde von MARTIN und KLUG (1979) für den Einsatz bei Hengstsperma erprobt. Diese Verpackungsform überzeugte hinsichtlich Praktikabilität und Hygiene gegenüber dem Pelletverfahren. Die Besamungsdosen konnten gut identifiziert und durch beidseitigen Verschluss mit einer Stahlkugel verschlossen werden. Das zu verpackende Volumen betrug 4 ml. Im Gegensatz zum Pelletverfahren waren die Auftauraten um 10 % verbessert worden. Als nachteilig sehen die Autoren, dass durch die Größe der Makrotübs die Lagerkapazitäten entsprechend erweitert

werden müssten. Untersuchungen von KNEIßL (1993) zum Vergleich unterschiedlicher Konfektionierungsformen erbrachten die besten Ergebnisse mit 0,5 ml-Pailletten im Vergleich zu Makrotüb (5 ml), Flachtüb (5 ml) und 0,25 ml-Pailletten. Der Einfriervorgang war computergestützt und erbrachte die besten Auftaumotilitäten. CROCKETT et al. (2001) konnten dagegen keine Unterschiede der Auftaumotilität von 0,5ml- im Vergleich zu 2,5ml-Pailletten feststellen. Mittlerweile wird Hengstesperma weltweit in 0,5ml-Pailletten eingefroren (KLUG und SIEME, 2003; SIEME, 2009).

2.2.7 Einfriervorgang

Der Erfolg der Kryokonservierung ist neben den aufbereitenden Schritten der Samenzellen wesentlich vom eigentlichen Tiefgefriervorgang abhängig.

Zum Einfrieren verwendeten MARTIN und KLUG (1979) Makrotübs®, die horizontal auf einem Rost ca. zwei Zentimeter in einer Styroporbox über dem flüssigen Stickstoff für 20 Minuten gelagert wurden. HEITLAND et al. (1996) untersuchten eine fünfminütige, horizontale Lagerung von 0,5 ml Pailletten über einem Stickstoffspiegel von 2,5–5 cm mit anschließender Lagerung in der flüssigen Stickstoffphase. Die Auftaumotilitäten waren, verglichen mit anderen Abständen der Pailletten zum Stickstoffspiegel, die besten. Die Abkühlrate der Pailletten ist vom Abstand zur flüssigen Stickstoffphase sowie der Lagerungszeit abhängig. Bei einem Abstand von 2,5–5 cm werden die Pailletten mit ca. 60°C/min abgekühlt. Dennoch sollten sie für mindestens 20 Minuten im Stickstoffdampf gelagert werden (SIEME, 2009).

Die Tiefgefrierung mit computergestützten Systemen wurde erstmals Mitte der 80er Jahre durchgeführt. Hierbei wurde das Gefriergut, ähnlich wie bei der Tiefgefrierung in der Styroporbox, auf einem Metallrost horizontal gelagert. Der flüssige Stickstoff wurde aus einem Druckbehälter in die Gefrierkammer geleitet und durch einen Turbinenventilator zerstäubt. Der Einfriervorgang verläuft als Form eines ungesteuerten und inhomogenen Massenseedings. Das Gefriergut wird, nach Erreichen der Endtemperatur, in flüssigem Stickstoff gelagert (SIEME, 2009).

COCHRAN et al. (1984) untersuchten die Kühlraten bei Verwendung einer Styroporbox im Vergleich zu einem Einfrierautomaten im Hinblick auf die progressiven Auftaumotilitäten der Samenproben. Sie konnten keinen Unterschied der

Auftaumotilitäten feststellen. CRISTANELLI et al. (1985) konnten ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich der progressiv beweglichen Samenzellen in aufgetauten Proben feststellen.

Untersuchungen von DELIUS (1985) ergaben, dass eine schnelle Einfriergeschwindigkeit zu besseren Motilitätswerten im aufgetauten Samen führte. Dabei wurde festgestellt, dass die kontrollierte, schnelle Kryokonservierung mit Hilfe eines Einfrierautomaten ablaufen sollte, da die ungesteuerte Gefrierung die optimale Einfriergeschwindigkeit übersteigt. Diese Ergebnisse konnten von RÖBBELEN (1993) bestätigt werden. Die Autorin hat eine schnelle Einfriergeschwindigkeit von 25°C/min gegenüber einer langsameren Tiefgefrierung mit 5°C/min empfohlen, da diese zu besseren Auftauresultaten führte.

Die direktionale Gefrierung ist eine Kühlung biologischem Materials, welche mit zuvor einstellbarer Geschwindigkeit abläuft. Die Einfriergeschwindigkeit und Art der Kryokonservierung sind dem konventionellen Tiefgefrierautomaten überlegen. Der Einfriervorgang verläuft im Gegensatz zum Tiefgefrierautomaten gesteuert und partiell fortschreitend. Es werden anstatt Pailletten Glasröhrchen, sogenannte HollowTubes®, mit einem Volumen von ca. 10 ml verwendet (SIEME, 2009).

ZIRKLER (2005) untersuchte vergleichend die Kryokonservierung von Hengstsperma mittels direktonaler Gefrierung und konventioneller Gefrierung. Bei Ersterem wurden HollowTubes®, bei der konventionellen Gefrierung 0,5ml-Pailletten verwendet. Die Auftauqualität der beiden Konfektionierungsformen haben sich hinsichtlich progressiv motiler Samenzellen, der kurvilinearen Geschwindigkeit, und der mittleren Geschwindigkeit der Samenzellen nicht signifikant voneinander unterschieden.

2.3 Vorbereitung der Deckhengste auf die Samengewinnung zur Kryokonservierung

Grundsätzlich ist zwischen der Vorbereitung der Deckhengste zur Kryokonservierung und Vorbereitung der Deckhengste nach längerer Sexualkarenz auf die Kryokonservierung zu unterscheiden.

Für den Zuchteinsatz von Hengsten sollten nur klinisch und erblich gesunde Vatertiere verwendet werden. Der Geschlechtsorgane müssen frei von erblichen, klinischen und mikrobiologischen Befunden sein. Die Begattungs- sowie Befruchtungsfähigkeit

müssen vorhanden sein (MERKT und KLUG, 1989; KLUG, 2002). Die Hengste werden in der Zuchtsaison hauptsächlich im Frischspermaeinsatz bzw. Natursprung eingesetzt. Aus diesem Grund wird die Produktion von Tiefgefriersperma meist in die Nebensaison (Herbst und Winter) verlegt. Der optimale Zeitraum für die Kryokonservierung wird kontrovers diskutiert (SIEME, 2009; SIEME, 2011a). Untersuchungen von JOHNSON (1991) belegen, dass die tägliche Spermienproduktion in der Zuchtsaison (Mai bis Juli) um 84 % höher ist als außerhalb der Zuchtsaison (November bis Januar). Ähnliche saisonale Einflüsse konnten von JANETT et al. (2003) bestätigt werden. Jedoch waren bei ihren Untersuchungen die Spermienkonzentration in den Sommer- und Frühlingsmonaten geringer, als die Konzentration im Herbst oder Winter. Auffallend war zudem, dass die Überlebensfähigkeit der Spermien in den Sommermonaten, verglichen mit den anderen Jahreszeiten, deutlich niedriger war. In der Nebensaison (September bis Februar) können jedoch signifikant mehr morphologisch geschädigte Spermien festgestellt werden als in der Zuchtsaison (März bis August) (VAN DER HOLST, 1975). BLOTTNER et al. (2001) untersuchten den saisonalen Einfluss an jeweils 24 Ejakulaten von 4 Hengsten im Mai und Dezember. Dabei stellten sie fest, dass Ejakulate, welche im Mai kryokonserviert wurden, mehr morphologisch geschädigte Spermien aufwiesen als solche, die im Dezember tiefgefroren wurden. Dies konnte von JANETT et al. (2003) bestätigt werden. Hinsichtlich der Motilität aufgetauter Samenproben waren die Ergebnisse kryokonserviertem Spermas im Dezember besser als im Mai (BLOTTNER et al., 2001). Ähnliche Ergebnisse konnten auch JANETT et al. (2003) aufzeigen. Die Motilität von aufgetautem Tiefgefriersperma war im Herbst und Winter verglichen zum Frühling und Sommer signifikant besser. Untersuchungen von MAGISTRINI et al. (1987) belegen ebenfalls bessere Auftaumotilitäten bei im Winter tiefgefrorenem Sperma. SIEME (2011a) beschreibt, dass die Hengste hinsichtlich der Auftaumotilität am besten in den Herbst- und Wintermonaten zur Tiefgefrierspermaproduktion genutzt werden sollten. Saisonale Einflüsse auf die Spermaqualität können aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu Frisch- oder flüssigkonserviertem, gekühltem Sperma, welches überwiegend im Inland versendet wird (SIEME, 2004), wird kryokonserviertes Sperma hauptsächlich für den Export produziert (SIEME, 2009; SIEME, 2011a). Dementsprechend müssen die Spenderhengste vor der Gewinnung nach den

jeweiligen gesetzlichen Bestimmungen der Empfängerländer untersucht und vorbereitet werden (KLUG und SIEME, 2003; SIEME, 2011a). Voraussetzung für eine erfolgreiche Kryokonservierung ist die Gewinnung von qualitativ gutem Sperma als Ausgangsmaterial (KLUG et al., 1977). Daher sollten nur spermatologisch ausgeruhte Spenderhengste für die Produktion von Tiefgefriersperma verwendet werden (KLUG und SIEME, 2003). Gelegentlich durchgeführte Einfrierprozesse führen zu keinem qualitativ ausreichendem Gefriergut und sind daher nicht zu empfehlen (KLUG und SIEME, 2003; SIEME 2004; SIEME, 2009; SIEME, 2011a). Nach Expertenmeinung von KLUG und SIEME (2003) sowie SIEME (2009) sollten die Nativejakulate mindestens 200 Millionen Samenzellen pro Milliliter, eine Gesamtmotilität von nicht weniger als 50 % und mindestens 70 % formnormaler Spermien enthalten. Da bisher jedoch keine Untersuchungen zur Präparation der Hengste für die Erhaltung von tiefgefrierfähigen Ejakulaten bekannt sind (KLUG et al., 1977), ist es nicht ersichtlich auf welchen Untersuchungen diese Primärdaten beruhen.

Für Hengste mit einer längeren Sexualkarenz sollte jedoch eine dem Samenzellbildungsvermögen entsprechende Depletionsphase (Def.: Verarmung bzw. Entleerung von körpereigenen Stoffen, WIESNER und RIBBECK, 1983) eingehalten werden (SIEME et al., 1998; SIEME, 2011a). Bei Hengsten mit bekannter schlechterer Spermatogenese wird empfohlen, maximal zwei bis drei Samenentnahmen in der Depletionsphase durchzuführen, wohingegen gute Samenbildner mindestens fünfmal abgesamt werden sollten (SIEME et al., 1998). Die Mehrzahl der Labore, die Tiefgefriersperma herstellen, führen eine zwei-bis dreimalige Samenentnahme durch, bevor das erste Ejakulat zur Kryokonservierung genutzt wird (SAMPER und MORRIS, 1998). Die tägliche Samenentnahme zur Kryokonservierung der Ejakulate richtet sich ebenfalls nach dem Samenzellbildungsvermögen der Spenderhengste. Gute Samenzellbildner können häufiger abgesamt und die Ejakulate zur Tiefgefrierung genutzt werden als schlechte Samenzellproduzenten (KLUG und SIEME, 2003). In der Praxis hat sich eine Samenentnahmefrequenz von 48 Stunden bewährt (PICKETT et al., 1975b; KLUG und SIEME, 2003; SIEME, 2009; SIEME, 2011a). Die Samenzellkonzentration der Ejakulate ist bei dem 48-Stunden-Intervall höher als bei der täglichen Samenentnahme. Jedoch konnte durch die tägliche Samenentnahme die Anzahl an Spermien mit intaktem Akrosom gesteigert werden (MAGISTRINI et al., 1987). Untersuchungen von SIEME et al. (2004) zeigten ebenfalls, dass die Ejakulate,

welche im 48-Stunden-Intervall gewonnen wurden, eine höhere Samenzellkonzentration aufwiesen als solche, die täglich entnommen wurden. Der Anteil progressiver, lebender Samenzellen war bei dem 48-Stunden-Intervall, verglichen zur täglichen Samenentnahme, höher. Die gleichen Ergebnisse konnten bei aufgetautem Tiefgefriersperma festgestellt werden. Dagegen konnten PICKETT et al. (1975b) keine signifikanten Unterschiede der Samenmotilität bei hoher Entnahmefrequenz im Gegensatz zu einer niedrigen Entnahmefrequenz feststellen. Die größten Variationen der Samenqualität sind hauptsächlich der Variabilität der Hengste geschuldet (MAGISTRINI et al., 1987). Gesicherte Information über die optimale Samenentnahmefrequenz zur Steigerung der Fruchtbarkeit sind bisher jedoch nicht vorhanden (SIEME et al., 2002).

2.4 Konstanz von spermatologischen Parameter bei wiederholter Samenentnahme

Die Gewinnung eines qualitativ guten Samens ist das Ziel einer modernen Hengsthaltung (SIEME, 2009). Dabei sind die equinen Ejakulate durch besondere Variabilität von bedeutsamen Merkmalen gekennzeichnet. So ist auch in normospermen Ejakulaten stets ein Anteil pathomorphologischer wie auch funktionsveränderter Samenzellen vorhanden. Die Spermienpopulation ist somit keineswegs einheitlich. Dabei kann die Samenzellkonzentration eines Ejakulates durch präejakulatorische Maßnahmen, wie z. B. die Einhaltung einer dem Hengst adäquaten Depletionsphase nach Sexualkarenz, beeinflusst werden (SIEME et al., 1998). Die Samenentnahmefrequenz richtet sich nach dem individuellen Samenzellbildungsvermögen (SIEME, 2009; KLUG und SIEME, 2003). Die Spermaqualität hängt also direkt mit der Samenentnahmefrequenz bzw. dem Samenentnahmeintervall zusammen (LEIDING, 2007; WABERSKI und WEITZE, 2007). In der Praxis hat sich ein Samenentnahmeintervall von 48 Stunden bewährt (PICKETT et al., 1975b; KLUG und SIEME, 2003; SIEME, 2009; SIEME, 2011a). Untersuchungen von MAGISTRINI et al., (1987) belegten, dass die spermatologischen Parameter durch das Samenentnahmeintervall zu beeinflussen sind. Hengste, welchen täglich Samen entnommen wurden, hatten ein deutlich geringeres Volumen (27,2 ml gegenüber 31,6 ml), Spermienkonzentration (133×10^6 gegenüber 209×10^6)

und somit eine geringere Gesamtspermienzahl als Hengste, welche im 48-Stunden Rhythmus untersucht wurden. Durch die tägliche Samenentnahme wurde die Gesamtspermienzahl um ca. 44 % reduziert. Die Gesamtmotilität der Samenzellen ist jedoch bei täglicher Samenentnahme, verglichen zum 48-Stunden-Intervall, höher. Nach der Kryokonservierung und dem Auftauen der Besamungsportionen konnten MAGISTRINI et al. (1987) jedoch keine Unterschiede der Gesamtmotilität der unterschiedlichen Samenentnahmeintervalle feststellen. Durch eine hohe Samenentnahmefrequenz lässt sich der Anteil lebender sowie lebender, formnormaler Samenzellen in aufgetauten Samenproben steigern.

Bei Untersuchungen von SIEME et al. (2004) wurden 4 Hengste zum einen im 24-Stunden-Rhythmus abgesamt und untersucht, zum anderen im 48-Stunden-Intervall mit einer zweimaligen Samenentnahme einer Stunde nach der ersten Absamung. Das native Sperma wurde nach der Untersuchung aufbereitet und als Frisch- bzw. Tiefgefriersamen gelagert und anschließend erneut untersucht. Bei den Nativejakulaten waren sowohl das Gesamtvolumen, die Spermienkonzentration und die Gesamtspermienzahl bei der täglichen Samenentnahme geringer als bei der Untersuchung des Erstejakulates des 48-Stunden-Intervalls, jedoch höher als im Zweitejakulat des 48-Intervalls. Die progressive Motilität der Samenzellen war im 48-Stunden-Rhythmus aber höher ($67,0 \pm 14,5$ %) als bei der täglichen Samenentnahme ($64,6 \pm 15,4$ %) und wurde im Zweitejakulat des 48-Stunden-Rhythmus sogar noch leicht verbessert ($67,6 \pm 13,7$ %). Dies ist auch in aufgetauten Samenproben der Fall. Bei täglicher Samenentnahme war die progressive Motilität aufgetauter Samenproben mit $38,1 \pm 15,4$ % im Vergleich zum Erstejakulat des 48-Stunden-Samenentnahmeintervalls ($43,3 \pm 21,2$ %) und zum Zweitejakulat ($38,9 \pm 18,9$ %) am geringsten. Ähnlich verhält es sich mit dem Anteil lebender Spermien im Nativsamen bzw. bei aufgetauten Besamungsportionen. Im Nativsamen betrug der Anteil lebender Spermien bei täglicher Samenentnahme $84,1 \pm 6,7$ %. Im Erstejakulat bei 48-stündiger Samenentnahme betrug dieser Anteil $86,0 \pm 6,6$ %, im Zweitejakulat noch $85,3 \pm 5,9$ %. In aufgetauten Samenportionen bei täglicher Samenentnahme betrug der Anteil lebender Spermien $64,1 \pm 12,7$ %, im Erstejakulat nach 48 Stunden $71,6 \pm 10,4$ % und im Zweitejakulat (eine Stunde nach dem Erstejakulat) $65,3 \pm 12,0$ %. Der Anteil pathomorphologisch veränderter Samenzellen war bei der täglichen Samenentnahme höher ($25,6 \pm 3,6$ %) als bei der Samenentnahme nach 48 Stunden ($21,1 \pm 3,7$ %). Im

Zweitejakulat des 48-Stunden- Intervalls ist dieser Anteil wieder geringgradig gestiegen ($23,6 \pm 2,0 \%$). Sowohl der Anteil an Spermien mit Mittelstück- als auch mit Schwanzpathologien war bei der täglichen Samenentnahme höher. Die Autoren empfehlen daher ein Samenentnahmerhythmus von 48 Stunden bei Hengsten, welche in der künstlichen Besamung eingesetzt werden. PICKETT et al. (1975b) untersuchten ebenfalls den Einfluss der Ejakulationsfrequenz auf spermatologische Parameter. In ihren Untersuchungen wurden die Hengste jeweils einmal, dreimal und sechsmal pro Woche abgesamt. Bei der einmaligen Samenentnahme waren die Werte des Gesamtvolumens, der Samenzellkonzentration und der Gesamtspermienzahl höher als bei dem dreimaligen bzw. sechsmaligen Samenentnahmeintervall. Auch der Anteil progressiv motiler Spermien war, verglichen mit den zuletzt genannten Intervallen, geringgradig höher. Dies ist nach Aussage der Autoren jedoch nicht der Samenentnahmefrequenz sondern der Individualität der Hengste geschuldet. Jedoch war bei dem sechsmaligen Samenentnahmeintervall die Gesamtspermienzahl, welche in der ersten Woche des Untersuchungszeitraums gewonnen werden konnte, trotz niedrigerer Samenzellkonzentration und Gesamtspermienzahl, am höchsten.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch THOMSON et al. (1977). Sie untersuchten eine zweimalige Samenentnahmefrequenz im Ein-Stunden bzw. 24-Stunden-Entnahmeintervall. Sowohl das Volumen, die Spermienkonzentration als auch die Gesamtspermienzahl sind im zweiten Ejakulat der verschiedenen Entnahmeintervalle niedriger als in den Erstejakulaten. Die Motilität der Samenzellen war in den Zweitejakulaten geringgradig besser als in den Erstejakulaten. Ihre Ergebnisse decken sich somit mit denen anderer Autoren (MAGISTRINI et al., 1987; PICKETT et al., 1975 b; SIEME et al., 2004). Bei Untersuchungen von BRINSKO et al. (2004) wurden von zehn Hengsten nach einer Deckruhe von sieben Tagen jeweils drei Ejakulate entnommen, jedoch nur das erste bzw. dritte in die Auswertung einbezogen. Das zweite Ejakulat wurde eine Stunde nach der ersten Absamung entnommen, das dritte 24 Stunden nach der ersten Samenentnahme. Untersucht wurden das Gesamtvolumen, die Spermienkonzentration, die Gesamtspermienzahl und die Motilität, welche durch ein CASA-System zusätzlich in verschiedene Motilitätsparameter aufgeschlüsselt wurde. Der Anteil gesamt motiler Spermien war im Erstejakulat annähernd gleich zum Drittejakulat ($64 \pm 14 \%$ gegenüber $66 \pm 15 \%$).

Jedoch war der Anteil progressiver Spermien im Drittejakulat mit $57 \pm 14 \%$ deutlich höher als bei der ersten Samenentnahme ($51 \pm 14 \%$). Die Durchschnittsgeschwindigkeit (VAP) bzw. lineare Geschwindigkeit (VSL) der Samenzellen war ebenfalls im Drittejakulat erhöht. Der Anteil morphologisch normaler Samenzellen war in beiden Ejakulaten annähernd gleich. Der Anteil an Spermien mit Mittelstückpathologien war jedoch im Erstejakulat höher als im Drittejakulat. Der Anteil an membranintakten Spermien war in beiden Ejakulaten nahezu identisch.

Bei Untersuchungen von PICKETT et al. (1985) wurden 10 Hengste abwechselnd einmal bzw. zweimal im Abstand von 8 Stunden pro Tag abgesamt. Ihre Ergebnisse decken sich weitestgehend mit denen anderer Autoren. So wurde die Gesamtspermienzahl als auch die Gesamtmotilität mit zunehmender Samenentnahme, zweimal pro Tag, geringer als bei einmaliger Samenentnahme pro Tag. In ihren Untersuchungen war die Gesamtmotilität im Zweitejakulat nach 8 Stunden besser als im Erstejakulat.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine mehrmalige, kurz hintereinander erfolgte Samenentnahme zu einer Reduzierung an verfügbaren Samenzellen führt. Dies geht mit einem potentiellen Verlust an Fertilität einher. Die progressive Motilität konnte aber in allen genannten Veröffentlichungen, wenn teilweise auch nur geringgradig, durch eine engmaschige Entnahmefrequenz gesteigert werden. Die Ergebnisse der Lebend-Tot-Untersuchungen differenzieren teilweise voneinander.

3 Material und Methoden

3.1 Hengste

Für die Untersuchungen standen 29 Deckhengste (Mecklenburger Warmblüter n = 6, Hannoveraner n = 6, Hessische Warmblüter n = 5, Oldenburger n = 4, Trakehner n = 2, Holsteiner n = 2, Englisches Vollblut n = 1, Dt. Reitpony n = 1, Welsh-Pony n = 1, Hessisches Kaltblut n = 1) zur Verfügung, die vom 05.10.2010 – 05.11.2010 auf den Besamungsstationen der Landgestüte Redefin, Dillenburg, Prussendorf sowie des Zuchthofes Makowei in Gadebusch abgesamt worden sind. Das Alter der Hengste zum Zeitpunkt der Samengewinnung lag zwischen 4 und 23 Jahren. Die Hengste waren in Einzelboxen untergebracht. Der Gesundheitszustand war klinisch unauffällig.

3.2 Gewinnung der Ejakulate

Die Samengewinnung erfolgte mit der künstlichen Scheide (Modell Hannover) unter Verwendung eines Phantoms. Die künstliche Scheide war mit einem Einmalschlauch (Minitüb®, Tiefenbach) versehen, an dem ein steriles, skaliertes Auffangglas angebracht war, welches auf 37 °C vorgewärmt wurde.

Von jedem Hengst wurden insgesamt drei Ejakulate gewonnen. Dabei wurden die Hengste jeweils an Tag 1, Tag 2 und Tag 4 abgesamt.

3.3 Spermatologische Untersuchung des Nativsamens

Die Samenuntersuchung wurde unmittelbar nach der Gewinnung im Labor vor Ort durchgeführt. Die dazu nötigen Geräte und Materialien wurden dazu jeweils mitgeführt oder waren vor Ort vorhanden.

Die spermatologische Untersuchung des Nativsamens gliederte sich in die makroskopische sowie mikroskopische Untersuchung und eine Lebend-Tot Färbung.

3.3.1 Makroskopische Untersuchung

Der schleimige Anteil des Ejakulates wurde, soweit vorhanden, vor der spermnologischen Untersuchung durch vorsichtiges Dekantieren abgetrennt. Das Volumen wurde anhand des skalierten Auffanggefäßes bestimmt. Makroskopisch wurden weiterhin Farbe, Konsistenz, Beimengungen und Geruch bestimmt. Der pH-Wert wurde durch einen pH-Indikatorstäbchen (Merck Chemicals Germany®, Darmstadt) ermittelt. Die Erfassung der Spermienkonzentration (Spermiendichte) erfolgte mittels einer Photometers (Spermacue, Minitüb®, Tiefenbach). Das Gerät wurde vor den Messungen mit einer Kontrollküvette ($531 \times 10^6 / \text{ml}$) überprüft.

3.3.2 Mikroskopische Untersuchung

Die Gesamtspermienzahl ergab sich durch die Multiplikation von Volumen (ohne Schleimfraktion) des Ejakulates und der Spermienkonzentration. Die Messung der Motilität erfolgte mit einem Phasenkontrastmikroskop (Olympus CH 30, Olympus®, Hamburg) bei 200facher Vergrößerung auf einem 37°C vorgewärmten Objektisch. Der Objektträger sowie das Deckgläschen wurden zuvor auf einer Heizplatte (Modell HT 200, Minitüb®, Tiefenbach) auf 37°C erwärmt. Zur Untersuchung wurden $14 \mu\text{l}$ des Nativspermas verwendet. Es wurden die prozentualen Anteile von vorwärts-, orts- und unbeweglichen Spermien geschätzt.

Anschließend wurde bei jedem Ejakulat ein Supravitaltest mit dem Farbstoff Eosin (Eosin G, 2 % Lösung für Lebend- Tot-Färbung, Minitüb®, Tiefenbach) durchgeführt und 100 Samenzellen ausgewertet. Hierbei wurde ein kleiner Tropfen Nativsperma auf einen zuvor angewärmten Objektträger pipettiert. Dazu wurde ein ca. doppelt so großer Tropfen des Farbstoffes Eosin-Färbelösung auf den gleichen Objektträger verbracht und nach kurzem Durchmischen mit einem Deckgläschen ausgestrichen. Nach anschließender Lufttrocknung erfolgte eine meanderförmige Untersuchung und Auszählung von 100 Zellen bei einer Vergrößerung von 400facher mit einem Phasenkontrastmikroskop (Olympus CH 30, Olympus®, Hamburg).

3.4 Kryokonservierung

Für die Berechnung der Portionierung des Ejakulats wurde folgende Grundgleichung herangezogen, die entsprechend der Berechnung mit 600 Millionen vorwärtsbeweglichen Spermien pro Samenportion Tiefgefriersperma für die weiteren Berechnungen eingesetzt wurde.

$$\text{Anzahl der Samenportionen} = \frac{\text{Gesamtspermienzahl (GSZ)} \times \text{Vorwärtsbewegung (\%)}}{100 \times \text{Dosis Samenzellen}}$$

(KLUG, 1993b; KLUG und SIEME, 2003)

Die Anzahl der Tiefgefriersamenportionen mit 600 Millionen vorwärtsbeweglichen Samenzellen, welche aus einem Ejakulat hergestellt werden könnten, errechnete sich demzufolge aus:

$$600 \text{ Mio. SZ./Samenportion} = \frac{\text{Gesamtspermienzahl (GSZ)} \times \text{Vorwärtsbewegung(\%)}}{100 \times 600 \text{ Samenzellen}}$$

Von dem Ejakulat wurden zwei Portionen Tiefgefriersamen mit 600 Millionen errechneten, progressiven Samenzellen pro Besamungsportion hergestellt. Der Rest des Ejakulates wurde verworfen.

Die Portionen werden auf vier Pailletten (0.5 ml-Midipailletten mit Verschlusskugeln, Minitüb®, Tiefenbach) mit je 150 Millionen Samenzellen pro Pailletten aufgeteilt. Das gesamte Volumen einer hergestellten Besamungsportion (DosisVol.) betrug somit 2 ml Tiefgefriersperma.

Der Vorverdünner und Tiefgefriersamenverdünner wurden bei -18°C gelagert und für die Tiefgefriersamenproduktion in einem Wasserbad (Modell 7 Liter, Memmert ohne Deckel, Minitüb®, Tiefenbach) auf 37°C erwärmt.

Als Vorverdünner wurde ein Zentrifugiermedium für Hengstsaamen (Minitüb®, Tiefenbach) verwendet.

Die Bestandteile, der pH-Wert und die Osmolarität sind im Folgenden aufgeführt:

- Glukose
- Natriumcitrat
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
- Natriumhydrogenkarbonat
- pH-Wert: $6,7 \pm 0,2$
- Osmolarität: 395 ± 10 mosmol/ l

Das Nativsperma für die Kryokonservierung wurde durch einen sterilen Gazefilter von Fremdbestandteilen und grobsinnlichen Kontaminationen gereinigt. Das gefilterte Sperma wurde anschließend entsprechend der Spermienkonzentration mit einem Vorverdünner versetzt und sechs Minuten bei $560 \times G$ in Zentrifugengläsern (Firma Egon Müller®, Nürnberg) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand bis über das Samenpellett mit einer Vakuumpumpe (Modell N86, Minitüb®, Tiefenbach) abgesaugt und mit dem Endverdünner für die Kryokonservierung entsprechend des zuvor berechneten Endvolumens aufgefüllt.

Das zu berechnende Endvolumen ergab sich aus der Gleichung:

Endvolumen nach Verdünnung=Anzahl Samenportionen x Dosis-Volumen
(KLUG, 1993b; KLUG und SIEME, 2003)

Für die Kryokonservierung der Ejakulate wurde der Gent-Verdünner (Minitüb®, Tiefenbach) verwendet. Die Bestandteile, der pH-Wert und die Osmolarität sind im Folgenden aufgeführt:

- Magermilch
- Zucker
- Puffer
- Eigelb
- Destilliertes Wasser
- Gentamicinsulfat (0,1 g/100 ml)
- Glycerol
- pH-Wert: 6,6–6,8
- Osmolarität: 310 – 330 mosmol/l

Das Dosisvolumen setzt sich aus der Anzahl der Pailletten (4 Pailletten pro Portion), sowie dem Volumen der Pailletten (0,5 ml) zusammen.

Das Sperma wurde mittels einer Vakuumpumpe (Modell N 86 KN.18, Minitüb®, Tiefenbach) und einem halbautomatischen Abfüll- und Verschließgerät (Modell MF 0.5, Minitüb®, Tiefenbach) in zuvor gekennzeichnete 0,5 ml-Midipailletten konfektioniert und mit einer Metallkugel (Minitüb®, Tiefenbach) verschlossen. Anschließend erfolgte eine zweistündige Lagerung der abgefüllten Pailletten im Kühlschrank bei + 4° C. Im Anschluss wurden die befüllten Pailletten auf ein Metallrack (Minitüb®, Tiefenbach) verbracht und horizontal über einen flüssigen Stickstoffspiegel (Höhe ca. 2,5–3 cm) in einer verschließbaren Styroporbox in Stickstoffdampf gelagert. Nach einer Wartezeit von 20 Minuten wurden die Pailletten in die flüssige Stickstoffphase verbracht.

3.5 Tiefgefriersamenlagerung und Transport

Die Lagerung und Transport des hergestellten Samens erfolgte in einen dafür vorgesehenen Gefrierbehälter (Modell GT 7, Air Liquid®, Düsseldorf) in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

3.6 Untersuchung des Tiefgefriersamens

Nach Entnahme der jeweiligen Pailletten wurden diese in ein auf 37°C vorgewärmtes Wasserbad verbracht und dort für 30 Sekunden belassen. Nach Abtrocknung der Pailletten wurden diese an der Verschlusskugel geöffnet, ein Tropfen auf einen Objektträger verbracht und mithilfe einer Eosin-Färbung einem Lebend-Tot-Test unterzogen. Die weitere Untersuchung des Spermas erfolgte mit einem CASA- System (Modell SpermVision, Minitüb®, Tiefenbach).

3.6.1 Computer-assistierte Samenanalyse

Die Ermittlung der unterschiedlichen Motilitätsparameter wurde mit einem CASA- System (Computer-assisted semen analysis), Modell SpermVision (Minitüb®,

Tiefenbach) durchgeführt. Mithilfe dieser Untersuchung können die einzelnen Bewegungsparameter objektiv dargestellt werden.

Das System besteht aus den nachfolgend aufgeführten Komponenten:

- digitale Hochgeschwindigkeitskamera schwarz/ weiß, 60 Bilder pro Sekunde
Belichtungszeit bis 1/ 20.000 pro Sekunde
- PC mit Pentium® 4 Prozessor, 1 GB Dualkanal RDRAM, 40 GB
Festplattenspeicher, 19 Zoll Flachbildschirm
- Mikroskop Olympus BX41 (Okular 10 x, Olympus BX41, Fa. Olympus Optical
Co. Ltd, Tokyo, Japan) mit Heiztisch (38 °C)
- Scan Stage, automatisch beheizt, Positionsgenauigkeit +/- 5 µm, Steuergerät
HT 300W

Das Mikroskopbild wurde mit Hilfe des Programms SpermVision Version 3.5.6.2“ (Fa. Minitüb, Tiefenbach) auf dem PC-Monitor dargestellt und ausgewertet. Die Messungen wurden mit Leja-Kammern (20 Mikron, ca. 2µl, Fa. Leja Products B.V.®, Nieuw-Vennep, Niederlande) bei einer Messtemperatur von 38°C durchgeführt.

Die mit der CASA ermittelten Motilitätsparameter sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Ermittelte Motilitätsparameter mit dem CASA-System.

Parameter	Abkürzung und Einheit	Definition
Gesamtmotilität	gMot %	Die Gesamtheit aller sich bewegenden Spermien
Progressive Motilität	pMot %	Die Gesamtheit aller vorwärtsbeweglichen Spermien
Distance average path	DAP µm	Durchschnittliche Wegstrecke
Distance curved line	DCL µm	Gekrümmte Wegstrecke
Distance straight line	DSL µm	Gerade Wegstrecke
Velocity average path	VAP µm / sec	Durchschnittsgeschwindigkeit
Velocity curved line	VCL µm / sec	Kurvuläre Geschwindigkeit
Velocity straight line	VSL µm / sec	Lineare Geschwindigkeit
Linearity	LIN VSL / VCL	Ist ein Schätzwert und gibt die Nähe einer Spermienlaufbahn an einer geraden Linie an
Straightness	STR VSL / VAP	Durchschnittskoeffizient welcher die Linearität des durchschnittlichen Bewegungsablaufes angibt.
Wobble	WOB VAP / VCL	Die Auslenkung des kurvulären Bewegungsablaufes am durchschnittlichen Bewegungsablauf

Fortsetzung Tab. 3: Ermittelte Motilitätsparameter mit dem CASA-System.

Parameter	Abkürzung und Einheit	Definition
Beat cross frequency	BCF Hertz	Anzahl der lateralen Kopfbewegungen pro durchschnittliche Wegstrecke
Amplitude of laterale head displacement	ALH μm	Durchschnittliche Amplitude der lateralen Kopfauslenkung

3.6.2 Morphologische Untersuchung der Samenzellen

Die morphologische Untersuchung erfolgte unmittelbar nach dem Auftauen des Tiefgefriersamens.

Es wurden 200 Samenzellen bei 400facher Vergrößerung untersucht und die folgenden Spermiendefekte prozentual ermittelt:

- Lose Köpfe
- Schmale Köpfe
- Doppelkopf
- Riesenkopf
- Halsbruch
- Plasmatrophen
- Abgeknickte Spermischwänze
- Schleifenförmige Spermischwänze
- Aufgerollte Spermischwänze

3.6.3 Lebend-Tot-Färbung

Von den aufgetauten Ejakulaten wurde ein kleiner Tropfen Tiefgefriersamen auf einen zuvor auf 37°C angewärmten Objektträger verbracht, mit einem ca. doppelt so großen

Tropfen des Lebend-Tot-Farbstoffes Eosin-Farbstoff (2g Eosin B, 3g Natriumcitrat ad. 100ml aqua bidest, Merck Chemicals Germany®, Darmstadt) vermischt und anschließend mit einem Deckgläschen ausgestrichen. Nach Lufttrocknung wurden 200 Samenzellen bei 400facher Vergrößerung ausgewertet und der prozentuale Anteil ungefärbter (lebender) und gefärbter (toter) Samenzellen ermittelt. Die toten Spermien stellen sich aufgrund der Permeabilität der Plasmamembran rötlich da, wohingegen vitale Samenzellen aufgrund intakter Plasmamembran farblos bleiben (WABERSKI und PETRUNKINA, 2007).

3.7 Statistische Auswertung

Folgende Fragen sollten anhand der erhobenen Daten beantwortet werden:

- Unterscheiden sich die erhobenen spermatologischen Parameter zwischen den drei gewonnenen Ejakulaten?
- Sind die spermatologischen Parameter abhängig vom Alter des Hengstes oder dem Samenentnahmezeitpunkt?
- Wird durch eine mehrmalige Samenentnahme bei Hengsten ohne eine Depletionsphase nach Deckruhe die Samenqualität kryokonservierter Samenproben verbessert?

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte überwiegend durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität in Gießen. Die Datenbeschreibung und Auswertung erfolgte mit Microsoft® Excel 2010, dem Statistikprogramm BMDP 8.1 sowie der Software-Library R (DIXON, 1993). Die einfache Datenbeschreibung erfolgte mit BMDP1D. Mit Ausnahme des nativem Volumens erfolgte die einfache Datenbeschreibung eines jeden spermatologischen Parameters durch die Berechnung von:

- Arithmetischem Mittelwert
- Standardabweichung
- Minimalwert
- Maximalwert

Das native Volumen wurde aufgrund der großen Spannweite als geometrischer Mittelwert mit Streufaktor berechnet, um eine annähernde Normalverteilung zu erhalten. Dies lässt aufgrund der großen Spannweite der Ausgangswerte (10- 110 ml natives Volumen) eine genauere Aussage über die tatsächliche Entwicklung des Volumens bei mehrmaliger Samenentnahme zu. Zur Ermittlung der Signifikanz von Alter der Probanden und Samenentnahmetermin auf die Entwicklung des nativen Volumens (bereits logarithmiert), die Samenzellkonzentration, die Gesamtspermienzahl, den Anteil lebender bzw. toter Spermien im nativem Ejakulat bzw. nach Kryokonservierung sowie die Motilitäten im nativem Ejakulat und die Motilitätsparameter nach Kryokonservierungen bei den drei Samenentnahmeterminen wurde eine einfaktorielles Kovarianzanalyse mit Messwiederholung bezüglich der Zeit (Samenentnahmetermin) mit BMDP2V durchgeführt. Die Signifikanz eines Einflusses wurde definiert als statistisch nicht signifikant ($p \geq 0,05$), statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) und statistisch hoch signifikant ($p \leq 0,001$). Diese Einteilung der statistischen Signifikanz gilt zudem für alle weiteren Auswertungen dieser Arbeit.

Die statistische Auswertung der Pathomorphologie der Samenzellen erfolgte mit der Poisson-Regression (mixed model estimation) mit angeschlossenem WALD-Test. Die Poisson-Regression ist eine Wahrscheinlichkeitsverteilung, mit der die Wahrscheinlichkeit für seltene Ereignisse, hier die pathomorphologisch veränderten Samenzellen, modelliert werden können. Diese Verteilung erfolgt nach einem generalisierten, linearem Modell mit gemischten Effekten. Bei der Berechnung für die Modellparameter wurde die Maximum-Likelihood-Methode verwendet, welche auch die Grundlage für den durchgeführten WALD-Test ist. Der WALD-Test dient der Berechnung der Signifikanz von jeweils Alter und Samenentnahmetermin auf die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung.

Die statistische Auswertung, ob das Alter der Hengste oder der Samenentnahmetermin einen Einfluss darauf haben, ob ein Ejakulat die Mindestanforderungen erfüllt hat wurde durch eine Binomial-Regression mit angeschlossenem WALD-Test berechnet.

4 Ergebnisse

Für die Untersuchungen standen 29 Hengste zur Verfügung. Jedem Hengst wurde während der Untersuchungen dreimal manuell Samen entnommen. Es wurden 87 Ejakulate untersucht und statistisch ausgewertet.

4.1 Spermatologische Parameter der nativen Ejakulate

4.1.1 Untersuchungsergebnisse der makroskopischen Untersuchung

Alle Ejakulate (n = 87) zeigten Variationen in Farbe, Konsistenz, pH-Wert und Schleimanteil. Der Geruch aller Ejakulate war physiologisch. Bei drei Ejakulaten war ein sichtbarer Schleimanteil vorhanden. Die Farbe der Ejakulate war zu 34,5 % weißlich (n = 30), 41,4 % gräulich (n = 36), 21,8 % gelblich-weiß (n = 19) und zu 2,3 % bräunlich-grau (n = 2). Die Konsistenz war zu 16,1 % wässrig (n = 14), 21,8 % molkig (n = 19), 56,3 % milchig (n = 49) und 5,7 % rahmig (n = 5). Bei 27,6 % (n = 24) der Ejakulate lag ein pH-Wert von 7,5 vor. 72,4 % der Ejakulate (n = 63) hatten einen pH-Wert von 8,0.

Bereits beim zweiten Samenentnahmetermine (24 Stunden) ist eine Reduzierung des nativen Volumens eingetreten. Beim dritten Samenentnahmetermine, 72 Stunden nach dem ersten, ist es zu einer weiteren Reduzierung des nativen Volumens gekommen. Die Entwicklung der nativen Volumina bei mehrmaliger Samenentnahme ist in Tabelle 4 und Abbildung 2 zusammengestellt.

Tab. 4: Veränderung des Ejakulatvolumens von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als geometrischer Mittelwert, Streufaktor, Minimum und Maximum.

	\bar{x}_G (ml)	SF	Min.	Max.
1. Samenentnahmetermin	37,6	1,5	15,0	95,0
2. Samenentnahmetermin	34,7	1,9	10,0	110,0
3. Samenentnahmetermin	32,1	1,7	10,0	95,0

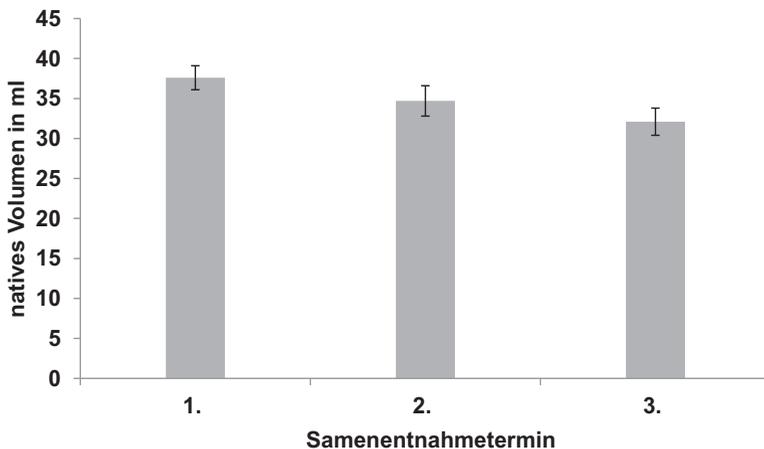


Abb. 2: Veränderung des Ejakulatvolumens von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als geometrischer Mittelwert und Streufaktor.

Die Dichte des Ejakulates reduzierte sich innerhalb der drei Untersuchungen. Das native Volumen und die Spermienzellenkonzentration pro Milliliter waren am dritten Samenentnahmetermin (72 Stunden nach dem ersten Samenentnahmetermin) am niedrigsten. Die Entwicklungen der Dichte (in Millionen pro Milliliter) und der Gesamtspermienzahl pro Ejakulat (in Milliarden pro Ejakulat) bei mehrmaliger Samenentnahme sind in Tabelle 5, Abbildung 3 und 4 dargestellt.

Tab. 5: Veränderung der Spermienkonzentration und Gesamtpermienzahl nativer Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

	Parameter	\bar{x}	SD	Min.	Max.
1. Samenentnahmetermine	Dichte (Mio./ml)	297,3	94,7	114,0	468,0
	GSZ(Mrd.)	11,7	4,9	3,8	21,4
2. Samenentnahmetermine	Dichte (Mio./ml)	278,7	114	52,0	450,0
	GSZ (Mrd.)	9,4	3,8	3,2	16,8
3. Samenentnahmetermine	Dichte (Mio./ml)	271,7	100,8	115,0	502,0
	GSZ (Mrd.)	8,4	2,5	3,7	13,0

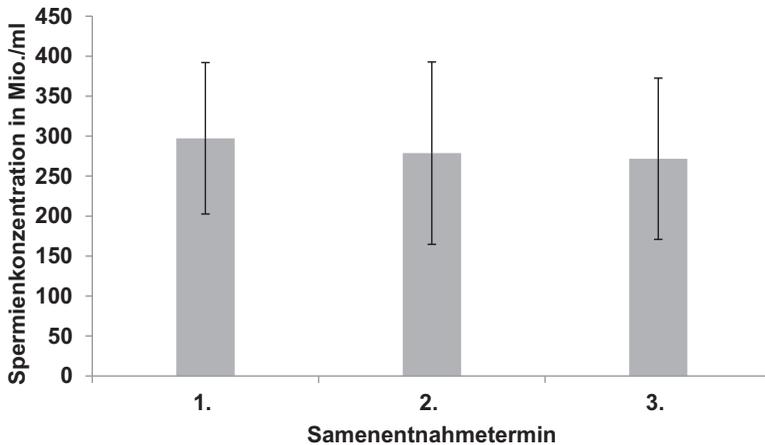


Abb. 3: Veränderung der Spermienkonzentration pro Milliliter nativer Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

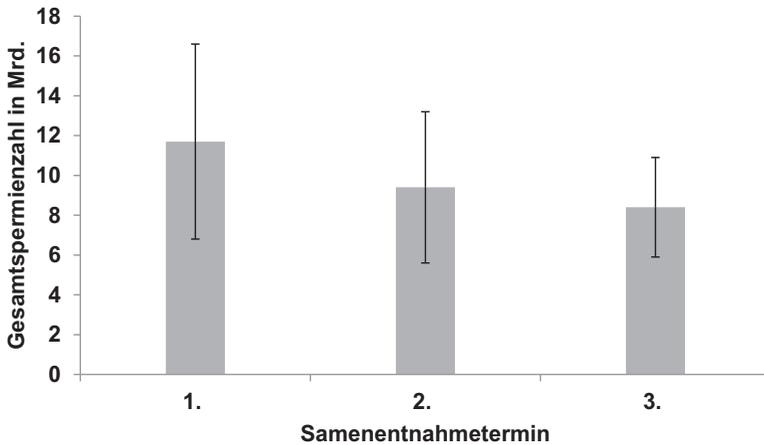


Abb. 4: Veränderung der Gesamtpermienzahl nativer Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

4.1.2 Untersuchungsergebnisse der mikroskopischen Untersuchung

Der Anteil an progressiv motilen Samenzellen konnte durch eine mehrmalige Samenentnahme von anfänglich 45,2 % am ersten Samenentnahmetermin auf 50 % progressiver Spermien am dritten Samenentnahmetermin gesteigert werden. Parallel zu dieser Entwicklung ist ein verminderter Anteil orts- bzw. unbeweglicher Samenzellen am dritten Samenentnahmetermin aufgetreten. Der Anteil an vitalen Spermien betrug am ersten Untersuchungstag 79,8 % und konnte am dritten Samenentnahmetermin auf 83,9 % gesteigert werden. Der Anteil an toten Spermien wurde dementsprechend auf 16,1 % reduziert (Tabelle 6, Abbildung 5 und Abbildung 6).

Tab. 6: Veränderung der geschätzten Spermienmotilitäten sowie Anteile lebender bzw. toter Samenzellen nativer Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

	Parameter	\bar{x}	SD	Min.	Max.
1. Samenentnahmetermin	Vorwärtsbeweglichkeit (%)	45,2	5,8	30,0	50,0
	Ortsbeweglichkeit (%)	29,7	1,9	20,0	30,0
	Unbeweglichkeit (%)	25,2	6,9	20,0	50,0
	lebende Samenzellen	79,8	3,5	73,0	86,0
	tote Samenzellen	20,2	3,5	14,0	27,0
2. Samenentnahmetermin	Vorwärtsbeweglichkeit (%)	46,2	7,8	30,0	60,0
	Ortsbeweglichkeit (%)	28,6	3,5	20,0	30,0
	Unbeweglichkeit (%)	25,2	7,4	20,0	50,0
	lebende Samenzellen	80,2	3,9	72,0	87,0
	tote Samenzellen	19,8	3,9	13,0	28,0
3. Samenentnahmetermin	Vorwärtsbeweglichkeit (%)	50	4,6	40,0	60,0
	Ortsbeweglichkeit (%)	28,6	3,5	20,0	30,0
	Unbeweglichkeit (%)	21,4	3,5	20,0	30,0
	lebende Samenzellen	83,9	3,0	80,0	90,0
	tote Samenzellen	16,1	3,0	10,0	20,0

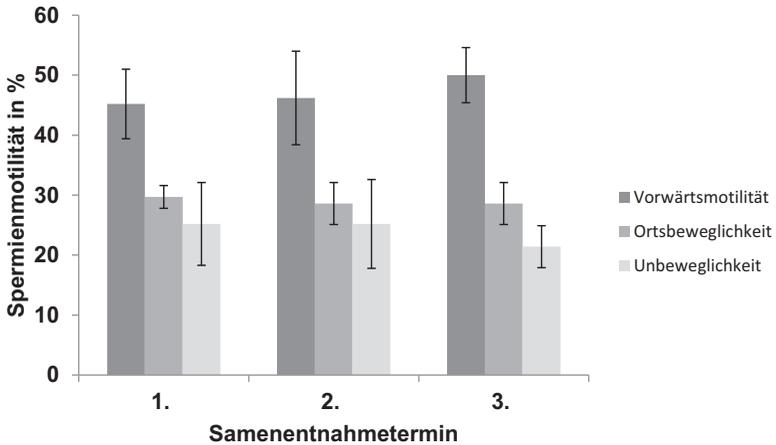


Abb. 5: Veränderung der Spermienmotilitäten nativer Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

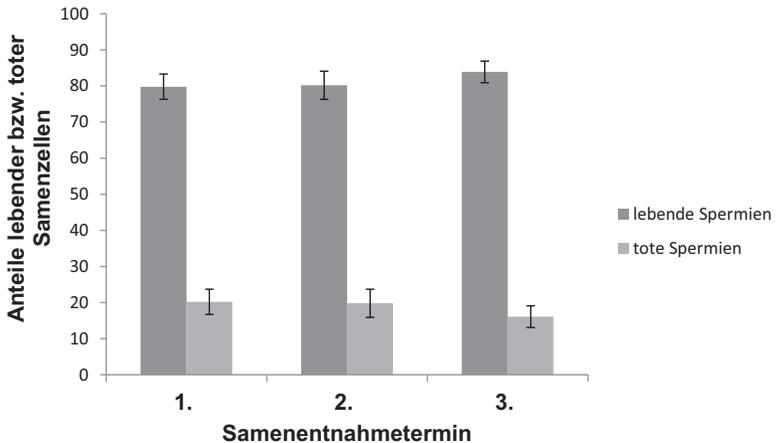


Abb. 6: Veränderung der Anteile lebender und toter Samenzellen nativer Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermin dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

4.2 Spermatologische Parameter der aufgetauten Besamungsportionen

4.2.1 Motilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse der aufgetauten Samenportionen

4.2.1.1 Progressive- und Gesamtmotilität der Samenzellen

Durch eine mehrmalige Samenentnahme ohne Depletionsphase konnte sowohl der Anteil gesamt motiler Samenzellen als auch der Anteil progressiv motiler Samenzellen gesteigert werden. Während die progressive Motilität von anfänglich 18,6 % bei der ersten Samenentnahme auf 18 % progressiver Samenzellen bei der zweiten Samenentnahme gesunken ist, kam es beim dritten Entnahmetermin zu einem deutlichen Anstieg auf 26,6 % progressiver Spermien. Eine ähnliche Tendenz war bei der Entwicklung der Gesamtmotilität vorhanden. Bei der zweiten Samenentnahme trat zunächst eine geringgradige Reduzierung der Gesamtmotilität ein. Beim dritten Samenentnahmetermin wurde dieser Wert jedoch deutlich erhöht. Die Entwicklung der progressiven Bewegung und Gesamtmotilität sind in Tabelle 7 und Abbildung 7 dargestellt.

Tab. 7: Veränderung der Gesamt- (gMot) und progressiv (pMot) motilen Samenzellen aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

	Parameter	\bar{x}	SD	Min.	Max.
1. Samenentnahmetermin	gMot (%)	31,7	15,0	6,4	64,1
	pMot (%)	18,6	12,3	1,4	48,9
2. Samenentnahmetermin	gMot (%)	31,5	16,5	6,2	64,1
	pMot (%)	19,8	14,0	1,5	49,5
3. Samenentnahmetermin	gMot (%)	39,8	19,2	8,3	73,0
	pMot (%)	26,6	18,1	4,5	58,6

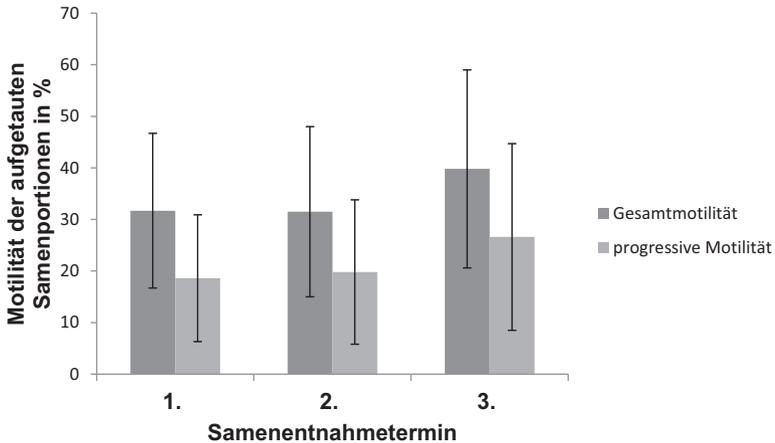


Abb. 7: Veränderung der Gesamt- und progressiven Motilität aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

4.2.1.2 Einzelmotilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse

Die gesamten ermittelten Streckenparameter der Computer-assistierten Spermienanalyse (DAP, DCL, DSL) wurden durch die mehrmalige Samenentnahme gesteigert. Die besten Resultate wurden am dritten Samenentnahmetermin (72 Stunden nach dem ersten Samenentnahmetermin) erreicht.

Ähnliche Ergebnisse traten bei der Untersuchung der Geschwindigkeitsparameter (VAP, VCL, VSL) auf. Auch hier konnten die Werte durch eine mehrmalige Samenentnahme zum Teil deutlich gesteigert werden. Die besten Resultate wurden am dritten Samenentnahmetermin erreicht.

Die Geradlinigkeit der Spermien (STR) war am zweiten Samenentnahmetermin (0,8) geringgradig höher als bei der ersten Samenentnahme (0,7). Bei der dritten Samenentnahme betrug dieser Wert ebenfalls 0,7.

Bei der Untersuchung der Linearität (LIN) konnten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Samenentnahmetermeninen festgestellt werden. Der Wert blieb mit 0,4 konstant.

Die Ergebnisse der Auslenkung der kurvilinearen Bewegung (WOB) am durchschnittlichen Bewegungsablauf der Spermien wurde durch die mehrmalige Samenentnahme nicht verändert.

Die Amplitude der seitlichen Kopfauslenkung der Spermien (ALH) wurde von anfänglich 3,3 auf 3,2 beim zweiten Samenentnahmetermin vermindert. Am dritten Untersuchungstag erhöhte sich dieser Wert auf 3,4.

Die Frequenz lateraler Kopfbewegung der Spermien (BCF) wurde durch die mehrmalige Samenentnahme von anfänglich 28,7 Hertz kontinuierlich auf 31,3 Hertz beim dritten Ejakulat gesteigert.

Die Entwicklungen der einzelnen Motilitätsparameter der CASA sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tab. 8: Veränderung der einzelnen Motilitätsparameter der computer-assistierte Spermienanalyse aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

	Parameter	\bar{x}	SD	Min.	Max.
1. Samenentnahmetermin	DAP	22,8	5,8	11,7	33,6
	DCL	39,8	12,5	16,1	63,7
	DSL	17,2	5,7	8,4	34,9
	VAP	54,6	12,5	29,3	77,1
	VCL	94,5	27,8	42,1	148,6
	VSL	40,6	10,2	21,3	59,7
	STR	0,7	0,1	0,6	0,9
	LIN	0,4	0,1	0,3	0,7

Fortsetzung Tab. 8: Veränderung der einzelnen Motilitätsparameter der computer-assistierten Spermienanalyse aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

	Parameter	\bar{x}	SD	Min.	Max.
	WOB	0,6	0,1	0,5	0,8
	ALH	3,3	0,4	2,7	4,2
	BCF	28,7	6,5	9,6	37,9
2. Samenentnahmetermin	DAP	24,3	6,6	9,6	34,9
	DCL	43,3	13,3	11,1	64,1
	DSL	18,4	5,3	9,2	27,2
	VAP	56,9	13,8	25,8	81,3
	VCL	100,7	28,6	29,7	149,5
	VSL	43,3	11,1	23,6	63,7
	STR	0,8	0,1	0,6	1,0
	LIN	0,4	0,1	0,3	0,8
	WOB	0,6	0,1	0,5	0,9
	ALH	3,2	0,4	2,4	4,2
	BCF	30,3	7,0	13,7	39,4
3. Samenentnahmetermin	DAP	25,2	6,5	15,1	36,2
	DCL	45,5	13,1	23,1	71,7
	DSL	18,3	5,3	10,7	28,4
	VAP	60,4	14,1	37,7	81,9
	VCL	108,1	28,9	59,6	161,7
	VSL	43,9	11,4	25,5	64,5
	STR	0,7	0,1	0,6	0,9
	LIN	0,4	0,1	0,3	0,6
	WOB	0,6	0,1	0,5	0,7
	ALH	3,4	0,5	2,4	4,6
	BCF	31,3	5,8	18,1	41,3

4.2.2 Pathomorphologie der Samenzellen in den aufgetauten Besamungsportionen

4.2.2.1 Spermienkopfveränderungen

Der Anteil an Spermien mit pathologischen Veränderungen des Spermienkopfes variierte zwischen den Samenentnahmetermen. Bei der ersten Absamung war der Anteil an Samenzellen mit losen Köpfen mit 4,45 % am häufigsten vertreten. Die Anteile an Spermien mit schmalen Köpfen, Doppelköpfen und Riesenköpfen betragen jeweils unter einem Prozent. Bei der zweiten Samenentnahme war der Anteil an Spermien mit losen Köpfen und Riesenköpfen deutlich reduziert (0,17 %; 0,05 %). Sowohl Samenzellen mit schmalen Köpfen als auch mit Samenzellen mit Doppelköpfen konnten im zweiten Ejakulat nicht beobachtet werden. Bei der dritten Samenentnahme waren alle Anteile an Spermien mit pathologischen Kopfveränderungen mengenmäßig am häufigsten vertreten. Die Entwicklung der Anteile an Spermien mit Kopfveränderungen ist in Tabelle 9 und Abbildung 8 dargestellt.

Tab. 9: Veränderung der morphologischen Spermienkopfpathologien aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

	Parameter	\bar{x}	SD	Min.	Max.
1. Samenentnahmetermine	lose Köpfe (%)	4,4	4,6	0	19
	schmale Köpfe (%)	0,1	0,3	0	1
	Doppelköpfe (%)	0,1	0,3	0	1
	Riesenköpfe (%)	0,1	0,3	0	1,5
2. Samenentnahmetermine	lose Köpfe (%)	0,2	0,1	0	0,5
	schmale Köpfe (%)	0	0	0	0

Fortsetzung Tab. 9: Veränderung der morphologischen Spermienkopfpathologien aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

	Parameter	\bar{x}	SD	Min.	Max.
2. Samenentnahmetermin	Doppelköpfe (%)	0	0	0	0
	Riesenköpfe (%)	0,1	0,3	0	1,5
3. Samenentnahmetermin	lose Köpfe (%)	4,8	4,4	0	18
	schmale Köpfe (%)	0,2	0,5	0	2
	Doppelköpfe (%)	0,1	0,3	0	1
	Riesenköpfe	0,2	0,4	0	1,5

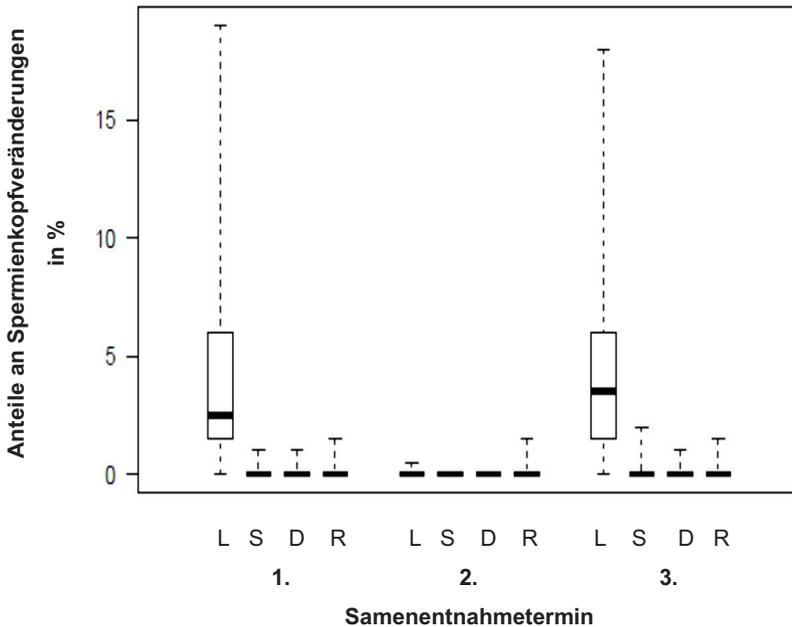


Abb. 8: Veränderung der Anteile an Spermien mit Kopfpathologien (lose Köpfe (L), schmale Köpfe (S), Doppelköpfe (D), Riesenköpfe (R)) in aufgetauten Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als Boxplot.

4.2.2.2 Spermien mit Halsbruch

Der Anteil an Samenzellen mit Halsbruch war am zweiten Samenentnahmetermin mit 0,05% deutlich niedriger als bei der ersten Absamung. Hier betrug der Anteil 0,74 %. Bei der letzten Samenentnahme ist dieser Wert wieder auf 0,78 % gestiegen. Die Entwicklung des Anteils an Spermien mit Halsbruch ist in Tabelle 10 und Abbildung 9 dargestellt.

Tab. 10: Veränderung des Anteils an Spermien mit Halsbruch aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

	Parameter	\bar{x}	SD	Min.	Max.
1. Samenentnahmetermine	Halsbruch(%)	0,7	1,0	0	4,5
2. Samenentnahmetermine	Halsbruch(%)	0,1	0,3	0	1,5
3. Samenentnahmetermine	Halsbruch(%)	0,8	0,9	0	3,0

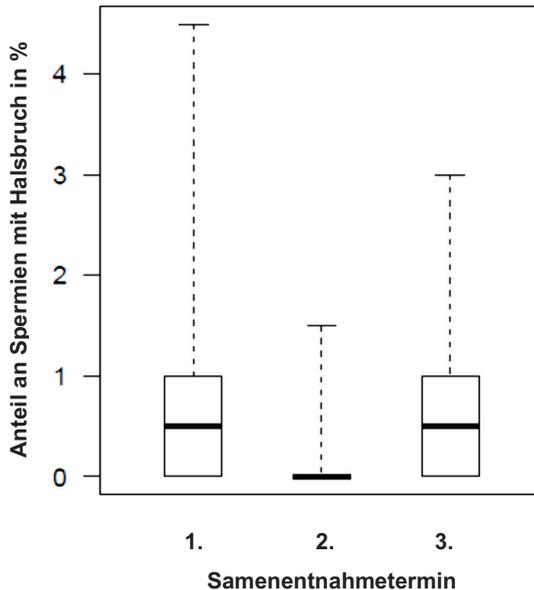


Abb. 9: Veränderung des Anteils an Spermien mit Halsbruch in aufgetauten Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als Boxplot.

4.2.2.3 Spermischwanzveränderungen

Der Anteil an Spermien mit abgeknickten Schwänzen war bei der ersten Samenentnahme mit 9,59 % der am häufigsten vertretene pathologische Defekt. Samenzellen mit schleifenförmigen Schwänzen waren mit 1,71 % vertreten. Der Anteil an aufgerollten Schwänzen betrug unter einem Prozent. Bei der zweiten Samenentnahme reduzierten sich alle Anteile an Schwanzveränderungen deutlich. Spermien mit aufgerollten Schwänzen sind im zweiten Ejakulat nicht aufgetreten. Bei der dritten Samenentnahme stiegen jedoch alle ermittelten pathologischen Schwanzveränderungen wieder an. Die Anteile an Spermien mit abgeknickten Schwänzen (9,67 %) und schleifenförmigen Schwänzen (2,14 %) waren höher als im ersten Ejakulat. Die Entwicklung der Anteile an Spermien mit Schwanzveränderungen ist in Tabelle 11 und Abbildung 10 dargestellt.

Tab. 11: Veränderung der morphologischen Spermischwanzpathologien aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

	Parameter	\bar{x}	SD	Min.	Max.
1. Samenentnahmeterm	aufgero. Schwänze(%)	0,6	2,4	0	13,0
	abgekni.Schwänze (%)	9,6	1	0	39,0
	schleif. Schwänze (%)	1,7	3,8	0	20,5
2. Samenentnahmeterm	aufgero. Schwänze(%)	0	0	0	0
	abgekni. Schwänze(%)	0,2	0,9	0	5,0
	schleif. Schwänze (%)	0	0,2	0	1,0
3. Samenentnahmetemrin	aufgero.Schwänze (%)	0,5	2	0	11,0
	abgekni. Schwänze(%)	9,7	8,9	0,5	41,0
	schleif. Schwänze (%)	2,1	3	0	10,5

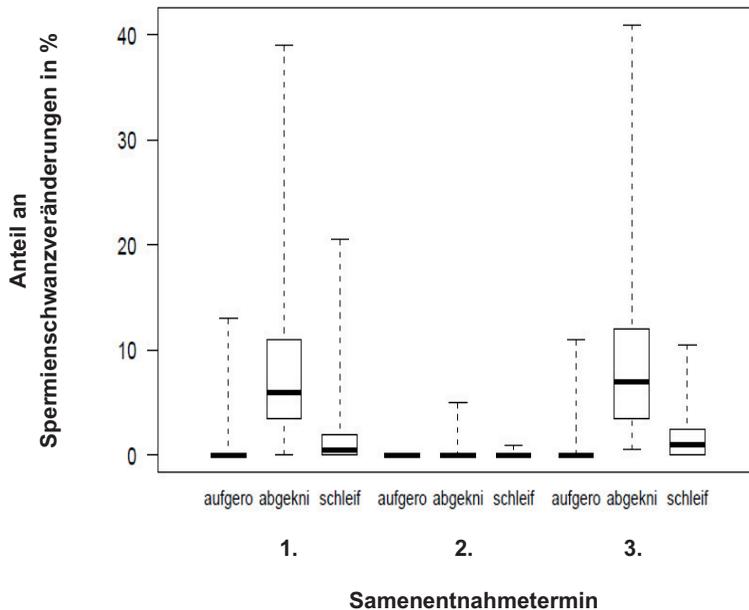


Abb. 10: Veränderung des Anteils an Spermien mit Schwanzpathologien (aufgerollt (aufgero), abgeknickt (abgekni), schleifenförmig (schleif)) in aufgetauten Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als Boxplot.

4.2.2.4 Plasmatropfen

Der Anteil an Samenzellen mit Plasmatropfen wurde von anfänglich 0,9 % im ersten Ejakulat auf null Prozent bei der zweiten Samenentnahme reduziert. Beim dritten Samenentnahmetermin ist wiederum ein deutlicher Anstieg auf 0,9 % der Spermien mit Plasmatropfen aufgetreten. Die Entwicklung des Anteils an Spermien mit Plasmatropfen ist in Tabelle 12 und Abbildung 11 dargestellt.

Tab. 12: Veränderung des Anteils an Samenzellen mit Plasmotropfen aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

	Parameter	\bar{x}	SD	Min.	Max.
1. Samenentnahmetermine	Plasmotropfen (%)	0,9	1,4	0	5,0
2. Samenentnahmetermine	Plasmotropfen (%)	0,0	0,0	0	0,0
3. Samenentnahmetermine	Plasmotropfen (%)	1,0	1,5	0	6,0

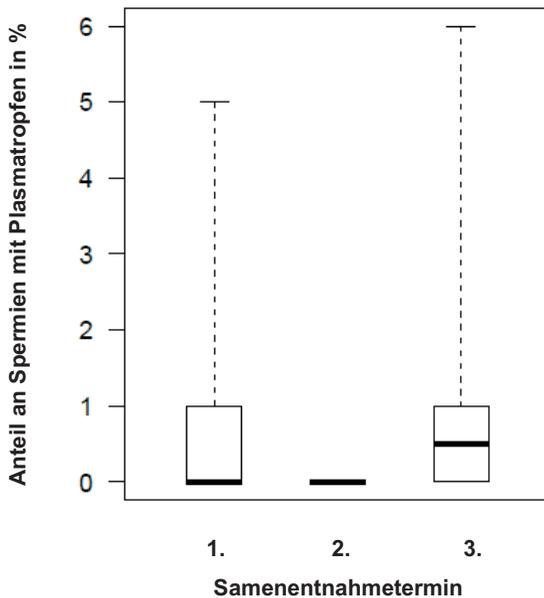


Abb. 11: Veränderung des Anteils an Samenzellen mit Plasmotropfen aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als Boxplot.

4.2.3 Lebend-Tot Untersuchung der aufgetauten Besamungsportionen

Der Anteil lebender Spermien konnte nach 24 (52,3 %) und 72 Stunden (59,3 %) deutlich gesteigert werden. Die Entwicklung der Anteile an lebenden bzw. nicht lebenden Spermien ist in Tabelle 13 und Abbildung 12 dargestellt.

Tab. 13: Veränderung der Anteile vitaler und toter Samenzellen aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

	Parameter	\bar{x}	SD	Min.	Max.
1. Samenentnahmetermine	Anteil lebend (%)	48,8	16,3	14,0	73,0
	Anteil tot (%)	51,2	16,3	27,0	86,0
2. Samenentnahmetermine	Anteil lebend (%)	52,3	16,5	15,5	81,0
	Anteil tot (%)	47,7	16,5	19,0	84,5
3. Samenentnahmetermine	Anteil lebend (%)	59,3	16,6	19,5	83,0
	Anteil tot (%)	40,7	16,6	17,0	80,5

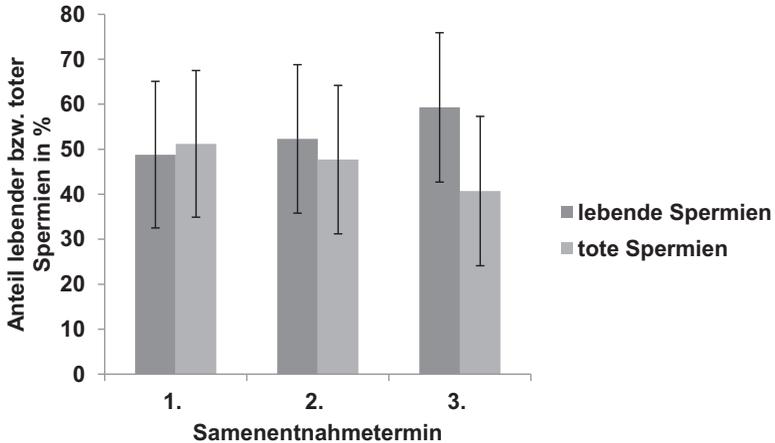


Abb. 12: Veränderung der Anteile vitaler und toter Samenzellen kryokonservierter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

4.3 Mindestanforderungen an die spermatologischen Parameter nativer Ejakulate

Von insgesamt 29 Ejakulaten hatten beim ersten Samenentnahmetermin 14 Ejakulate (48,3 %) die Anforderungen erfüllt. Bei der zweiten Absamung wurde dieser Wert auf 15 (51,7 %) gesteigert. Bei der dritten Absamung erfüllten 20 von 29 entnommenen Ejakulaten (68,9 %) die Mindestanforderung. Der Anteil an verwertbaren nativen Ejakulaten für die Kryokonservierung konnte somit gesteigert werden. Die Entwicklung zur Erfüllung der Mindestanforderung an die Ejakulate ist in Abbildung 13 dargestellt.

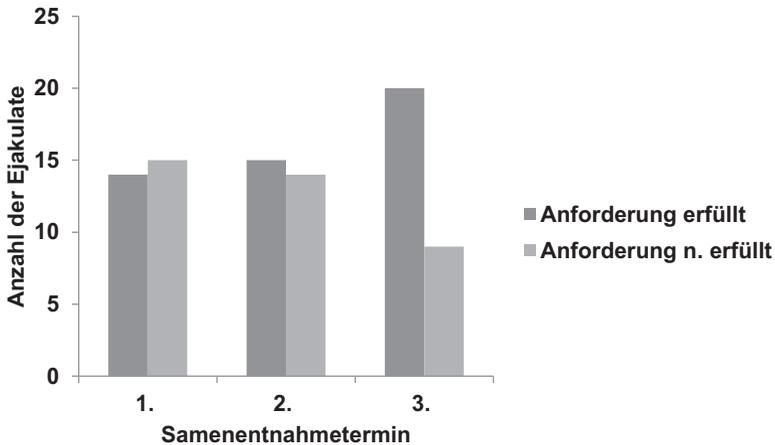


Abb. 13: Veränderung der Mindestanforderung an die Ejakulate nach Expertenmeinung von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert.

4.4 Einflussfaktoren auf die spermatologischen Parameter

4.4.1 Einfluss des Alters der Hengste

4.4.1.1 Spermatologische Parameter der nativen Ejakulate

4.4.1.1.1 Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung

Der Einfluss des Alters auf die Entwicklung der nativen, im geometrischen Mittel berechneten nativen Volumina der Ejakulate, konnte mit $p = 0,6$ als statistisch nicht signifikant dargestellt werden. Ebenso konnte bei der Entwicklung der Spermienzellkonzentration ($p = 0,16$) als auch bei der Entwicklung der Gesamtspermienzahl ($p = 0,79$) keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

4.4.1.1.2 Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung

Das Alter der Hengste hatte auf die Entwicklung der progressiven Motilität ($p = 0,24$), der Ortsbeweglichkeit ($p = 0,35$) sowie des Anteils unbeweglicher Samenzellen ($p = 0,44$) keinen statistisch signifikanten Einfluss. Ebenso konnte kein Einfluss auf die Entwicklung der Anteile vitaler Spermien ($p = 0,37$) bzw. toter Samenzellen ($p = 0,37$) nachgewiesen werden.

4.4.1.2 Motilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse der aufgetauten Besamungsportionenportionen

4.4.1.2.1 Progressive- und Gesamtmotilität der Samenzellen

Der Einfluss des Alters der Hengste auf die Entwicklung der Anteile der gesamt motilen Spermien ($p = 0,26$) sowie progressiven Samenzellen ($p = 0,19$) war statistisch nicht signifikant.

4.4.1.2.2 Einzelmotilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse

Mit Ausnahme der BCF mit $p = 0,04$ (Einfluss des Alters ist statistisch signifikant) lagen alle anderen ermittelten Motilitätsparameter über dem Wert von $p = 0,05$ (Einfluss des Alters statistisch nicht signifikant).

4.4.1.3 Pathomorphologie der Samenzellen

4.4.1.3.1 Spermienkopfveränderungen

Der Einfluss des Alters war bei der Entwicklung der Anteile an Samenzellen mit losen Köpfen ($p = 0,27$), Riesenköpfen ($p = 0,23$) und schmalen Köpfen ($p = 0,52$) statistisch jeweils nicht signifikant. Einzig bei der Entwicklung des Anteils an Spermien mit Doppelköpfen ($p = 0,026$) war der Einfluss des Alters statistisch signifikant.

4.4.1.3.2 Spermien mit Halsbruch

Es konnte mit $p = 0,94$ keine statistische Signifikanz des Alters der Hengste auf die Entwicklung der Anteile an Spermien mit Halsbrüchen festgestellt werden.

4.4.1.3.3 Spermischwanzveränderungen

Das Alter der Hengste hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung von Samenzellen mit abgeknickten Schwänzen ($p = 0,77$), aufgerollten Schwänzen ($p = 0,66$) oder schleifenförmigen Schwänzen ($p = 0,39$).

4.4.1.3.4 Plasmatropfen

Das Alter der Hengste hatte auf die Entwicklung der Spermienanteile mit Plasmatropfen ($p = 0,18$) keinen Einfluss.

4.4.1.4 Lebend-Tot-Färbung

Das Alter der Hengste hatte keine statistische Signifikanz auf die Entwicklung der Anteile vitaler ($p = 0,28$) bzw. avitaler Spermien ($p = 0,27$) bei mehrmaliger Samenentnahme.

4.4.1.5 Einfluss des Alters auf die Entwicklung der Mindestanforderung an die nativen Ejakulate

Das Alter der Hengste hatte mit $p = 0,15$ keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Anzahl verwertbarer Ejakulate.

4.4.2 Einfluss der Samenentnahmehäufigkeit auf die spermatologischen Parameter

4.4.2.1 Spermatologische Parameter der nativen Ejakulate

4.4.2.1.1 Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung

Der Einfluss der Samenentnahmehäufigkeit auf die Entwicklung der nativen, logarithmierten Volumina war mit $p = 0,23$ statistisch nicht signifikant. Ebenso konnte keine statistische Signifikanz bezüglich der Entwicklung der Samenzellkonzentration ($p = 0,25$), wohl aber der Gesamtspermienzahl pro Ejakulat ($p = 0,0002$), welche statistisch hoch signifikant war, ermittelt werden.

4.4.2.1.2 Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchung

Der Samenentnahmezeitpunkt war auf die Entwicklung progressiver Samenzellen statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$). Ebenso war die Entwicklung des Anteils unbeweglicher Samenzellen durch den Samenentnahmezeitpunkt statistisch signifikant ($p = 0,0002$). Dagegen konnte keine statistische Signifikanz des Samenentnahmezeitpunktes bezüglich der Anteile ortsbeweglicher Spermien festgestellt werden ($p = 0,17$). Bei der Entwicklung der Anteile vitaler bzw. avitaler Samenzellen war der Samenentnahmezeitpunkt mit $p < 0,0001$ jeweils statistisch hoch signifikant.

4.4.2.2 Motilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse der aufgetauten Besamungsportionen

4.4.2.2.1 Progressive- und Gesamtmotilität der Samenzellen

Der Einfluss des Samenentnahmezeitpunktes auf die Gesamtmotilität in aufgetauten Besamungsportionen war mit $p = 0,0013$ statistisch signifikant. Ebenso konnte eine statistische Signifikanz bezüglich des Anteils progressiver Samenzellen ($p = 0,0016$) festgestellt werden.

4.4.2.2 Einzelmotilitätsparameter der Computer-assistierten Samenanalyse

Mit Ausnahme auf die Geradlinigkeit (STR, $p = 0,05$) war der Einfluss des Samenentnahmezeitpunktes bei allen weiteren bestimmten Einzelmotilitätsparametern statistisch nicht signifikant.

4.4.2.3 Pathomorphologie der Samenzellen

4.4.2.3.1 Spermienkopfveränderungen

Der Einfluss der Samenentnahmehäufigkeit auf die Entwicklung der Anteile an Samenzellen mit losen Köpfen ($p < 0,0001$), schmalen Köpfen ($p < 0,0001$) und Doppelköpfen ($p < 0,0001$) war jeweils statistisch hoch signifikant. Bei der Entwicklung des Spermienanteils mit Riesenköpfen konnte mit $p = 0,0004$ statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

4.4.2.3.2 Spermien mit Halsbruch

Der Einfluss des Samenentnahmezeitpunktes war mit $p = 0,0007$ statistisch signifikant auf die Entwicklung des Anteils an Spermien mit Halsbrüchen während des Untersuchungszeitraumes.

4.4.2.3.3 Spermieschwanzveränderungen

Der Einfluss des Samenentnahmezeitpunktes auf die Anteile an Samenzellen mit abgeknicktem Schwanz ($p < 0,0001$), aufgerolltem Schwanz ($p = 0$) und schleifenförmigen Schwänzen ($p = 0,0002$) war statistisch hoch signifikant.

4.4.2.3.4 Plasmatropfen

Es konnte eine statistische Signifikanz des Samenentnahmezeitpunktes auf die Entwicklung der Anteile an Spermien mit Plasmatropfen festgestellt werden ($p = 0,039$).

4.4.2.4 Lebend-Tot-Färbung

Es konnte ein Einfluss des Samenentnahmezeitpunktes auf die Entwicklung der Anteile lebender bzw. toter Samenzellen in aufgetauten Besamungsportionen nachgewiesen werden. Der Einfluss des Samenentnahmezeitpunktes auf den Anteil vitaler bzw. toter Spermien war mit jeweils $p = 0,0003$ statistisch signifikant.

4.4.2.5 Entwicklung der Mindestanforderung an die nativen Ejakulate

Ein Einfluss der Samenentnahmehäufigkeit auf die Entwicklung der Mindestanforderung an die Ejakulate, welche zur Kryokonservierung genutzt werden können, konnte nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der Ejakulate hatte am dritten Untersuchungstag die Mindestanforderung erfüllt. Der Einfluss des Samenentnahmezeitpunktes war mit $p = 0,0019$ statistisch signifikant.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Fragestellung

In den vergangenen zwanzig Jahren hat sich die künstliche Besamung zu einem festen Bestandteil der Pferdezucht entwickelt. Trotz des überwiegenden Einsatzes von Frischsamen hat die Kryokonservierung von Hengstsamen eine Reihe von Vorteilen, wodurch der Einsatz von Tiefgefriersperma weiter zunimmt. In der Literatur sind zahlreiche Veröffentlichungen zu Spermaaufbereitung von TG-Sperma, Verdünnermedien oder Kryoprotektiva zu finden. Konkrete Angaben zur Vorbereitung der Hengste beziehen sich lediglich auf die tierseuchenrechtlichen Bestimmungen sowie das Samenentnahmeintervall nach Beseitigung der extragonadalen Reserven. Zur optimalen Vorbereitung der Deckhengste hinsichtlich des Samenentnahmeintervalls bzw. der Samenentnahmefrequenz nach längerer Sexualkarenz sind bisher nur Expertenmeinungen, jedoch keine wissenschaftlichen Abhandlungen bekannt. Bislang wurde eine mehrmalige Samenentnahme nach längerer Sexualkarenz empfohlen, um die extragonadalen Spermareserven zu eliminieren bis eine gute Samenqualität erreicht ist (SIEME, 2011a). Diese Vorgehensweise hat sich in der Praxis fest etabliert (SAMPER und MORRIS, 1998). Dieses Vorgehen ist jedoch mit einem eventuellen Verlust von Besamungsportionen und damit finanziellen Einbußen verbunden.

Die Häufigkeit der Samenentnahme richtet sich nach dem Samenzellbildungsvermögen der Hengste (KLUG und SIEME, 2003; SIEME et al., 1998; SIEME, 2009). Als Faustregel gilt, dass ein guter Samenzellbildner häufiger und schlechte Samenzellbildner weniger häufig abgesamt werden können, um Tiefgefriersperma zu produzieren. Die Regelmäßigkeit der Samenentnahme spielt dabei eine große Rolle (KLUG und SIEME, 2003).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Ejakulationshäufigkeit bei Deckhengsten nach Deckruhe auf die Tiefgefriereignung und die Entwicklung spermatologischer Parameter in aufgetauten Samenproben zu untersuchen. Dabei wurden, entgegen in der Praxis üblich, alle Ejakulate tiefgefroren, ohne die extragonadalen Spermareserven zuvor zu beseitigen.

5.2 Diskussion der Methodik

5.2.1 Auswahl der Hengste

Es wurden nur Daten von Hengsten verwendet, von denen Nachkommen vorhanden sind und die in der künstlichen Besamung eingesetzt werden. Das Alter der Tiere lag zwischen 4 und 23 Jahren. Um repräsentative Ergebnisse zu erzielen, wurden die 29 Hengste nach einer zuvor definierten Deckruhe von 60 Tagen an Tag 1, nach 24 Stunden und 72 Stunden nach der ersten Untersuchung abgesamt. Alle 87 Ejakulate der Hengste waren für die Studie verwertbar. Da der Zeitraum für die Tiefgefrierspermagewinnung aus organisatorischen Gründen meistens auf den Herbst bzw. Winter beschränkt ist (SIEME, 2004), wurde der Zeitraum für die eigenen Untersuchungen in den Oktober gelegt. Es konnte jedoch durch diverse Untersuchungen belegt werden, dass saisonale Einflüsse sowohl auf die Spermienproduktion, Spermienkonzentration, Spermienmorphologie und Spermienmotilität bestehen (BLOTTNER et al., 2001; JANETT et al., 2003; JOHNSON, 1991, MAGISTRINI et al., 1987; VAN DER HOLST, 1975). Die Praxis hat jedoch gezeigt, dass eine gute Qualität des Tiefgefrierspermas in den Herbst und Wintermonaten erzielt wird (SIEME, 2009; SIEME, 2011a).

Da die Mindestanforderungen für die Gefriereignung von Hengstsperma bisher nur auf Expertenmeinungen (KLUG und SIEME, 2003; SIEME, 2009; SIEME, 2011a) beruhen, jedoch keine rassespezifische Aussagen enthalten, wurden Hengste verschiedener Rassen für die Studie gewählt. Die Hengste wurden sowohl in staatlichen Einrichtungen als auch privat gehalten. Für diese Untersuchungen wurden die Probanden zufällig und nicht aufgrund der Gefriertauglichkeit ihres Spermas ausgewählt.

5.2.2 Untersuchung des Nativsamens und Kryokonservierung

Die Samenentnahme erfolgte nicht fraktioniert mithilfe einer künstlichen Scheide (Modell Hannover) unter Verwendung eines Phantoms als Sprungpartner. SIEME (2009) konnte mit der fraktionierten Samengewinnung und ohne zuvor durchgeführter Zentrifugation keine Verbesserung der Samenqualität nach der Kryokonservierung

erzielen. KNEIßL (1993) berichtet, dass die fraktionierte gegenüber der nicht-fraktionierten Samenentnahmetechnik keine Unterschiede hinsichtlich der Motilität und Morphologie der nativen Samenzellen hat. Zu den gleichen Ergebnissen sind SIEME et al. (2004) gekommen. Die fraktionierte Samenentnahme in Kombination mit anschließender Zentrifugation führt jedoch, im Vergleich zu der nicht-fraktionierten Samenentnahmetechnik, nach dem Auftauen zu einer deutlich besseren progressiven Motilität der Samenzellen (KNEIßL, 1993; SIEME et al., 2004). Vorteil der fraktionierten Samenentnahme ist vor allen Dingen die geringere bakterielle Kontamination des Spermas, was sich positiv auf die Langzeitlagerung auswirkt (BADER und SIEME, 2007; SIEME, 2009).

Die Untersuchung des Nativsamens erfolgte unmittelbar nach der Gewinnung und wurde makroskopisch wie auch mikroskopisch durchgeführt. Die Bestimmung des pH-Wertes erfolgte mit einem Indikatorpapier. Diese Vorgehensweise ist in der Praxis etabliert und wird von diversen Autoren empfohlen (WEITZE, 2001; KLUG und SIEME, 2003; WABERSKI und SIEME, 2009, WABERSKI und PETRUNKINA, 2007). Es ist jedoch anzumerken, dass die Schätzungen der Spermienmotilität sich nur bedingt für wissenschaftliche bzw. forensische Beurteilungen eignen (WEITZE, 2001). Die Bestimmung der Spermiedichte pro Ejakulat wurde mit einem Photometer Spermacue, Minitüb®, Tiefenbach) durchgeführt. Bei diesem Verfahren erfolgt keine Differenzierung zwischen Samenzellen und Fremdzellen (WABERSKI und PETRUNKINA, 2007). Die Ergebnisse der photometrischen Messung sind jedoch, bei regelmäßiger Eichung der zur Anwendung kommenden Geräte, für die praktische Anwendung ausreichend (WABERSKI und SIEME, 2009). Die präzisesten Ergebnisse zur Dichtebestimmung sind mit der Durchflusszytometrie zu erzielen (WABERSKI und SIEME, 2009; WABERSKI und PETRUNKINA, 2007). Die morphologische Untersuchung der Samenzellen sowie der Supravitaltest wurden an Eosin-Nigrosin-fixierten Proben durchgeführt. Dieser Test findet vor allem aufgrund der einfachen Handhabung eine weitreichende Anwendung. Jedoch konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass hinsichtlich der Beurteilung der Spermienmorphologie die Nass-Fixierung mit Formolzitrat im Vergleich zu der Färbung mit Eosin-Nigrosin bzw. Papanikolao ein wesentlich sensitiveres Verfahren ist, um abnormale Hengstspermien zu identifizieren (BRITO et al., 2011). Aufgrund der einfachen Durchführung und der

weitreichenden Anwendung der Färbung mit Eosin-Nigrosin auf den Besamungsstationen, wurde in den eigenen Untersuchungen ebenfalls dieser Farbstoff verwendet.

Das Seminalplasma kann generell auf unterschiedliche Weise separiert werden. Die Zentrifugation ist das wohl am häufigsten angewendete Verfahren, um das Seminalplasma im Ejakulat zu reduzieren (SAMPER und MORRIS, 1998) und damit die negativen Eigenschaften dieses auf die Samenzellen zu vermindern (BRINSKO und VARNER, 1992). Jedoch ist diese Methode in der Aufbereitung von Hengstesperma nach wie vor ein strittiges Thema, da der Spermienverlust, gerade bei Hengsten, die eine niedrige Samenzellproduktion haben, als zu hoch eingeschätzt wird (SIEME, 2011b). Gerade hinsichtlich der Motilität der Samenzellen sind negative Einflüsse durch die Zentrifugation bekannt (McLEOD und McGEE, 1950). Dieses Verfahren wird aber nach derzeitigem Stand des Wissens als unverzichtbar bei der Aufbereitung der Ejakulate zur Kryokonservierung gesehen (SIEME, 2009). So konnten PICKETT et al. (1975a) durch Abzentrifugieren des Seminalplasmas eine Verlängerung der Lagerungsdauer equiner Samenzellen erzielen. Untersuchungen von BRINSKO et al. (2000) belegen, dass die Zentrifugation und teilweise Reduktion des Seminalplasmas positive Einflüsse auf den Samen hat, besonders bei Hengsten mit deutlich reduzierten, progressiven Samenzellen. Für die eigenen Untersuchungen wurde eine Zentrifugation von 560 x G für 6 Minuten gewählt. Nach Empfehlungen von WEISS (2004) sollte Pferdesperma mit 600 x G für die Dauer von 10 Minuten zentrifugiert werden, um den geringsten Spermienverlust und somit bestmögliche Qualität zu erhalten. Um hengstspezifische Bedürfnisse zu berücksichtigen, werden allgemein eine Zentrifugationsstärke von 400 bis 600 x G und eine Zentrifugationsdauer von acht bis zwölf Minuten empfohlen (BADER und SIEME, 2007). Andere Autoren empfehlen eine Zentrifugationszeit von zehn bis fünfzehn Minuten bei einer Zentrifugationsstärke von 400 bis 600 x G (KLUG und SIEME, 2003).

Für die eigenen Untersuchungen wurde das in 0,5 ml-Pailletten abgefüllte Sperma mithilfe einer Styroporbox tiefgefroren. Dazu wurde das Sperma zunächst im Kühlschrank in zwei Stunden auf 4°C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Pailletten horizontal über einen flüssigen Stickstoffspiegel (Höhe ca. 2,5–3 cm) in einer verschließbaren Styroporbox in Stickstoffdampf gelagert. Nach einer Wartezeit von 20 Minuten wurden die Pailletten in die flüssige Stickstoffphase verbracht. Dieses

Verfahren ist technisch einfach (BADER und SIEME, 2007) und wird von der Mehrzahl der Labore, welche Tiefgefriersperma herstellen, genutzt (SAMPER und MORRIS, 1998). Das Sperma wird mit einer Geschwindigkeit von ca. 45-60 °C/ min eingefroren (SIEME, 2009). Die Alternative zu diesem Verfahren sind computergestützte Einfrierautomaten, welche den Vorteil haben, dass die Einfrierbedingungen konstant eingehalten werden können (BADER und SIEME, 2007). COCHRAN et al. (1984) konnten jedoch keinen entscheidenden Unterschied zwischen den beiden Kühlraten der Verfahren im Hinblick auf die Motilität feststellen. Dagegen erreichten CRISTANELLI et al. (1985) mit der gesteuerten Gefriereschwindigkeit ein um 50 % verbessertes Auftauergebnis.

5.2.3 Untersuchung des aufgetauten Tiefgefrierspermas

Die objektive Messung der Spermienmotilität ist ein unverzichtbarer Untersuchungsschritt in der modernen Spermatologie (WEITZE, 2001). Das Verfahren der computerassistierten Spermienanalyse wurde von DOTT und FOSTER (1979) eingeführt. Diese Systeme ermöglichen eine objektive Motilitätsanalyse sowie eine Bestimmung der Bewegungsgeschwindigkeit (SIEME, 2009) und der Morphologie (VERSTEGEN et al., 2002). Des Weiteren können verschiedene Distanzen, welche die Samenzellen zurücklegen, sowie bestimmte Bewegungsmuster bestimmt werden (MORTIMER, 2000). Zusätzlich kann auch die Spermienkonzentration mit relativ guter Präzision ermittelt werden (WABERSKI und PETRUNKINA, 2007). Ein Nachteil dieser Analyse liegt jedoch in der begrenzten Eignung von Vollmilch- oder eidotterhaltigen Verdünnern. In diesen Spermaproben werden Eidotterpartikel fälschlicherweise häufig als Spermien erkannt (ZIEGLER, 1991). Die Motilitätsanalysen sind jedoch wiederholbar und für den klinischen Gebrauch ausreichend (JASKO et al., 1988). Durch die hohen Kosten dieser Systeme werden diese hauptsächlich für wissenschaftliche Untersuchungen verwendet (KATILA, 2001). In der modernen Spermatologie werden mittlerweile nahezu alle motilitäts- und morphologisch relevanten Samenuntersuchungen, welche unter wissenschaftlichen Aspekten durchgeführt werden, mithilfe der computergestützten Samenanalyse durchgeführt (JANETT et al., 2003; KATILA et al., 2002; SQUIRES et al., 2004; VIDAMENT et al., 1998), sodass diese Methode der spermatologischen Untersuchung etabliert ist.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Spermatologische Parameter der nativen Ejakulate

In die statistische Auswertung dieser Untersuchung wurden die Parameter Farbe, die Konsistenz, der pH-Wert und der Schleimanteil der nativen Ejakulate nicht einbezogen. Diese Parameter wurden durch ihr anteilmäßiges Auftreten von den 87 untersuchten Ejakulaten beschrieben. Nur 3 der 87 Ejakulate hatten einen Schleimanteil. Die Mehrzahl der Ejakulate hatte eine weißliche bis gräuliche bzw. gelblich-weiße Farbe. Lediglich 2 Ejakulate wiesen eine bräunlich-graue Farbe auf, welche als nicht physiologisch anzusehen ist. Die Konsistenz war in der Mehrzahl der Ejakulate milchig. Auch hier gab es Variationen der Ejakulatkonsistenzen von wässrig bis molkig bzw. milchig bis rahmige Konsistenz. Anhand der Konsistenz können erste Rückschlüsse auf die Samenzellkonzentration und Gesamtpermienzahl der Ejakulate geschlossen werden (KLUG und SIEME, 2003; SIEME, 2009). Bis auf die 2 Ejakulate mit bräunlicher Farbe hatten alle anderen Ejakulate physiologische Qualitäten (SIEME, 2009). Die 2 Ejakulate mit bräunlicher Farbe wurden aufgrund motiler Samenzellen (gMot 70% bzw. 80%) und vitaler Samenzellen von 75 bzw. 81 Zellen von 100 gezählten Spermien in diese Untersuchung einbezogen. Grundsätzlich ist aber jede Abweichung von den physiologischen Qualitäten eines Ejakulates bei Hengsten, welche in der künstlichen Besamung eingesetzt werden, zu beanstanden (SIEME, 2009). Da die aufgeführten Parameter (Farbe, Konsistenz, pH-Wert und Schleimanteil) zu selten Abweichungen zeigten, wurden sie in die statistische Auswertung nicht einbezogen.

Am ersten Tag der Untersuchungen betrug das native Volumen im geometrischen Mittelwert 37,6 ml (ohne Schleimanteil). Bereits bei der zweiten Samenentnahme nach 24 Stunden ist ein Absinken des nativen Volumens eingetreten (ca. 7,71 % Reduzierung). Bei der dritten Samenentnahme wurde dieser Wert nochmals verringert und betrug noch im geometrischem Mittelwert durchschnittlich 32,1 ml (ca. 7,5 %).

Von THOMPSON et al. (1977) wurde bereits festgestellt, dass beim Zweitejakulat, welches den Hengsten nach 24 Stunden entnommen wurde, das native Volumen geringer war als im Erstejakulat. Dies deckt sich ebenfalls mit Untersuchungsergebnissen von MAGISTRINI et al. (1987), bei denen eine tägliche

Samenentnahmefrequenz im Vergleich zu einem 48-Stunden-Samenentnahmeintervall ebenfalls zu einem vermindertem Volumen führte. SIEME et al. (2004) sind zu ähnlichen Ergebnissen gekommen. Eine tägliche Samenentnahme führte auch hier zu einem verminderten Volumen im Vergleich zu einem 48 Stunden Samenentnahmeintervall. Die Reduzierung des nativen Volumens konnte in den eigenen Untersuchungen nicht mit der Samenentnahmefrequenz bzw. dem Samenentnahmeintervall in Verbindung gebracht werden ($p = 0,23$). PICKETT et al. (1975b) konnten ebenfalls keinen statistischen Zusammenhang der Samenentnahmefrequenz mit der Entwicklung der Volumina feststellen. In Ihren Untersuchungen wurden die Hengste über einen Zeitraum von 4 Wochen jeweils einmal, dreimal und sechsmal pro Woche abgesamt. Dagegen untersuchten SULLIVAN und PICKETT (1975) zusätzlich eine zweimalige Samenentnahme pro Tag und konnten bestätigen, dass eine kurz aufeinanderfolgende zweite Samenentnahme zu einer Reduzierung des nativen Volumens führt ($p = 0,01$). PICKETT et al. (1975b) können hierzu ähnliche Ergebnisse vorweisen. In den eigenen Untersuchungen konnte ein Einfluss des Alters auf diese Entwicklung nicht nachgewiesen werden ($p = 0,24$). DOWSETT und KNOTT (1996) berichten, dass ein vermindertes Ejakulatvolumen hauptsächlich bei Hengsten unter drei Jahren zu finden ist. In ihren Untersuchungen bestätigen sie zusätzlich, dass das Alter einen generellen Einfluss auf die Spermaqualität hat. Hengste, welche jünger als drei Jahre bzw. älter als 14 Jahre sind, hätten eine schlechtere Samenqualität als andere. Als Begründung für die schlechteren Spermaqualitäten älterer Hengste (11 Jahre und älter) nennen die Autoren ein kritisches Alter, ab welchem Hengste eine vermehrte Anzahl an abnormalen Samenzellen produzieren. Dies ist wiederum auf eine mit zunehmendem Alter stattfindende fehlerhafte Spermatogenese bzw. mangelhafte Nebenhodenfunktion zurückzuführen. SIEME et al. (2004) bestätigen, dass mit zunehmendem Alter der Hengste die Fruchtbarkeit abnimmt.

Entsprechend dem stetig verminderten Volumen während der eigenen Untersuchungen wurden auch die Spermienkonzentration der Ejakulate und somit auch die Gesamtpermienzahl reduziert. Die Spermienkonzentration pro Milliliter reduzierte sich innerhalb von 24 Stunden von anfänglich durchschnittlich 297,34 Millionen Samenzellen pro Milliliter auf 278,69 Mio./ml. Dies entspricht einer Reduzierung von ca. 6,3 %. Die Untersuchung ergab am dritten

Samenentnahmetermin (48 Stunden nach dem zweiten Untersuchungszeitpunkt) nochmals eine reduzierte Samenzellkonzentration um ca. 2,5 % ausgehend vom zweiten Samenentnahmetermin. Die Gesamtspermienzahl wurde vom ersten zum zweiten Untersuchungstag um 19,1 % und vom zweiten zum dritten Untersuchungstag um circa 10,9 % reduziert. Die Reduzierung der Samenzellkonzentration pro Milliliter war bezogen auf den Samenentnahmezeitpunkt statistisch nicht signifikant ($p = 0,25$). Bezogen auf die Reduzierung der Gesamtspermienzahl konnte dagegen eine hohe statistische Signifikanz des Samenentnahmezeitpunktes nachgewiesen werden ($p = 0,0002$). In den Untersuchungen von PICKETT et al. (1975b) konnte ebenfalls eine Reduzierung der Samenzellkonzentration pro Milliliter mit steigender Ejakulationsfrequenz erzielt werden. Hengste, welchen dreimal wöchentlich Sperma entnommen wurde, hatten eine um 14 % reduzierte Spermienkonzentration im Vergleich mit einmaliger Samenentnahme pro Woche. Bei Steigerung der Ejakulationsfrequenz auf sechsmal pro Woche wurde die Samenzellkonzentration sogar um ca. 50 % reduziert. Die Ejakulationsfrequenz war mit dieser Entwicklung statistisch signifikant ($p < 0,01$). Für die Gesamtspermienzahl pro Ejakulat konnten die Autoren ebenfalls einen statistisch signifikanten Einfluss der Ejakulationsfrequenz nachweisen ($p < 0,01$). Zu ähnlichen Resultaten sind die Untersuchungen von SULLIVAN und PICKETT (1975) gekommen. Mit steigender Ejakulationsfrequenz reduzierte sich sowohl die Spermienkonzentration pro Milliliter als auch die Gesamtspermienzahl der Ejakulate. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von MAGISTRINI et al. (1987). Eine hohe Ejakulationsfrequenz führt zu einer Reduzierung der Gesamtspermienzahl pro Ejakulat ($p < 0,01$). SIEME et al. (2002) konnten diese Ergebnisse ebenfalls bestätigen. Bei täglicher Samenentnahme waren in ihren Untersuchungen sowohl die Samenzellkonzentration als auch die Gesamtspermienzahl niedriger als im 48-Stunden-Samenentnahmeintervall. Bei Erhöhung der Ejakulationsfrequenz auf zweimal täglich (innerhalb einer Stunde) wurden sowohl die Spermienkonzentration als auch die Gesamtspermienzahl reduziert ($p < 0,05$). Zu ähnlichen Ergebnissen sind auch PICKETT et al. (1975b) gekommen. Bei Erhöhung der Ejakulationsfrequenz auf zweimal täglich (innerhalb einer Stunde) reduziert sich sowohl die Spermienkonzentration pro Milliliter ($p < 0,05$) und auch die Gesamtspermienzahl ($p < 0,01$). In Ihren Untersuchungen hat sich die

Gesamtspermienzahl sogar um 45,8 % reduziert. In den eigenen Untersuchungen konnte kein Einfluss des Alters auf diese Reduzierungen nachgewiesen werden (Samenzellkonzentration $p = 0,16$ bzw. Gesamtspermienzahl $p = 0,79$).

Es muss aber angemerkt werden, dass sowohl die Spermienkonzentration pro Milliliter als auch die Gesamtspermienzahl der nativen Ejakulate vom Alter der Hengste beeinflusst sein können. Hengste mit einem Alter von 12 bzw. 13 Jahren haben im Vergleich zu anderen Altersgruppen die höchste Spermienkonzentration pro Milliliter, während sowohl fünfjährige als auch dreizehnjährige Hengste die höchsten Gesamtspermienzahl pro Ejakulat aufweisen (DOWSETT und KNOTT 1996).

Die Gesamtmotilität der Spermien der nativen Ejakulate wurde in vorwärts-, orts- und unbewegliche Samenzellen unterteilt. Während der Untersuchung wurde der Anteil progressiv motiler Spermien von anfänglich durchschnittlich 45,2 % am ersten Samenentnahmetermin auf 46,2 % gesteigert. Dies entspricht einer Steigerung von progressiv motilen Zellen von 2,2 % innerhalb von 24 Stunden. Vom zweiten zum dritten Untersuchungstag konnte dieser Anteil nochmals um 8,2 % gesteigert werden. Der Anteil nicht motiler Samenzellen hat sich innerhalb des Untersuchungszeitraumes von durchschnittlich 25,2 % an den ersten beiden Untersuchungstagen auf 21,4 % am dritten Untersuchungstag reduziert. Der Samenentnahmezeitpunkt war auf die Entwicklung dieser beiden Parameter jeweils statistisch hoch signifikant (gMot, $p < 0,0001$) bzw. statistisch signifikant ($p = 0,0002$). Der Anteil ortsbeweglicher Samenzellen wurde von durchschnittlich 29,7 % auf 28,6 % reduziert. Der Samenentnahmezeitpunkt war hierbei nicht signifikant ($p = 0,17$). Diese Ergebnisse decken sich teilweise mit denen anderer Autoren. In den Untersuchungen von PICKETT et al. (1975b) konnte durch eine Erhöhung der Ejakulationsfrequenz von dreimal auf sechsmal wöchentlich eine Steigerung der Motilität von lediglich 52 % auf 56 % erzielt werden. Dies erfolgte jedoch erst nach einer Depletionsphase der Hengste von zwei Wochen. Nach Meinung der Autoren hat die Ejakulationsfrequenz statistisch keinen Einfluss auf die progressive Motilität der Samenzellen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von THOMPSON et al. (1977). In ihren Untersuchungen wurden durch ein Ein-stunden und 24-Stunden-Samenentnahmeintervall nur minimale Unterschiede in der Motilität der Samenzellen erzielt, die statistisch jedoch nicht signifikant waren. MAGISTRINI et al. (1987) bestätigen den Effekt, das durch eine hohe Ejakulationsfrequenz die Beweglichkeit der Samenzellen verbessert werden. Ihre

Ergebnisse waren statistisch signifikant ($p < 0,05$). SIEME et al. (2004) verglichen in ihren Untersuchungen ein 24-bzw. 48-Stunden-Samenentnahmeintervall, in welchem zusätzlich eine zweite Samenentnahme, eine Stunde nach der ersten, im 48-stündlichen Intervall durchgeführt wurde. Auch hierbei war bei der täglichen Samenentnahme die progressive Motilität der Spermien im Vergleich zum Erstejakulat, welches alle 48 Stunden abgenommen wurde (64,6 % bzw. 67,0 %), nur geringgradig niedriger. Im zweiten Ejakulat des 48-Stunden Samenentnahmeintervalls war die progressive Motilität jedoch nur um 0,6 % höher als im Erstejakulat des zweitäglichen Rhythmus. Der Einfluss der Samenentnahmefrequenz war statistisch signifikant. Bei Untersuchungen von BRINSKO et al. (2004) wurden den Hengsten drei Ejakulate entnommen. Die zweite Samenentnahme folgte eine Stunde nach der ersten, die dritte Samenentnahme dann nach 24 Stunden. Hinsichtlich der Gesamtmotilität der Samenzellen konnten sie jedoch keine Unterschiede zwischen dem ersten und dem dritten Ejakulat feststellen ($p > 0,1$). Der Anteil progressiv beweglicher Spermien war im Drittejakulat mit 57 ± 14 % im Vergleich zum Erstejakulat mit 51 ± 14 % jedoch höher und statistisch signifikant ($p = 0,036$). In ihren Untersuchungen wurden die Hengste nach einer Deckruhe von 7 Tagen und ohne vorangegangene Depletionsphase untersucht.

Dies deckt sich mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchung. Der Samenentnahmezeitpunkt hat Einfluss auf die Entwicklung des Anteils progressiv motiler Spermien Einfluss ($p < 0,0001$). Ein Einfluss des Alters der Hengste auf die Entwicklung des Anteils progressiver Spermien bzw. unbeweglicher Samenzellen konnte in den eigenen Untersuchungen hingegen nicht festgestellt werden ($p = 0,24$ bzw. $p = 0,44$).

Der Anteil an lebenden und toten Spermien veränderte sich während des Untersuchungszeitraumes. Der Anteil lebender Spermien betrug im Erstejakulat durchschnittlich 79,8 Samenzellen von 100 ausgezählten Spermien. Dieser Wert konnte bereits, wenn auch nur minimal, nach 24 Stunden auf 80,2 lebende Spermien erhöht werden. Nach 48 Stunden betrug dieser Wert 83,9 Spermien pro 100. Der Anteil toter Samenzellen reduzierte sich entsprechend. Dies entspricht einer Steigerung lebender Samenzellen in den ersten 24 Stunden um 0,5 %. Am dritten Samenentnahmetermin konnte eine Steigerung gegenüber der zweiten Samenentnahme von 4,6 % erreicht werden. Der Samenentnahmetermin war auf die

Entwicklung des Anteil lebender sowie toter Samenzellen statistisch hoch signifikant (jeweils $p < 0,001$). In den Untersuchungen von SIEME et al. (2004) lag der Anteil lebender Spermien bei täglicher Samenentnahme bei durchschnittlich 84,1 %. In dem ersten Ejakulat, welches nach 48 Stunden entnommen wurde, wurde dieser Anteil auf 86 % gesteigert. Diese Entwicklung deckt sich mit den eigenen Untersuchungen. Ein Einfluss des Alters der Hengste auf die Entwicklung der Anteile vitaler bzw. toter Samenzellen konnte in den eigenen Untersuchungen nicht belegt werden ($p = 0,37$). DOWSETT und KNOTT (1996) konnten dagegen eine statistische Signifikanz des Alters in Bezug auf den Anteil toter Samenzellen nachweisen ($p < 0,01$). In ihren Untersuchungen wurden vermehrt tote Samenzellen bei Hengsten, welche jünger als 3 Jahre alt sind, nachgewiesen. Auch Hengste im Alter von 9, 10 und über 14 Jahren hatten im Vergleich zu anderen Altersgruppen vermehrt tote Spermien.

Die Anzahl der nativen Ejakulate, welche die Mindestanforderungen nach Expertenmeinung erfüllen (SIEME, 2009; KLUG und SIEME, 2003), wurde durch die mehrmalige Samenentnahme gesteigert. Innerhalb von 24 Stunden ist der Anteil an verwertbaren Ejakulaten um 3,4 %, nach weiteren 48 Stunden nochmals um 17,2 % gestiegen. Der Samenentnahmezeitpunkt hatte somit einen statistisch signifikanten Einfluss ($p = 0,0019$). In den eigenen Untersuchungen lag die Spermienkonzentration durchschnittlich über 200 Millionen Samenzellen und erfüllte eine der Anforderungen der Experten. Die progressive Motilität wurde jedoch durch die mehrmalige Samenentnahme von durchschnittlich 45,1 % auf 50% gesteigert. Dadurch erfolgte eine Steigerung der nach Expertenmeinung verwertbaren Ejakulate für die Kryokonservierung. Diese Ergebnisse decken sich mit den Empfehlungen von SIEME (2011a), wonach Hengsten nach einer längeren Deckruhe mehrmalig Samen entnommen werden sollte, bis sich die extragonadalen Spermienreserven stabilisiert haben und eine gute spermatologische Qualität der Ejakulate erreicht ist. Erst dann sollten die Hengste für die Kryokonservierung genutzt werden. Die Mehrzahl an Einrichtungen, welche Tiefgefriersperma produzieren, entnehmen zwei bis drei Ejakulate von sexuell ausgeruhten Hengsten bevor die Tiefgefrierung der Ejakulate vorgenommen wird (SAMPER und MORRIS, 1998). Die Dauer dieser Depletionsphase sollte dabei dem individuellen Samenzellbildungsvermögen der Hengste angepasst werden (SIEME et al., 1998).

5.3.2 Spermatologische Parameter der aufgetauten Besamungsportionen

In der Literatur sind vergleichbare Studien bzw. Untersuchungen zu den eigenen nicht zu finden. Die meisten Untersuchungsergebnisse stammen von Hengsten, bei denen vor den eigentlichen Untersuchungen eine mehrmalige Samenentnahme stattgefunden hat, um die extragonadalen Spermienreserven zu beseitigen bzw. zu stabilisieren. Des Weiteren wurde die Ejakulationsfrequenz in keiner bekannten Untersuchung in Zusammenhang mit der Tiefgefriereignung untersucht. Die hinzugezogenen Untersuchungen beziehen sich hauptsächlich auf native Ejakulate und Frischsamenuntersuchungen, kaum jedoch auf Tiefgefriersperma (SULLIVAN und PICKETT, 1975; PICKETT et al., 1975b; PICKETT et al., 1985, SIEME et al., 2004).

Die progressive Motilität der aufgetauten Samenproben wurde anfänglich geringgradig um 0,6 % reduziert, um am dritten Samenentnahmeternin deutlich auf durchschnittlich 26,6 % progressiv motiler Spermien anzusteigen. Die Gesamtmotilität zeigte eine ähnliche Tendenz wie die progressive Motilität. Es ist ebenfalls nach 24 Stunden (2. Samenentnahmeternin) eine geringgradige Reduzierung der Gesamtmotilität eingetreten, die nach anschließend 48 Stunden auf durchschnittlich 39,8 % gesteigert wurde. In den Untersuchungen von SIEME et al. (2004) war der Anteil progressiv motiler Samenzellen im 48-Stunden-Entnahmeintervall mit 43,3 % höher als bei täglicher Samenentnahme (38,1 %). Diese Untersuchung wurde jedoch nach zuvor durchgeführter Depletionsphase der Hengste durchgeführt, deckt sich aber insofern mit den eigenen Ergebnissen, dass die progressive Motilität der Samenzellen von Tiefgefriersperma im 48-Stunden Samenentnahmeintervall höher ist als bei täglicher Samenentnahme.

Verglichen mit Frischsamen hat kryokonserviertes und wieder aufgetautes Hengstesperma generell eine verminderte Gesamtmotilität und progressive Motilität der Samenzellen. Zusätzlich haben Spermien, welche beweglich sind, eine verringerte Amplitude der seitlichen Auslenkung der Spermienköpfe im Vergleich zu Frischsperma (BLACH et al., 1989). Es ist von diversen Autoren berichtet worden, dass die progressive Motilität der Samenzellen nach dem Auftauvorgang wenigstens 30 % (LOOMIS und GRAHAM, 2008) bzw. mehr als 35 % der Gesamtmotilität betragen sollte (SAMPER und MORRIS, 1998; SIEME et al., 2001; VIDAMENT et al., 1997). In

den eigenen Untersuchungen konnte dieser Wert hingegen auch nach mehrmaliger Samenentnahme nicht erreicht werden. Bei Untersuchungen an Frischsamen ist die Entwicklung, dass bei mehrmaliger kurz hintereinander folgender Samenentnahme, die progressive Motilität der Samenzellen steigt, bereits beobachtet worden (BRINSKO et al., 2004). Bei Untersuchungen von SIEME et al. (2004) war die progressive Motilität in flüssigkonserviertem Samen hingegen im 48-Stunden Samenentnahmerhythmus am besten. Bei diesen Untersuchungen wurden die extragonadalen Spermienreserven der Hengste jedoch durch eine Depletionsphase stabilisiert.

In den Untersuchungen von BLACH et al. (1989) sind, abhängig von der Lagerungsdauer der kryokonservierten Samenproben, Werte von durchschnittlich 23,3% (mehr als 10 Tage Lagerungsdauer) bis 24,4 % (ein- bis dreistündige Lagerungsdauer) beschrieben worden. Das Samenentnahmeintervall betrug 48 Stunden nach vorangegangener Depletionsphase der Hengste. Da die tiefgefrorenen Samenproben in den eigenen Untersuchungen ebenfalls länger als 10 Tage in flüssigem Stickstoff gelagert worden sind, deckt sich dies annähernd mit den eigenen Ergebnissen der computergestützten Motilitätsanalyse. Der Samenentnahmezeitpunkt war in den eigenen Untersuchungen sowohl auf die Entwicklung der Gesamtmotilität ($p = 0,0013$) und der progressiven Motilität ($p = 0,0016$) in den aufgetauten Besamungsportionen statistisch signifikant. Das Alter der Hengste hatte hingegen keinen Einfluss auf die Entwicklung der Gesamtmotilität ($p = 0,26$) bzw. auf die progressive Motilität der Samenzellen ($p = 0,19$).

Der Anteil lebender Spermien wurde während des Untersuchungszeitraumes stetig gesteigert. Nach 24 Stunden war die Steigerung von anfänglich durchschnittlich 48,8 Samenzellen auf 52,3 Spermien (Steigerung ca. 7,2 %) geringer als nach 48 Stunden Deckruhe zwischen dem zweiten und dem dritten Samenentnahmeterrain. In diesem Intervall ist der Anteil lebender Samenzellen deutlich angestiegen (13,3 %). Der Anteil toter Samenzellen hat sich entsprechend der Anteile vitaler Spermien gegensätzlich entwickelt. Der Samenentnahmezeitpunkt war statistisch signifikant ($p = 0,0003$). Dies deckt sich mit Untersuchungen von SIEME et al. (2004). Bei täglicher Samenentnahme war der Anteil lebender Spermien in aufgetauten Samenportionen mit durchschnittlich 64,1 % geringer als im 48-Stunden Samenentnahmeintervall (durchschnittlich 71,6 %). Der Einfluss des Alters der Hengste war auf diese Entwicklung in den eigenen Untersuchungen jedoch statistisch nicht signifikant. Die Streckenparameter DAP und

DCL der einzelnen Spermien wurden durch die mehrmalige Samenentnahme ebenfalls gesteigert. Die durchschnittliche Wegstrecke (DAP) der Samenzellen steigerte sich innerhalb von 24 Stunden um ca. 6,3 % (durchschnittlich 22,8 zu 24,2). Im Vergleich dazu wurde zwischen dem zweiten und dritten Samenentnahmetermin dieser Wert nur noch um 3,9 % gesteigert (im Durchschnitt 25,2). Die gekrümmte Wegstrecke (DCL) zeigte eine ähnliche Tendenz.

Auch hier war die Steigerung innerhalb der ersten 24 Stunden deutlicher als zwischen den folgenden Untersuchungstagen (8,7 % bzw. 4,9 %). Die gerade Wegstrecke (DSL) der Spermien wurde anfänglich von durchschnittlich 17,2 auf 18,3 μm gesteigert. Nach 48 Stunden wurde dieser Wert jedoch wieder auf durchschnittlich 18,25 μm reduziert. Sowohl die kurvilineare Geschwindigkeit (VCL) als auch die Durchschnittsgeschwindigkeit (VAP) der Samenzellen wurde durch eine mehrmalige Samenentnahme gesteigert. Die kurvilineare Geschwindigkeit (VCL) wurde vom ersten zum zweiten Samenentnahmetermin um 6,6 % (durchschnittlich 94,5 zu 100,7 $\mu\text{m}/\text{sec}$) und anschließend nochmals um ca. 7,3 % gesteigert. Bei den Untersuchungen von BLACH et al. (1989), bei denen die Hengste im 48-Stunden-Samenentnahmeintervall abgesamt wurden, wurden Werte von 62,6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ erreicht. Die Durchschnittsgeschwindigkeit (VAP) der Spermien wurde zwischen den ersten beiden Untersuchungstagen um 4,2 % und vom zweiten zum dritten Untersuchungstag nochmals um 6 % gesteigert.

Dies deckt sich mit Ergebnissen von BRINSKO et al. (2004). In ihren Untersuchungen wurden sowohl die VCL als auch die VAP durch kurz hintereinander folgende Samenentnahme erhöht. Ihre Untersuchungen wurden jedoch an flüssigkonserviertem Sperma durchgeführt.

Die lineare Geschwindigkeit (VSL) wurde hingegen innerhalb der ersten 24 Stunden von anfänglich durchschnittlich 40,6 auf 43,3 $\mu\text{m}/\text{sec}$ erhöht (Steigerung um 6,7 Prozent). Am dritten Untersuchungstag war dieser Wert nur um 1,4 % gegenüber dem zweiten Samenentnahmetermin erhöht. Die Untersuchungsergebnisse von BLACH et al. (1989) liegen mit 37,6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ unter den eigenen Ergebnissen. Der Einfluss des Samenentnahmezeitpunktes bzw. des Alters war in den eigenen Untersuchungen statistisch jeweils nicht signifikant. Die ermittelten morphologischen Pathologien der Samenzellen (Kopfpathologien, Halsbrüche, Schwanzpathologien und Plasmotropfen) zeigten alle die gleiche Tendenz. Die Anteile an Spermien mit den genannten Defekten

reduzierten sich vom ersten zum zweiten Untersuchungstag deutlich. Als Ursache für die hohen Werte pathologisch veränderter Samenzellen am ersten Untersuchungstag muss die lange Lagerungszeit der Spermien im Nebenhodenschwanz in Betracht gezogen werden. Bei längerer Lagerungsdauer kann es zu Alterungsprozessen der Samenzellen kommen (AURICH, 2009), wobei ein schädlicher, lagerungsbedingter Einfluss im Nebenhodenschwanz auch ohne morphologische Veränderungen der Spermien ablaufen kann (BRINSKO et al., 2004).

Am dritten Untersuchungstag (48-Stunden-Intervall) entwickelten sich die Anteile dieser Spermien nahezu an die Ausgangswerte bzw. darüber hinaus. In den Untersuchungen anderer Autoren war der Anteil an Spermien mit Schwanzveränderungen im täglichen Samenentnahmerhythmus höher als bei Samenentnahme, welche alle 48 Stunden durchgeführt wurde. Der Gesamtanteil an Samenzellen mit pathologischen Veränderungen war bei täglicher Samenentnahme ebenfalls höher (SIEME et al., 2004). Dies sind jedoch Untersuchungen an flüssigkonserviertem Samen und somit nur bedingt mit kryokonservierten Samenproben zu vergleichen. Das Alter der Probanden hatte in den eigenen Untersuchungen keinen Einfluss. Dahingegen berichten DOWSETT und KNOTT (1996), dass das Alter der Hengste auf die Anteile an Samenzellen mit abnormen Köpfen und Schwänzen sowie losen Köpfen statistisch signifikant sei.

Der Samenentnahmezeitpunkt war auf diese Entwicklung teils statistisch hoch signifikant (lose Köpfe, schmale Köpfe, Doppelköpfe, aufgerollte Schwänze, abgeknickte Schwänze, schleifenförmige Schwänze, jeweils $p < 0,0001$) bzw. statistisch signifikant (Riesenköpfe, Halsbruch, Plasmotropfen, $p = 0,0004$, $p = 0,0007$, $p = 0,039$). Ein kurzes Samenentnahmeintervall scheint somit einen negativen Einfluss auf die Anteile an formnormalen Samenzellen zu haben. Diese Ergebnisse werden durch Untersuchungen von SIEME et al. (2004) bestätigt. Der erhöhte Anteil am dritten Untersuchungstag kann eventuell auf eine zeitbedingte, mangelhafte Reifung der Samenzellen im Nebenhodenkopf bzw. Nebenhodenkörper zurückgeführt werden. Jedoch ist eine gute Spermienmorphologie für die qualitative Beurteilung des Spermas sexuell nicht aktiver Hengste alleine nicht ausreichend (BRINSKO et al., 2004).

5.4 Fazit für die Praxis

Die mehrmalige Samenentnahme von Deckhengsten nach einer längeren Deckruhe ist in der Praxis ein gängiges Verfahren um qualitativ wertvollen Tiefgefriersamen zu produzieren. Dabei ist die Anzahl der eigentlichen Samenentnahmen vor Beginn der Kryokonservierung vom individuellen Hengst abhängig. Die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchung zeigen, dass die Produktion von Tiefgefriersamen beim individuellen Hengst auch ohne zuvor durchgeführte Depletionsphase vorgenommen werden kann. Dies sollte für Hengste mit z. B. orthopädischen Erkrankungen, bei denen eine mehrmalige Samenentnahme schädend bzw. nicht möglich ist, in Betracht gezogen werden. Jedoch muss angemerkt werden, dass sich fertilitätsrelevante bzw. spermatologische Parameter durch mehrere, im Abstand von 24 bzw. 48 Stunden durchgeführte Samenentnahmen, verbessern und somit höchstwahrscheinlich die Fruchtbarkeit der Hengste gesteigert werden kann.

6 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Ejakulationsfrequenz bei Hengsten nach Deckruhe ohne eine zuvor angepasste Depletionsphase auf die Tiefgefriereignung zu untersuchen. Hierzu standen 29 Hengste unterschiedlicher Rassen mit einem Lebensalter von vier bis 23 Jahren zur Verfügung. Sowohl die Untersuchung des Nativsamens als auch die Kryokonservierung wurden in den Laboren der jeweiligen Besamungsstationen durchgeführt. Die Untersuchung des aufgetauten Spermias erfolgte mittels eines CASA-Systems und einer Lebend-Tot-Färbung mittels Eosin-Nigrosin.

Es konnten folgende relevante Ergebnisse festgestellt werden:

- Bei der Untersuchung des Nativsamens kommt es während der drei aufeinanderfolgenden Samengewinnungen zu einer nicht signifikanten Reduktion des Volumens sowie der Samenzelldichte pro ml. Der Samenentnahmezeitpunkt war bei der Reduktion der Gesamtspermienzahl statistisch signifikant ($p = 0,0002$) und bei der Entwicklung der Anteile lebender und toter Samenzellen statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$).
- Die progressive Motilität der Spermien in den nativen Ejakulaten wurde durch die mehrmalige Samenentnahme statistisch hoch signifikant gesteigert ($p < 0,0001$). Der Anteil an unbeweglichen Spermien wurde statistisch signifikant reduziert ($p = 0,0002$).
- In den aufgetauten Samenproben wurde die progressive Motilität der Samenzellen durch die mehrmalige Samenentnahme in Bezug auf den Samenentnahmezeitpunkt statistisch signifikant gesteigert ($p = 0,0016$). Die Gesamtmotilität der Spermien wurde ebenfalls statistisch signifikant gesteigert ($p = 0,0013$).
- Die Streckenparameter der Spermien (DAP, DCL, DSL) in den aufgetauten Besamungsportionen wurden mit Ausnahme der DSL statistisch nicht signifikant gesteigert. Die Geschwindigkeitsparameter der Samenzellen der aufgetauten Samenportionen wurden während des Untersuchungszeitraumes stetig gesteigert. Auch hier konnte keine statistische Signifikanz ermittelt werden.

- Die Straightness wurde anfänglich gesteigert und am letzten Untersuchungstag wieder reduziert. Der Einfluss des Samenentnahmeterrmins auf die Entwicklung der Straightness war statistisch signifikant ($p = 0,05$). Die Wobble wurde dahingegen statistisch nicht signifikant reduziert.
- Das Alter der Hengste hatte auf die Steigerung der Beat Cross Frequency einen statistisch signifikanten Einfluss ($p = 0,04$).
- Die morphologische Untersuchung der Samenzellen erbrachte bei allen morphologisch untersuchten Abnormitäten die gleiche Entwicklung. Sowohl die Anteile mit Kopfpathologien, Schwanzpathologien, Halsbrüche und Spermien mit Plasmatropfen wurden zwischen dem ersten und zweiten Untersuchungstag reduziert und bei der dritten Untersuchung wieder auf das Ausgangsniveau bzw. darüber hinaus gesteigert. Mit Ausnahme des Anteils an Samenzellen mit aufgerollten Schwänzen, bei dem keine statistische Signifikanz des Samenentnahmezeitpunktes ermittelt werden konnte, war die Entwicklung aller anderer pathomorphologischen Veränderungen der Spermien in Bezug auf den Samenentnahmeterrmin statistisch signifikant bzw. statistisch hoch signifikant.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch eine mehrmalige, im 24- bzw. 48-Stundenintervall durchgeführte Samenentnahme die spermatologischen Parameter nativer und kryokonservierter equiner Ejakulate gesteigert bzw. verbessert werden können. Jedoch muss angemerkt werden, dass bereits fast die Hälfte aller Erstejakulate, ohne eine zuvor durchgeführte Depletionsphase der Hengste, die Mindestanforderungen von Experten hinsichtlich Samenzellkonzentration und progressiver Motilität für die Kryokonservierung erfüllt haben.

Die Mindestanforderungen nach Expertenmeinung an Gesamt- und progressiver Motilität aufgetauter Besamungsportionen wurden an keinen der drei Untersuchungstage erreicht. Es erfolgte jedoch eine stetiger Verbesserung der Gesamt- und progressiven Motilität der kryokonservierten Besamungsportionen über die drei Samenentnahmeterrmine.

7 Summary

The aim of this study was, to examine the influence of ejaculation frequency in stallions without an adjusted depletion phase. For this purpose, 29 stallions of different breeds with an age between four to 23 years were available. The examinations of the raw semen as well as the cryoconservation were done in the particular semen collection centers. The examination of the thawed sperm samples employed a CASA-system and a live/dead staining using Eosin-Nigrosin.

The following relevant result were noted:

- The examination of the nativ semen showed a non significant reduction of the volume as well as the semen cell density per ml throughout the three repeated collections. The time of sperm-collection was statistically significant in terms of the total sperm number ($p = 0.0002$) and statistically highly significant in terms of the amount of living and dead sperm cells ($p < 0.0001$).
- In the nativ ejaculates the progressive motility were statistically highly increased ($p < 0.0001$) due to the repeated collection. The amount of immobile sperms was statistically significantly reduced ($p = 0.0002$).
- In the defrosted semen samples the progressive motility was, due to the sperm-collection time point, statistically significant increased ($p = 0.0016$). Furthermore the general sperm-motility was statistically significant increased ($p = 0.0013$).
- The track parameters of the sperms (DAP, DCL, DSL) in the defrosted semen proportions were, except for the DSL, not statistically significantly increased. The sperm cells of the defrosted semen proportion showed a steady increase of the speed parameters throughout the whole examination period. Here, too no statistical significance was ascertained.
- The straightness was initially increased and the reduced again on the last examination day. The influence of the date of semen-collection on the development of the straightness was statistically significant ($p = 0.05$). On the other hand, die wobble wasn't statistically significantly reduced.

- The enhancement of the beat cross frequency was, in relation to the age of the stallions statistically significant ($p = 0.04$).
- The morphological examination of the sperm cells rendered the same trend for all morphological examined abnormalities. The amount of head pathologies, tail pathologies, neck fractures and sperms with drops of plasma were reduced between the first and second day of examination and returned to base level respectively increased beyond on the third day of examination. Except for the amount of sperm cells with coiled tails, which showed no statistical significance in connection to the date of semen collection, the development of all other pathomorphological mutations of the sperms were statistically significant or statistically highly significant.

The results of this work show, that due to a repeated semen collection, realized in a 24 respectively 48-hour interval, the sperm parameters of native and cryoconserved equine ejaculates have been increased respectively improved. Yet, it has been annotated that nearly half of all first-ejaculates already fulfilled the minimum requirement of experts regarding the sperm cell concentration and progressive motility for the cryoconservation without an earlier adjusted depletion phase of the stallions. The minimum decisions based on expert opinion as well as overall and progressive motivation insemination portions were checked after one of the three examination stages. However, there was a steady improvement in the overall and progressive motility of the cryopreserved insemination portions over the three semen collection dates.

Tab. 14: Parameter der untersuchten Nativejakulate bei dreimaliger Samenentnahme

Proband	Alter	Probe	Volumen in ml	Schleim- beimengung in ml	Farbe	Konsistenz	pH-Wert	Dichte in Mio./ml
1	8	1	15	0	weißlich	milchig	8	404
1	8	2	10	0	gräulich	milchig	8	427
1	8	3	10	0	weißlich	milchig	8	459
2	23	1	75	0	bräunlich- grau	wässrig	8	272
2	23	2	110	0	gräulich	wässrig	8	139
2	23	3	50	0	gräulich	wässrig	8	133
3	21	1	30	0	weiß	molzig	7,5	197
3	21	2	75	0	gräulich	wässrig	8	167
3	21	3	80	0	gräulich	wässrig	8	126
4	21	1	20	0	gräulich	molzig	8	192
4	21	2	15	0	gräulich	milchig	8	212
4	21	3	20	0	gräulich	molzig	8	187

Proband	Alter	Probe	Volumen in ml	Schleimbeimengungen in ml	Farbe	Konsistenz	pH-Wert	Dicht in Mio./ml
5	20	1	20	0	gelblich-weiß	milchig	8	307
5	20	2	15	0	gräulich	milchig	8	330
5	20	3	20	0	weißlich	milchig	8	286
6	5	1	30	0	gelblich-weiß	milchig	8	362
6	5	2	20	0	gräulich	milchig	8	344
6	5	3	25	0	gräulich	molzig	8	340
7	4	1	50	0	gräulich	milchig	7,5	427
7	4	2	20	0	gräulich	milchig	7,5	442
7	4	3	15	0	weißlich	milchig	7,5	359
8	13	1	25	0	gräulich	milchig	8	409
8	13	2	25	0	gräulich	milchig	8	370
8	13	3	30	0	gräulich	molzig	8	284
9	5	1	50	25	weißlich	molzig	8	229
9	5	2	25	0	weißlich	milchig	8	286
9	5	3	70	20	weißlich	wässrig	8	154
10	9	1	75	0	weißlich	molzig	7,5	190
10	9	2	90	0	weißlich	molzig	8	144

Proband	Alter	Probe	Volumen in ml	Schleimbeimengunge n in ml	Farbe	Konsistenz	pH-Wert	Dichte in Mto./ml
10	9	3	45	0	weißlich	molzig	8	160
11	16	1	95	0	weißlich	molzig	8	126
11	16	2	70	0	gelblich-weiß	wässrig	7,5	127
11	16	3	95	0	gelblich-weiß	wässrig	7,5	115
12	16	1	40	0	weißlich	milchig	7,5	421
12	16	2	45	0	gelblich-weiß	milchig	8	351
12	16	3	25	0	weißlich	milchig	7,5	389
13	17	1	35	0	gelblich-weiß	milchig	8	281
13	17	2	55	0	gelblich-weiß	molzig	8	214
13	17	3	35	0	gelblich-weiß	milchig	7,5	265
14	12	1	35	0	gelblich-weiß	milchig	8	233
14	12	2	20	0	weißlich	milchig	8	345

Proband	Alter	Probe	Volumen in ml	Schleimbeimengungen in ml	Farbe	Konsistenz	pH-Wert	Dichte in Mio./ml
14	12	3	35	0	gelblich-weiß	milchig	7,05	221
15	15	1	40	0	gelblich-weiß	milchig	7,5	307
15	15	2	15	0	weißlich	rahmig	8	450
15	15	3	25	0	gelblich-weiß	milchig	7,5	315
16	11	1	20	0	gelblich-weiß	milchig	7,5	468
16	11	2	20	0	weißlich	milchig	8	339
16	11	3	15	0	gelblich-weiß	rahmig	7,5	502
17	5	1	45	0	weißlich	milchig	7,5	277
17	5	2	60	0	weißlich	molzig	8	218
17	5	3	35	0	weißlich	milchig	7,5	272
18	7	1	45	0	gelblich-weiß	milchig	7,5	361
18	7	2	30	0	weißlich	milchig	7,5	329
18	7	3	30	0	weißlich	milchig	8	297

Proband	Alter	Probe	Volumen in ml	Schleimbeimengungen in ml	Farbe	Konsistenz	pH-Wert	Dichte in Mio./ml
19	13	1	35	0	gelblich-weiß	wässrig	7,05	114
19	13	2	40	15	gräulich	wässrig	8	108
19	13	3	65	0	gelblich-weiß	wässrig	8	117
20	17	1	40	0	bräunlich-grau	milchig	8	352
20	17	3	40	0	gelblich-weiß	milchig	7,5	307
21	7	1	30	0	weißlich	molzig	8	231
21	7	2	55	0	weißlich	wässrig	8	140
21	7	3	55	0	gräulich	molzig	8	218
22	17	1	25	0	gräulich	molzig	8	266
22	17	2	20	0	weißlich	milchig	8	308
22	17	3	15	0	gelblich-weiß	rahmig	8	417
23	20	1	40	0	gräulich	milchig	8	379
23	20	2	90	0	gräulich	wässrig	8	187
23	20	3	50	0	gräulich	molzig	8	190

Proband	Alter	Probe	Volumen in ml	Schleimbeimengunge n in ml	Farbe	Konsistenz	pH-Wert	Dichte in Mio./ml
23	20	3	50	0	grüulich	molzig	8	190
24	16	1	60	0	grüulich	milchig	8	319
24	16	2	45	0	grüulich	milchig	8	255
24	16	3	40	0	grüulich	milchig	8	286
25	7	1	45	0	grüulich	milchig	7,5	220
25	7	2	105	0	grüulich	wässrig	8	52
25	7	3	45	0	grüulich	molzig	8	289
26	4	1	55	0	grüulich	milchig	8	359
26	4	2	40	0	weißlich	milchig	8	369
26	4	3	45	0	grüulich	milchig	8	287
27	10	1	45	0	grüulich	molzig	8	175
27	10	2	45	0	grüulich	molzig	8	230
27	10	3	15	0	weißlich	rahmig	8	364
28	7	1	40	0	grüulich	milchig	8	372
28	7	2	30	0	weißlich	milchig	8	344
28	7	3	20	0	grüulich	milchig	8	297
29	9	1	30	0	weißlich	milchig	8	373
29	9	2	20	0	weißlich	rahmig	8	409
29	9	3	30	0	grüulich	milchig	7,5	243

Proband	Alter	Probe	GSZ Mrd.	Vorwärtsbewegung %	Ortsbewegung %	Unbeweglichkeit %	Lebende Spermien	Tote Spermien
1	8	1	6,6	50	30	20	79	11
1	8	2	4,27	50	30	20	81	19
1	8	3	4,59	50	30	20	80	20
2	23	1	20,4	40	30	30	75	25
2	23	2	15,29	40	30	30	73	27
2	23	3	6,65	40	30	30	81	19
3	21	1	5,91	40	30	30	82	18
3	21	2	12,525	40	30	30	77	19
3	21	3	10,08	50	30	20	81	19
4	21	1	3,84	50	30	20	83	17
4	21	2	3,18	50	30	20	85	15
4	21	3	3,74	50	30	20	83	17
5	20	1	6,14	50	30	20	80	20
5	20	2	4,95	60	20	20	82	18
5	20	3	5,72	60	20	20	87	13
6	5	1	10,86	50	30	20	79	21
6	5	2	6,88	60	20	20	84	16
6	5	3	8,5	60	20	20	87	13
7	4	1	21,35	50	30	20	86	14

Proband	Alter	Probe	GSZ Mrd.	Vorwärtsbewegung %	Ortsbewegung %	Unbeweglichkeit %	Lebende Spermien	Tote Spermien
7	4	2	8,84	60	20	20	81	19
7	4	3	5,385	60	20	20	84	16
8	13	1	10,225	40	30	30	78	22
8	13	2	9,25	40	30	30	75	25
8	13	3	8,52	50	30	20	81	19
9	5	1	11,45	50	30	20	85	19
9	5	2	7,15	50	30	20	83	17
9	5	3	7,7	50	30	20	88	12
10	9	1	14,25	50	30	20	82	18
10	9	2	12,96	40	30	30	81	19
10	9	3	7,2	50	30	20	86	14
11	16	1	11,97	40	30	30	75	25
11	16	2	8,89	30	30	40	72	28
11	16	3	10,925	40	30	30	80	20
12	16	1	16,84	50	30	20	82	18
12	16	2	15,795	50	30	20	81	19
12	16	3	9,725	50	30	20	81	19
13	17	1	9,835	40	30	30	80	20
13	17	2	11,77	40	30	30	85	15

Proband	Alter	Probe	GSZ Mrd.	Vorwärtsbewegung %	Ortsbewegung %	Unbeweglichkeit %	Lebende Spermien	Tote Spermien
13	17	3	9,275	50	30	20	84	16
14	12	1	8,155	40	30	30	78	22
14	12	2	6,9	40	30	30	77	23
14	12	3	7,735	50	30	20	81	19
15	15	1	12,28	50	30	20	84	16
15	15	2	6,75	50	30	20	83	17
15	15	3	7,875	50	30	20	85	15
16	11	1	9,36	50	30	20	80	20
16	11	2	6,78	40	30	30	78	22
16	11	3	7,53	50	30	20	87	13
17	5	1	12,465	40	30	30	74	26
17	5	2	13,08	40	30	30	77	23
17	5	3	9,52	50	30	20	80	20
18	7	1	16,245	50	30	20	85	15
18	7	2	9,87	50	30	20	83	17
18	7	3	8,91	50	30	20	85	15
19	13	1	3,99	40	30	30	80	20
19	13	2	2,7	40	30	30	81	19
19	13	3	7,605	50	20	30	80	20

Proband	Alter	Probe	GSZ Mrd.	Vorwärtsbewegung %	Ortsbewegung %	Unbeweglichkeit %	Lebende Spermien	Tote Spermien
20	17	1	14,08	50	30	20	79	21
20	17	2	13,38	50	30	20	87	13
20	17	3	12,28	50	30	20	90	10
21	7	1	6,93	50	30	20	81	19
21	7	2	7,7	50	30	20	84	16
21	7	3	11,99	50	30	20	89	11
22	17	1	6,65	50	30	20	85	15
22	17	2	6,16	50	30	20	83	17
22	17	3	6,255	50	30	20	86	14
23	20	1	15,16	40	30	30	73	27
23	20	2	16,83	40	30	30	77	23
23	20	3	9,5	50	30	20	84	16
24	16	1	19,14	50	30	20	80	20
24	16	2	11,475	50	30	20	78	22
24	16	3	11,44	50	30	20	83	17
25	7	1	9,9	40	30	30	75	25
25	7	2	4,68	50	30	20	81	19
25	7	3	13,005	50	30	20	86	16
26	4	1	19,745	50	30	20	78	22

Proband	Alter	Probe	GSZ Mrd.	Vorwärtsbewegung %	Ortsbewegung %	Unbeweglichkeit %	Lebende Spermien	Tote Spermien
26	4	2	14,76	50	30	20	83	17
26	4	3	12,915	50	30	20	82	18
27	10	1	7,875	40	30	30	81	19
27	10	2	10,35	50	30	20	80	20
27	10	3	5,46	50	30	20	86	14
28	7	1	14,88	40	30	30	79	21
28	7	2	10,32	50	30	20	81	19
28	7	3	5,94	50	30	20	84	16
29	9	1	11,19	30	20	50	76	24
29	9	2	8,18	30	20	50	73	27
29	9	3	7,29	40	30	30	81	19

Tab. 15: Morphologische Parameter der Samenzellen bei dreimaliger Samenentnahme nach Kryokonservierung.

Proband	Alter	Probe	Lebende Spermien %	Tote Spermien %	Lose Köpfe %	Schmale Köpfe %	Doppelköpfe %	Riesenköpfe %
1	8	1	51	49	5	0	0	0
1	8	2	15,5	84,5	0	0	0	0
1	8	3	46	54	3	0	0	0
2	23	1	17,5	82,5	6,5	0	0	0
2	23	2	47	53	0	0	0	0
2	23	3	35	65	10,5	0	0,5	0
3	21	1	41	59	13	0	0	0
3	21	2	48	52	0	0	0	0
3	21	3	51	48	4,5	0	0,5	0
4	21	1	42,5	57,5	6	1	0	0
4	21	2	26,5	73,5	0	0	0	0
4	21	3	36	64	4	0	0,5	0,5
5	20	1	61,5	38,5	2	0	1	1,5
5	20	2	59,5	40,5	0	0	0	0
5	20	3	77,5	22,5	1	0	0,5	1
7	4	1	69	31	2,5	1	0	0,5
7	4	2	67,5	32,5	0	0	0	0
7	4	3	73,5	26,5	12,5	1	0	0

Proband	Alter	Probe	Lebende Spermien %	Tote Spermien %	Lose Köpfe %	Schmale Köpfe %	Doppelköpfe %	Riesenköpfe %
8	13	1	50	50	11	0	0	0
8	13	2	60	40	0	0	0	0
8	13	3	61	39	9	0	0	1,5
9	5	1	59,5	40,5	2,5	0	0	0
9	5	2	59	41	0	0	0	0
9	5	3	71	29	6	0	0	0
10	9	1	36	64	2	0	1	0
10	9	2	48	52	0	0	0	0
10	9	3	66	34	1	0	1	0
11	16	1	51	49	3	0	0,5	0
11	16	2	45,5	54,5	0	0	0	0
11	16	3	51	49	0,5	0,5	0	1
12	16	1	58,5	41,5	1,5	0	0	0
12	16	2	73	27	0	0	0	0
12	16	3	53,5	46,5	1,5	0	0	0
13	17	1	69,5	30,5	1,5	0	0	0
13	17	2	68	32	0	0	0	0
13	17	3	69	31	3,5	0	0	0
14	12	1	72	28	1,5	0	0	0,5

Proband	Alter	Probe	Lebende Spermien %	Tote Spermien %	Lose Köpfe %	Schmale Köpfe %	Doppelköpfe %	Riesenköpfe %
14	12	2	81	19	0	0	0	0
14	12	3	83	17	4	0	0	0,5
15	15	1	50,5	49,5	6	0	0	1
15	15	2	70,5	29,5	0	0	0	0
15	15	3	66,5	33,5	5,5	0	0	0
16	11	1	48	52	1,5	0	0	0
16	11	2	67,5	32,5	0,5	0	0	1,5
16	11	3	77,5	22,5	3	0	0	0
17	5	1	68	32	1	0,5	0	0
17	5	2	64,5	35,5	0	0	0	0
17	5	3	74	26	2	2	0	0
18	7	1	68	32	2	0	0	0
18	7	2	60	40	0	0	0	0
18	7	3	76	24	0	0	0	0
19	13	1	44	56	13	0	0	0
19	13	2	23	77	0	0	0	0
19	13	3	27	73	18	1	0	0
20	17	1	73	27	1,5	0	1	0
20	17	2	56	50	0	0	0	0

Proband	Alter	Probe	Lebende Spermien %	Tote Spermien %	Lose Köpfe %	Schmale Köpfe %	Doppelköpfe %	Riesenköpfe %
20	17	3	67	33	3,5	0	1	0
21	7	1	48	52	4	0	0	0
21	7	2	45	55	0	0	0	0
21	7	3	63	37	8	0	0	0
22	17	1	61	39	4	0	0	0
22	17	2	69,5	30,5	0	0	0	0
22	17	3	64	36	2	1	0	0
23	20	1	39,5	60,5	10	0	0	0
23	20	2	41	59	0	0	0	0
23	20	3	34	66	13	0	0	0
24	16	1	25,5	74,5	0	0	0	0
24	16	2	42	58	0	0	0	0
24	16	3	54	46	1,5	0	0	0
25	7	1	18	82	3,5	0	0	0
25	7	2	42	58	0	0	0	0
25	7	3	47	53	6	0	0	0
26	4	1	50	50	1	0	0	0
26	4	2	48	52	0	0	0	0
26	4	3	75	25	2	1	0	0

Proband	Alter	Probe	Lebende Spermien %	Tote Spermien %	Lose Köpfe %	Schmale Köpfe %	Doppelköpfe %	Riesenköpfe %
27	10	1	46	54	1,5	0	0	0
27	10	2	44,5	55,5	0	0	0	0
27	10	3	67	33	1	0	0	0
28	7	1	44	56	2	0	0	0
28	7	2	55	45	0	0	0	0
28	7	3	71	29	3	0	0	0
29	9	1	14	86	19	0	0	0
29	9	2	22	78	0	0	0	0
29	9	3	19,5	80,5	9	0	0	0

Proband	Alter	Probe	Plasmotropfen %	Halsbruch %	Abgeknickte Schwänze %	Aufgerollte Schwänze %	Schleifenförmige Schwänze %
1	8	1	5	0	4	0	0
1	8	2	0	0	0	0	0
1	8	3	0,5	0	18,5	0	0
2	23	1	0,5	0,5	3,5	0	1,5
2	23	2	0	0	0	0	0
2	23	3	0	0	6,5	1	1
3	21	1	0	1,5	5,5	0	0,5
3	21	2	0	0	0	0	0
3	21	3	0,5	2,5	7,5	0	1,5
4	21	1	0	0	7	0	0
4	21	2	0	0	0	0	0
4	21	3	0,5	1	21	0	0
5	20	1	0	0,5	5,5	0	0
5	20	2	0	0	0	0	0
5	20	3	0,5	0	5	0	0
6	5	1	0,5	0	20	0	0
6	5	2	0	0	0	0	0
6	5	3	1,5	0	11	0	0
7	4	1	1	1	15	0	0

Proband	Alter	Probe	Plasmotropfen %	Halsbruch %	Abgeknickte Schwänze %	Aufgerollte Schwänze %	Schleifenförmige Schwänze %
7	4	2	0	0	0	0	0
7	4	3	0,5	0	12,5	0	0
8	13	1	3	1,5	3	0,5	2,5
8	13	2	0	0	0	0	0
8	13	3	0	0	12,5	0	0
9	5	1	0	4,5	17	0,5	0
9	5	2	0	0	0	0	0
9	5	3	0	2,5	12	0,5	5
10	9	1	0	0	0,5	1	3,5
10	9	2	0	0	0	0	0
10	9	3	0	0	1,5	0	1
11	16	1	2,5	1	2,5	0	0
11	16	2	0	0	0	0	0
11	16	3	0,5	1,5	3	0	5,5
12	16	1	0	1,5	3,5	0	20,5
12	16	2	0	0	0	0	0
12	16	3	2	2,5	6	0	10,5
13	17	1	0,5	0	36,5	0	0
13	17	2	0	0	0	0	0

Proband	Alter	Probe	Plasmotropfen %	Halsbruch %	Abgeknickte Schwänze %	Aufgerollte Schwänze %	Schleifenförmige Schwänze %
13	17	3	0	0	26,5	0	0
14	12	1	0	0	2	0	0
14	12	2	0	0	0	0	0
14	12	3	0	0,5	0,5	0	1
15	15	1	1	1	11	0	1,5
15	15	2	0	0	0	0	0
15	15	3	0	1	3,5	0	0,5
16	11	1	0	0,5	9	1	3,5
16	11	2	0	1,5	5	0	1
16	11	3	1	1	8,5	0	1
17	5	1	0	0,5	0,5	0	0
17	5	2	0	0	0	0	0
17	5	3	0	0,5	1	0	0
18	7	1	0	0	6	0	1
18	7	2	0	0	0	0	0
18	7	3	2	1	12	1	1
19	13	1	1	0	8	13	3
19	13	2	0	0	0	0	0
19	13	3	0	0	4	11	2

Proband	Alter	Probe	Plasmatrophen %	Halsbruch %	Abgeknickte Schwänze %	Aufgerollte Schwänze %	Schleifenförmige Schwänze %
20	17	1	3,5	0,5	10,5	0	2
20	17	2	0	0	0	0	0
20	17	3	0,5	2	6	0	2,5
21	7	1	0	1	27	0	0
21	7	2	0	0	0	0	0
21	7	3	2	0	21	0	0
22	17	1	4	1	9	1	1
22	17	2	0	0	0	0	0
22	17	3	0	0	7	1	2
23	20	1	0	0	14	0	0
23	20	2	0	0	0	0	0
23	20	3	1	1	12	1	4
24	16	1	0	0	0	0	0
24	16	2	0	0	0	0	0
24	16	3	0	0,5	6,5	0	7,5
25	7	1	0	0	4	0	2,5
25	7	2	0	0	0	0	0
25	7	3	1	1	7	0	5
26	4	1	0	0	7	0	1

Proband	Alter	Probe	Plasmotropfen %	Halsbruch %	Abgeknickte Schwänze %	Aufgerollte Schwänze %	Schleifenförmige Schwänze %
26	4	2	0	0	0	0	0
26	4	3	6	1	2	0	0
27	10	1	1,5	1	3	0	1
27	10	2	0	0	0	0	0
27	10	3	3	0	2	0	1
28	7	1	1	2	4,5	0	0,5
28	7	2	0	0	0	0	0
28	7	3	5	0	3	0	0
29	9	1	1	2	39	0	4
29	9	2	0	0	0	0	0
29	9	3	0	3	41	0	10

Tab. 16: Motilitätsparameter der Ejakulate bei dreimaliger Samenentnahme nach Kryokonservierung.

Proband	Alter	Probe	Gesamtmotilität %	Progressive Motilität %	DAP μm	DCL μm	DSL μm	VAP $\mu\text{m/sek}$	VCL $\mu\text{m/sek}$
1	8	1	45,19	32,15	30,29	51,42	23,22	71,12	120,53
1	8	2	12,1	4,77	18,52	30,67	14,26	47,52	77,65
1	8	3	43,51	21,91	21,03	35,65	14,21	51,37	86,91
2	23	1	7,97	1,57	19,68	28,35	17,33	45,36	63,69
2	23	2	18,28	7,42	25,19	46,81	21,09	58,7	106,83
2	23	3	29,35	4,47	15,07	24,17	11,84	37,67	59,56
3	21	1	21,79	9,33	17,9	29,95	12,81	42,27	70,12
3	21	2	22,41	11,3	19,58	34,1	14,33	47,6	82,21
3	21	3	16,03	8,35	18,18	32,13	12,38	46,82	82,35
4	21	1	6,37	1,38	11,86	17,48	8,37	29,29	42,13
4	21	2	6,17	1,47	9,57	11,06	9,16	25,77	29,66
4	21	3	13,83	4,83	23,54	43,08	16,91	57,11	104,78
5	20	1	45,7	22,07	19,64	31,67	12,78	48,03	76,72
5	20	2	49,36	32,12	29,7	56,07	20,21	71,32	133,75
5	20	3	72,98	55,74	32,75	61,56	17,98	78,48	147,07
6	5	1	36,48	10,55	18,83	35,56	13,07	45,62	85
6	5	2	41,46	21,88	20,72	37,66	13,72	50,05	90,24
6	5	3	36,62	12,48	19,79	39,24	13,24	48,21	94,24

Proband	Alter	Probe	Gesamtmotilität %	Progressive Motilität %	DAP µm	DCL µm	DSL µm	VAP µm/sek	VCL µm/sek
7	4	1	64,09	48,89	26,76	51,4	16,31	65,35	124,92
7	4	2	56,07	42,53	26,46	47,92	18,49	62,11	112,1
7	4	3	67,07	54,54	29,78	55,35	19,97	73,07	135,5
8	13	1	47,1	30,88	26,87	49,12	19,23	62,89	115,01
8	13	2	57,3	32,6	18,91	30,27	11,92	46,99	74,72
8	13	3	59,78	37,13	21,18	35,58	12,81	52,4	87,55
9	5	1	37,09	19,31	21,65	39,67	14,19	50,78	91,76
9	5	2	54,49	40	28,3	50,57	21,3	65,53	116,73
9	5	3	69,79	58,62	35,06	61,16	26,98	81,93	142,43
10	9	1	26,91	16,97	17,9	25,83	11,73	45,85	65,65
10	9	2	32,43	23,65	33,09	57,23	26,14	74,49	128,62
10	9	3	32,8	22,98	34,8	61,27	26,62	78,31	137,12
11	16	1	12,55	4,56	22,71	47,71	16,22	53,53	111,45
11	16	2	14,8	8,02	23,62	46,58	17,29	55,79	108,63
11	16	3	8,31	5,87	25,88	49,99	21,65	63,45	122,73
12	16	1	41,52	16,44	16,68	28,16	11,53	40,28	67,17
12	16	2	34,22	14,96	21,06	39,03	14,54	47,15	87,27
12	16	3	19,48	10,74	21,95	43,53	16,51	47,44	93,79
13	17	1	21,96	8,33	16,4	26,34	11,06	41,55	65,49

Proband	Alter	Probe	Gesamtmotilität %	Progressive Motilität %	DAP µm	DCL µm	DSL µm	VAP µm/sek	VCL µm/sek
13	17	2	10,08	3,76	12,35	16,81	9,15	35,23	46,97
13	17	3	17,19	8,59	20,56	35,06	15,9	50,58	86,2
14	12	1	50,85	41,79	33,62	59,7	26,02	77,08	136,95
14	12	2	51,02	41,38	34,92	64,14	27,22	81,26	149,48
14	12	3	56,63	50,65	36,16	71,68	28,44	81,78	161,74
15	15	1	43,07	30,27	27,78	50,14	20,73	65,54	118,28
15	15	2	64,07	49,46	27,69	49,95	19,33	66,41	119,4
15	15	3	57,49	44,78	29,18	55,95	19,74	70,02	133,84
16	11	1	47,88	34,16	26,04	46,05	18,31	62,38	109,71
16	11	2	22,08	8,37	15,75	31,97	10,17	36,34	73,67
16	11	3	43,56	20,13	16,5	31,71	10,66	40,21	76,15
17	5	1	21,19	14,92	30	56,31	23,31	69,54	130,5
17	5	2	20,96	11,51	24,72	44,7	18,58	58,74	105,15
17	5	3	18,58	7,15	19,15	34,32	11,05	43,12	76,62
18	7	1	47,11	23,95	26,5	46,8	20,29	61,83	108,43
18	7	2	28,32	19,21	25,28	44,58	20,75	56,52	99,53
18	7	3	51,87	37,12	26,25	46,71	17,95	62,61	110,98
19	13	1	26,95	14,76	26,12	41,37	21,54	64,04	100,88
19	13	2	10,67	4,37	30,88	55,22	24,24	68,61	123,61

Proband	Alter	Probe	Gesamtmotilität %	Progressive Motilität %	DAP µm	DCL µm	DSL µm	VAP µm/sek	VCL µm/sek
19	13	3	15,6	6,35	22,98	35,67	19,65	55,98	86,17
20	17	1	40,26	29,63	28,91	51,43	21,69	67,14	119,34
20	17	2	41,18	33,38	33,25	59,67	25,99	75,73	135,75
20	17	3	44,58	39,22	32,95	61	24,83	76,34	141,22
21	7	1	12,07	6,88	32,48	63,65	34,94	75,58	148,55
21	7	2	15,75	7,01	21,4	38,53	15,3	49,7	89,57
21	7	3	33,76	21,88	25,68	48,92	18	62,21	118,31
22	17	1	45,02	33,33	28,1	53,32	20,9	63,81	120,82
22	17	2	43,28	30,24	28,1	53,32	20,9	63,82	120,82
22	17	3	64,51	48,62	30,24	51,89	21,3	73,07	125,16
23	20	1	37,43	22,78	20,81	36,47	13,79	51,09	88,81
23	20	2	38,52	13,08	21,08	35,61	15,88	51,33	86,14
23	20	3	31,78	9,01	16,49	25	12,65	40,83	61,21
24	16	1	22,83	9,89	17,08	27,87	11,84	42,33	67,25
24	16	2	19,2	11,37	27,54	52,09	23,11	59,99	113,13
24	16	3	52,43	37,3	26,66	49,1	19,11	65,22	119,65
25	7	1	17,45	9,33	23,2	35,62	17,85	54,8	83,74
25	7	2	18,57	10,32	30,66	53,25	23,49	73,32	126,35
25	7	3	44,93	37,51	34,49	61,67	25,5	80,39	143,47

Proband	Alter	Probe	Gesamtmotilität %	Progressive Motilität %	DAP µm	DCL µm	DSL µm	VAP µm/sek	VCL µm/sek
26	4	1	29,3	14,39	18,6	31,47	14,35	46,59	78,43
26	4	2	46,29	38,44	31,64	57,57	24,92	70,7	128,37
26	4	3	40,45	31,9	31,92	58,13	26,16	71,76	130,21
27	10	1	32,4	17,77	24,47	42,88	19,9	58,69	102,4
27	10	2	36,42	23,79	27,98	49,63	22,16	64,66	114,42
27	10	3	63,11	46,3	27,37	49,22	19,22	66,5	119,25
28	7	1	16,62	8,92	19,66	33,22	15,86	48,58	80,88
28	7	2	30,68	22,44	23,41	42,51	19,25	52,11	94,46
28	7	3	30,35	16,75	19,95	36,2	15,6	47,81	86,2
29	9	1	13	4,33	11,73	16,09	9,94	33,2	44,34
29	9	2	18,27	5,58	12,85	18,2	10,51	33,34	45,98
29	9	3	18,72	9,44	16,17	23,09	12,5	45,92	63,9

Proband	Alter	Probe	VSL µm/sek	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
1	8	1	54,59	0,77	0,45	0,59	3,19	35,16
1	8	2	37,28	0,78	0,48	0,61	2,63	27,24
1	8	3	34,9	0,68	0,4	0,59	3,53	26,85
2	23	1	40,18	0,88	0,68	0,76	3,24	22,32
2	23	2	49,62	0,84	0,47	0,56	3,11	29,23
2	23	3	29,85	0,79	0,5	0,63	3,1	21,69
3	21	1	30,49	0,72	0,43	0,6	2,77	25,89
3	21	2	34,92	0,74	0,42	0,58	3,35	24,82
3	21	3	31,74	0,68	0,39	0,57	3,16	29,21
4	21	1	21,32	0,73	0,51	0,7	2,67	16,95
4	21	2	24,68	0,96	0,83	0,87	3,63	13,67
4	21	3	40,84	0,71	0,39	0,55	3,56	32,07
5	20	1	31,67	0,66	0,41	0,62	3,36	24,52
5	20	2	48,86	0,68	0,36	0,53	4,17	30,4
5	20	3	43,24	0,55	0,29	0,53	4,6	27,48
6	5	1	31,64	0,69	0,37	0,53	3,29	26,9
6	5	2	33,37	0,67	0,37	0,55	3,36	25,75
6	5	3	32,79	0,68	0,35	0,51	2,96	25,93
7	4	1	40,18	0,62	0,32	0,52	4,2	26,91

Proband	Alter	Probe	VSL µm/sek	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
7	4	2	43,45	0,7	0,39	0,55	3,47	33,93
7	4	3	49,49	0,68	0,37	0,54	3,94	34,99
8	13	1	45,27	0,72	0,39	0,54	3,63	32,11
8	13	2	29,95	0,63	0,4	0,63	3,56	22,84
8	13	3	32,11	0,61	0,36	0,6	3,49	26,21
9	5	1	33,44	0,66	0,36	0,55	3,32	26,43
9	5	2	49,47	0,75	0,42	0,56	3,38	34,76
9	5	3	63,3	0,77	0,44	0,57	3,64	39,95
10	9	1	30,63	0,67	0,47	0,7	3,63	20,88
10	9	2	59,1	0,79	0,46	0,58	3,18	36,45
10	9	3	60,1	0,77	0,44	0,57	3,18	39,06
11	16	1	38,67	0,72	0,35	0,48	3,28	30,11
11	16	2	40,92	0,73	0,37	0,51	3,72	28,9
11	16	3	53,15	0,83	0,43	0,52	3,03	35,39
12	16	1	28,15	0,7	0,42	0,6	3,1	24,79
12	16	2	32,6	0,69	0,38	0,54	2,76	29,07
12	16	3	35,66	0,75	0,38	0,5	2,43	36,11
13	17	1	29,21	0,69	0,43	0,63	2,66	27,44
13	17	2	26,37	0,75	0,56	0,75	3,02	18,82

Proband	Alter	Probe	VSL µm/sek	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
13	17	3	39,41	0,78	0,46	0,59	3,02	27,75
14	12	1	59,73	0,77	0,44	0,56	3,37	37,86
14	12	2	63,66	0,78	0,42	0,54	3,53	38,57
14	12	3	64,5	0,79	0,4	0,5	3,85	37,4
15	15	1	49,12	0,75	0,41	0,55	3,54	33,64
15	15	2	46,6	0,7	0,39	0,55	3,59	33,29
15	15	3	47,59	0,68	0,35	0,52	4,08	31,2
16	11	1	44,07	0,7	0,4	0,57	3,85	31,77
16	11	2	23,6	0,65	0,32	0,5	2,84	24,68
16	11	3	26,19	0,65	0,34	0,52	3,16	25,62
17	5	1	54,03	0,77	0,41	0,53	3,41	35,48
17	5	2	44,53	0,76	0,42	0,56	3,29	30,39
17	5	3	25,48	0,59	0,33	0,56	2,61	29,04
18	7	1	47,64	0,77	0,44	0,57	3,22	34,07
18	7	2	46,48	0,82	0,47	0,57	2,37	38,99
18	7	3	43,38	0,69	0,39	0,57	3,63	32,01
19	13	1	53,12	0,83	0,52	0,63	2,77	36,48
19	13	2	53,79	0,78	0,43	0,55	2,91	32,64
19	13	3	48,37	0,86	0,57	0,66	3,19	29,89

Proband	Alter	Probe	VSL µm/sek	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
20	17	1	50,17	0,75	0,42	0,56	3,36	34,78
20	17	2	59,35	0,78	0,44	0,56	3,29	39,37
20	17	3	57,76	0,76	0,41	0,54	3,64	37,07
21	7	1	57,63	0,76	0,39	0,51	3,76	35,9
21	7	2	35,77	0,72	0,4	0,55	3,11	24,66
21	7	3	43,87	0,7	0,37	0,53	3,76	28,77
22	17	1	47,41	0,74	0,39	0,52	3,25	31,4
22	17	2	47,41	0,74	0,39	0,53	3,25	31,4
22	17	3	51,97	0,71	0,41	0,58	3,52	33,65
23	20	1	34,04	0,66	0,38	0,58	3,56	28,17
23	20	2	38,8	0,75	0,45	0,59	3,13	26,05
23	20	3	31,71	0,78	0,51	0,66	3,3	22,17
24	16	1	29,92	0,7	0,44	0,63	3,11	21,56
24	16	2	50,47	0,84	0,45	0,53	3,11	31,9
24	16	3	47,03	0,72	0,39	0,54	3,45	32,12
25	7	1	42,08	0,77	0,5	0,65	3,58	26,77
25	7	2	56,62	0,78	0,45	0,58	3,11	38,92
25	7	3	59,83	0,75	0,42	0,56	3,56	38,36
26	4	1	36,04	0,77	0,46	0,59	3,11	28,91

Proband	Alter	Probe	VSL µm/sek	STR	LIN	WOB	ALH	BCF
26	4	2	55,74	0,79	0,43	0,55	3	39,02
26	4	3	58,85	0,82	0,45	0,55	2,95	41,33
27	10	1	47,91	0,81	0,47	0,57	2,94	35,05
27	10	2	51,34	0,79	0,45	0,56	3,15	37,64
27	10	3	47,1	0,7	0,39	0,55	3,57	33,08
28	7	1	39,35	0,81	0,48	0,6	3,16	31,5
28	7	2	42,91	0,82	0,45	0,55	2,4	37,87
28	7	3	37,29	0,78	0,43	0,55	2,73	34,07
29	9	1	28,62	0,86	0,64	0,75	3,62	9,62
29	9	2	27,67	0,83	0,6	0,73	3,73	16,9
29	9	3	35,86	0,78	0,56	0,72	4	18,08

9 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Entwicklung der Bedeckungsarten in der Warmblutpferdezucht FN (2017)

Abb. 2: Veränderung des Ejakulatvolumens von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als geometrischer Mittelwert und Streufaktor.

Abb. 3: Veränderung der Spermienkonzentration pro Milliliter nativer Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

Abb. 4: Veränderung der Gesamtspermienzahl nativer Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

Abb. 5: Veränderung der Spermienmotilitäten nativer Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

Abb. 6: Veränderung der Anteile lebender und toter Samenzellen nativer Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

Abb. 7: Veränderung der Gesamt- und progressiven Motilität aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

Abb. 8: Veränderung der Anteile an Spermien mit Kopfpathologien (lose Köpfe (L), schmale Köpfe (S), Doppelköpfe (D), Riesenköpfe (R)) in aufgetauten Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als Boxplot.

Abb. 9: Veränderung des Anteils an Spermien mit Halsbruch in aufgetauten Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als Boxplot.

Abb. 10: Veränderung des Anteils an Spermien mit Schwanzpathologien (aufgerollt (aufgero), abgeknickt (abgekni), schleifenförmig (schleif)) in aufgetauten Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als Boxplot.

Abb. 11: Veränderung des Anteils an Samenzellen mit Plasmotropfen aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als Boxplot.

Abb. 12: Veränderung der Anteile vitaler und toter Samenzellen kryokonservierter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung.

Abb. 13: Veränderung der Mindestanforderung an die Ejakulate nach Expertenmeinung von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine dargestellt als arithmetischer Mittelwert.

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Anzahl der EU-zugelassenen Pferdebesamungsstationen in Europa.
AURICH (2012)

Tab. 2: Anzahl der weltweiten zugelassenen Pferdebesamungsstationen für
den Import von Samen in die EU.
European Commission (2015)

Tab. 3: Ermittelte Motilitätsparameter mit dem CASA-System.

Tab. 4: Veränderung des Ejakulatvolumens von 29 Hengsten über drei
Samenentnahmetermine angegeben als geometrischer Mittelwert, Streufaktor,
Minimum und Maximum.

Tab. 5: Veränderung der Samenzellkonzentration und Gesamtspermienzahl nativer
Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als
arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

Tab. 6: Veränderung der geschätzten Spermienmotilitäten sowie Anteile lebender bzw.
toter Samenzellen nativer Ejakulate von 29 Hengsten über drei Samen-
entnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung,
Minimum und Maximum.

Tab. 7: Veränderung der Gesamt- (gMot) und progressiv (pMot) motilen Samenzellen
aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine
angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und
Maximum.

Tab. 8: Veränderung der einzelnen Motilitätsparameter der computer-assistierten
Spermienanalyse aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samen-
entnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung,
Minimum und Maximum.

Tab. 9: Veränderung der morphologischen Spermienkopfpathologien aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

Tab. 10: Veränderung des Anteils an Spermien mit Halsbruch aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

Tab. 11: Veränderung der morphologischen Spermischwanzpathologien aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

Tab. 12: Veränderung des Anteils an Samenzellen mit Plasmotropfen aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

Tab. 13: Veränderung der Anteile vitaler und toter Samenzellen aufgetauter Samenproben von 29 Hengsten über drei Samenentnahmetermine angegeben als arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Minimum und Maximum.

Tab. 14: Parameter der untersuchten Nativejakulate bei dreimaliger Samenentnahme.

Tab. 15: Morphologische Parameter der Samenzellen bei dreimaliger Samenentnahme nach Kryokonservierung.

Tab. 16: Motilitätsparameter der Ejakulate bei dreimaliger Samenentnahme nach Kryokonservierung.

11 **Literaturverzeichnis**

AEHNELT, E. (1953)

Zur Samenübertragung beim Pferd

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 60, 4-6

ALLEN, W. R. (2005)

The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding

Reproduction in Domestic Animals, 40 (4), 310–329

AMANN, R. P., und PICKETT, B. W. (1987)

Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa

Journal of Equine Veterinary Science, 7, Nr. 3, 145–173

AURICH, C. (2009)

Physiologie der Fortpflanzungsfunktionen beim Hengst

In: CHRISTINE AURICH (Hrsg.): Reproduktionsmedizin beim Pferd

Verlag Parey in MVS Medizinverlage, 2. Auflage, Stuttgart, 235- 249

AURICH, C. (2011)

Stand der instrumentellen Besamung in der Pferdezucht

Wiener Tierärztliche Monatsschrift – Vet. Med. Austria, 98, 150-155

AURICH, J. E. (2012)

Artificial Insemination in Horses- More than a Century of Practice and Research.

Journal of Equine Veterinary Science, 32(8), 458–463

AURICH, J. E., und AURICH, C. (2006)

Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction

Reproduction in Domestic Animals, 41 (4), 275–279

BADER, H. (1968)

Weitere Erfahrungen über die Tiefgefrierung von Hengstsperma
Zuchthygiene , 5, 87-88

BADER, H. und SIEME, H. (2007)

Künstliche Besamung beim Pferd

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

Schattauer Verlag, Stuttgart, 224-261

BALL, B. A. und VO, A. (2001)

Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential.

Journal of Andrology, 72, 1061-1069

BARKER, C. A., und GANDIER, J.C.C. (1957)

Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa

Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science, 21, 47-51

BLACH, E.L., AMANN, R.P., BOWEN, R.A. und FRANTZ, D. (1989)

Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membran integrity and motion characteristics

Theriogenology, 31 (2), 283- 298

BLOTTNER, S., WARNKE, C., TUCHSCHERER, A., HEINEN, V., und TORNER, H. (2001)

Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season

Animal Reproduction Science, 65 (1-2), 75–88

BOLLE, A. (1949)

Bekämpfung der Unfruchtbarkeit der Stuten

Tierzüchter, 1, 505-506

BOWEN, J.M. (1969)

Artificial insemination in the horse

Equine Veterinary Journal, 1, 89-110

BRINSKO, S. P. und VARNER, D.D. (1992)

Artificial insemination and preservation of semen

Veterinary clinics of North America: equine practice, 8, 205-218

BRINSKO, S. P., CROCKETT, E. C., und SQUIRES, E. L. (2000)

Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoalmotility after cooling and storage

Theriogenology, 54 (1), 129–136

BRINSKO, S.P., SPOONER, J.A., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.C. und VARNER, D.D. (2004)

Relationship among sperm membrane integrity, motility, and morphology in first and third ejaculates of sexually rested stallions

Proceedings of Annual Convention of American Association of equine Practitioners
50:502-504

BRITO, L. F. C., GREENE, L. M., KELLEMAN, A., KNOBBE, M., und TURNER, R. (2011)

Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation

Theriogenology, 76 (4), 745–50

BURNS, P. J. und REASNER, D.S. (1995)

Computerized analysis of sperm motion: Effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa

Journal of Equine Veterinary Science, 15, 337-380

CAPANNA, E. (1999)

Lazzaro Spallanzani: At the roots of modern biology

The Journal of Experimental Zoology, 285 (3), 178–96

COCHRAN, J. D., AMANN, R. P., FROMAN, D. P., und PICKETT, B. W. (1984)
Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 degrees C, freezing rate and
thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm.
Theriogenology, 22 (1), 25–38

CRISTANELLI, M. J., AMANN, R. P., SQUIRES, E. L., und PICKETT, B. W. (1985)
Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of
freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa
Theriogenology, 24(6), 681–686

CROCKETT, E. C., GRAHAM, J. K., BRUEMMER, J. E., und SQUIRES, E. L. (2001)
Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on
post thaw motility: preliminary results
Theriogenology, 55 (3), 793–803

DELIUS, D. (1985)
Untersuchungen zur Tiefgefrierung von Pferdesamen in 0,5 ml Volumeneinheiten mit
Hilfe computergesteuerter Einfrierprogramme
Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.med.vet.

DIXON, W.J. (1993) BMDP Statistical Software

DOTT, H. M. und G. C. FOSTER (1979)
The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the
area change frequency with an image analysing computer
Journal of Reproduction and Fertility, 55 (1), 161-166

DOWSETT, K.F. und KNOTT, L.M.(1996)
The influence of age and breed on stallion semen
Theriogenology, 46, 397-412

ECOT, P., DECUADRO-HANSEN, G., DELHOMME, G. und VIDAMENT, M. (2005)
Evaluation of a cushioned centrifugation technique for processing equine semen
Animal Reproduction Science, 89 (1-4), 245-248

EUROPEAN COMISSION (2015)

Directorate-General Health and Consumers.

Approved semen collection and storage centres and embryo collection and production
teams in EU Member States, Norway, other countries with special agreements

FN FÉDÉRATION NATIONALE (DEUTSCHE REITERLICHE VEREINIGUNG E.V.)
(2017)

Jahresbericht 2017

FN, Warendorf

GORUS, F. K und PIPELEERS, D.G. (1981)

A rapid method for fractionation of human spermatozoa according to their progressive
motility

Fertility and Sterility, 35, 662

GÖTZE, R. (1949)

Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere

Verlag M. & H. Schaper, Hannover

GRAHAM, J. K. (1996)

Cryopreservation of stallion spermatozoa

Veterinary clinics of north america: equine practice, 12 (1), 131-147

HEITLAND, A. V., JASKO, D.J., SQUIRES, E.L., GRAHAM, J.K., PICKETT B.W. und
HAMMILTON, C. (1996)

Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa

Equine Veterinary Journal, 28 (1), 47-53

IVANOFF, I. (1922)

On the use of artificial insemination for zootechnical purposes in Russia
Journal of Agricultural Science, 12, 244- 256

JANETT, F., THUN, R., NIEDERER, K., BURGER, D. und HÄSSIG, M. (2003)

Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion
Theriogenology, 60 (3), 453–61

JASKO, D.J., LITTLE, T.V., SMITH, K., LEIN, D.H. und FOOTE, R.H. (1988)

Objective analysis of stallion sperm motility
Theriogenology, 30, 1159- 1167

JOHNSON, L. (1991)

Seasonal differences in equine spermatocytogenesis
Biology of Reproduction, 44 (2), 284–91

KATILA, T. (2001)

In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review
Acta Veterinaria Scandinavica, 42, 199-217

KATILA, T., ANDERSSON, M., REILAS, T. und KOSKINEN, E. (2002)

Post- thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates
Theriogenology, 58, 241- 244

KLOPPE, L. H., VARNER, D. D., ELMORE, R. G., BRETZLAFF, K. N. und SHULL ,
J. W. (1988)

Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen thawed equine
spermatozoa
Theriogenology, 29, 429-444

KLUG, E. (1993a)

Frischsamenübertragung beim Pferd
Verlag M. & H. Schaper, 4. überarb. u. erw. Auflage, Hannover, 6-7

KLUG, E. (1993b)

Frischsamenübertragung beim Pferd

Verlag M. & H. Schaper, 4. überarb. u. erw. Auflage, Hannover, 57-70

KLUG, E. (2002)

Untersuchungen von Stute und Hengst auf Zuchttauglichkeit

Pferdeheilkunde, 18, 225- 229

KLUG, E., GÜNZEL, A. R., MERKT, H. und KRAUSE, D. (1977)

Untersuchungen von Hengsten zum Einsatz in der instrumentellen Samenübertragung mit Tiefgefriersperma

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 6, 236-238

KLUG, E. und SIEME, H. (2003)

Samenübertragung beim Pferd, 5. völlig überarb. Auflage

Verlag M. & H. Schaper, 5. völlig überarb. Auflage, Alfeld- Hannover

KLUG, E., SIEME, H. und PETERS, E. (1998)

Hygienegrundlagen zum Einsatz von Hengsten in der instrumentellen Samenübertragung

Tierärztliche Praxis, 26, 218-224

KNEIßL, S. (1993)

Tiefgefrierkonservierung von Pferdesperma: Einfluß der Samenentnahmetechnik, Zentrifugation, Konfektionierungsform und Einfriermethode auf die Motilität und Membranintegrität der Samenzellen

Diss.med.vet, Tierärztliche Hochschule Hannover

LEIDING, C. (2007)

Künstliche Besamung beim Rind

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

Verlag Schattauer, Stuttgart, 147- 197

LEIPOLD, S. D., GRAHAM, J.K., SQUIRES, E. L., MCCUE, P. M., BRINSKO, S.P. und VANDERWALL, D. K. (1998)

Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen
Theriogenology, 49, 1537-1543

LOOMIS, P. R. (2001)

The equine frozen semen industry
Animal Reproduction Science, 68 (3-4), 191–200

LOOMIS, P. R., AMANN, R. P., SQUIRES, E. L., und PICKETT, B. W. (1983)

Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws
Journal of Animal Science, 56 (3), 687–693

LOOMIS, P. R., und GRAHAM, J. K. (2008)

Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols
Animal Reproduction Science, 105(1-2), 119–218

MAGISTRINI, M., PH. CHANTELOUBE und E. PALMER (1987)

Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing
Journal of Reproduction and Fertility, Supplement, 35, 127-133

MAKLER, A., MURILLO, O., HUSZAR, G., TARLATZIS, B., DeCHERNEY, A. H. und NAFTOLIN, F. (1984)

Improved techniques for separation motile spermatozoa from human semen. I. A self-migratory technique
International Journal of Andrology, 7, 61

MARDEN, W., und WERTHESEN, N. T. (1956)

Influence of seminal fluid on sperm motility
Fertility and Sterility, 7, 508-515

MARTIN, J. C., und KLUG, E. (1979)

Zur Samenübertragung beim Pferd – Spermakonservierung in Kunststoffröhrchen
Der praktische Tierarzt, 3, 193-204

MARTIN, J. C., KLUG, E. und GÜNZEL, A.-R. (1979)

Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws
Journal of Reproduction and Fertility, Supplement, Suppl. 27, 47-51

McLEOD, J., und McGEE, W. R. (1950)

The semen of the thoroughbred
Cornell university college of veterinary medicine, 40, 233-248

MEDL, M. (1993)

Künstliche Besamung beim Pferd
Allgäuer Bauernblatt 6 (Sonderheft)
Agrar-Verlag Allgäu, Kempten

MERKT, H. (1976)

Die Bedeutung des Tierarztes für die Pferdezucht.
Der praktische Tierarzt, 57, 139-143

MERKT, H. (1983)

Fruchtbarkeit der Stute muss verbessert werden.
Tierzüchter, 35, 17-19

MERKT, H. und KLUG, E. (1976)

Fortpflanzungsprobleme im Rahmen der künstlichen Besamung beim Pferd
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 83 (12), 539-42

MERKT, H. und KLUG, E. (1989)

Gesundheitliche und geschlechtliche Mindestanforderungen an Zuchthengste
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 96, 459-464

MERKT, H. und KRAUSE, D. (1966)

Tiefgefrierversuche mit Equidensperma unter Anwendung des sog. Pellet-Verfahrens
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 73, 267-268

MERTENS, U. (2002)

Analyse von Fruchtbarkeitsmerkmalen in der Population des Hannoverschen
Warmbluts

Diss. med. vet., Tierärztliche Hochschule Hannover

METCALF E. S., DIDEON, B. A., BLEHR, R. , SCHLIMGEN, T. , BERTRAND, W.,
VARNER, D. D., TEAGUE, S. R. und HAUSMAN, M. S. (2008)

Effects of DMSO and L-Ergothioneine on post-thaw semen parameters in stallions:
Preliminary results

Animal Reproduction Science, 107, 332-333

MOORE, A. I., SQUIRES, E. L., und GRAHAM, J. K. (2005)

Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa

Theriogenology, 63 (9), 2372–2381

MORTIMER, S. T. (2000)

CASA-practical aspects

Journal of Andrology, 21 (4), 515–24

PACE, M. M., und SULLIVAN, J. J. (1975)

Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components
on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen

Journal of Reproduction and Fertility, Supplement, 23, 115-121

PICKETT, B. W. und SHINER, K. A. (1994)

Recent developments in artificial insemination in horses

Livestock Production Science, 40 (1), 31–36

PICKETT, B.W., NEIL, J.R. und SQUIRES, E.L. (1985)

The effect of ejaculation frequency on stallion sperm output

Proceedings of the Eighth Equine Nutrition and Physiology Symposium, 99, 290-295

PICKETT, B. W., SULLIVAN, J. J. und SEIDEL, G. E. (1975b)

Reproductive physiology of the stallion V

Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output

Journal of Animal Science, 40 (5), 917–23

PICKETT, B. W., SULLIVAN, J. J., BYERS, W. W., PACE, M. M. und REMMENGA, E. E. (1975a)

Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull Spermatozoa

Fertility and Sterility, 26, 167-174

RAILETT, A. (1888)

Rapport sur une note de M. Repiquet, relative a la fécondation artificielle

Bulletin de la Societe Centrale de Medecine Veterinaire (Nouvelle Série), 6, 365–367

RODGER, J. C. (1975)

Seminal plasma, an unnecessary evil?

Theriogenology, 3 (6), 237–47

RÖBBELEN, I. (1993)

Vergleichende Untersuchungen an unterschiedlich aufbereitetem Pferdetiefgefriersamen, Einfluß verschiedener Tiefgefrierverdünner, der Anpassungszeit sowie variierter Einfriergeschwindigkeiten auf Motilität und Membranintegrität der Samenzellen.

Diss.med.vet., Tierärztliche Hochschule Hannover

SAENGER, O. (1959)

Die künstliche Besamung- keine Hilfe für die Pferdezucht

Tierzüchter, 11, 126-127

SAMPER, J. C., und MORRIS, C. A. (1998)

Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey
Theriogenology, 49 (5), 895–903

SAND, G. (1903)

Künstliche Befruchtung von Stuten
Berliner Tierärztliche Wochenschrift, 19 (1903), 182–184

SIEME, H. (2004)

Spermaqualitäts- und fertilitätsbeeinflussende Faktoren in der equinen
Samenübertragung
Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover

SIEME, H. (2009)

Instrumentelle Besamung in der Pferdezucht
In: CHRISTINE AURICH (Hrsg.): Reproduktionsmedizin beim Pferd
Verlag Parey in MVS Medizinverlage, 2. Auflage, Stuttgart, 299- 330

SIEME, H. (2011a)

Freezing semen
In: MCKINNON, A., SQUIRES, E.L., VAALA, W.E. und V, D. D.
Equine Reproduction, Second Edition, 2972-2992
Verlag WILEY- BLACKWELL, Oxford, United Kingdom

SIEME, H. (2011b)

Semen extenders for frozen semen
In: MCKINNON, A., SQUIRES, E.L., VAALA, W.E. und V, D. D.
Equine Reproduction, Second Edition, 2964-2971
Verlag WILEY- BLACKWELL, Oxford, United Kingdom

SIEME, H., ECHTE, A. und KLUG, E. (2002)

Effect of frequency and interval of semen collection on seminal parameters and fertility of stallions

Theriogenology, 58, 313- 316

SIEME, H., KATILA, T. und KLUG, E. (2004)

Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions

Theriogenology, 61, 769- 784

SIEME, H., KLUG, E. und BADER, H. (1998)

Separationsverfahren zur Erzielung vitaler und befruchtungskompetenter equiner Samenzellpopulationen- Eine Übersicht

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 104, 298-302

SIEME, H., TÖPFER-PETERSEN, E., BADER, H., PETZOLDT, R. und MERKT, H. (2001)

A.I.-sperm of the stallion: evaluation criteria and minimal standards- a survey
Pferdeheilkunde 17 (2001), 145-154

SMITH, A. U., und POLGE, C. (1950)

Survival of spermatozoa of low temperatures

Nature 166, 668-669

SQUIRES, E. L., KEITH, S. L., und GRAHAM, J. K. (2004)

Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa

Theriogenology, 62 (6), 1056–65

SULLIVAN, J. J., und PICKETT, B. W. (1975)

Influence of ejaculation frequency of stallions on characteristics of semen and output of spermatozoa.

Journal of Reproduction and Fertility. Supplement, (23), 29–34

THOMSON Jr., D.L., PICKETT, B.W., BERNDTSON, W.E., VOSS, J.L. und NETT, T.M. (1977)

Reproductive physiology of the stallion. VIII

Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behavior and concentrations of LH and testosterone in serum

Journal of Animal Science, 44, 656- 664

TISCHNER, M. (1979)

Evaluation of deep-frozen semen in stallions

Journal of Reproduction and Fertility, Supplement, (27), 53–59

TISCHNER, M. (1992)

Equine artificial insemination in central and east europe

Acta Veterinaria Scandinavica, Supplement, 88, 111-115

VAN DER HOLST, W. (1975)

A study of the morphology of stallion semen during the breeding and non- breeding seasons

Journal of Reproduction and Fertility, Supplement, 23, 87- 89

VERSTEGEN, J., IGUER-OUADA, M., und ONCLIN, K. (2002)

Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice

Theriogenology, 57 (1), 149–79

VIDAMENT, M. (2005)

French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen

Animal Reproduction Science, 89 (1-4), 115–136

VIDAMENT, M., COGNARD, E., YVON, J-M., SATTLER, M., PALMER, E., und MAGISTRINI, M. (1998)

Evaluation of stallion semen before and after freezing

Reproduction in Domestic Animals, 33, 271-277

VIDAMENT, M., DUPERE, A. M., JULIENNE, P., EVAIN, A., NOUE, P., und PALMER, E. (1997)

Equine frozen semen: freezability and fertility field results
Theriogenology, 48 (6), 907–917

VON STERN, K. (2001)

Prognose der Tiefgefriereignung von Hengstsperma mit Hilfe von Funktionstests
Dissertation, Freie Universität Berlin

WABERSKI, D. und PETRUNKINA, A.M. (2007)

Spermatologie

In: BUSCH und WABERSKI (Hrsg.): Künstliche Besamung bei Haus- und Nutztieren
Verlag Schattauer, Stuttgart, 99-118

WABERSKI, D. und SIEME, H. (2009)

Andrologische und spermatologische Untersuchung (Zuchttauglichkeitsuntersuchung beim Hengst)

In: AURICH, C. (Hrsg.): Reproduktionsmedizin beim Pferd

Verlag Parey in MVS Medizinverlage, 2. Auflage, Stuttgart, 249-266

WABERSKI, D. und WEITZE, K.F., (2007)

Künstliche Besamung beim Schwein

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

Verlag Schattauer, Stuttgart, 198-223

WALTER, K. (1992)

Einfluß verschiedener Verfahren zur Spermatozoenselektion auf Motilität, Vitalität und Morphologie von Hengstspermien sowie deren diagnostische Bedeutung

Diss.med.vet., Tierärztliche Hochschule Hannover

WATSON, P. F. (2000)

The cause of the reduced fertility with cryopreserved semen
Animal Science Paper and Reports, 60-61, 481-492

WEISS, S. (2004)

Einfluss der Zentrifugationsmethode auf Qualität und Kryokonservierung von
Hengstsamen
Diss.med.vet., Universität Zürich

WEITZE, K.F. (2001)

Spermatologische Untersuchung
In: BUSCH, W. und HOLZMANN, A. (Hrsg.): Veterinärmedizinische Andrologie
Schattauer GmbH, Stuttgart, 87-118

WIESNER, E. und RIBBECK, R. (1983)

Wörterbuch der Veterinärmedizin
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

ZIEGLER, R. (1991)

Computervideomikrographische Beurteilung vor und nach der
Tiefgefrierkonservierung mit eidotterhaltigem Verdünner
Diss.med.vet., Ludwig-Maximilian-Universität München

ZIRKLER, H. (2005)

Kryokonservierung von Hengstsperma mittels direktonaler Gefriertechnik in Hollow-
Tubes im Vergleich zur konventionellen Gefrierung in 0,5 ml Pailletten
Diss.med.vet., Tierärztliche Hochschule Hannover

Danksagung

Für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas, die hilfreiche Unterstützung und die Betreuung am Fachbereich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Axel Wehrend bedanken. Ich danke Ihnen für das entgegengebrachte Vertrauen.

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Justus- Liebig- Universität in Gießen, hier allen voran Frau Franziska Kotarski, für die großartige Unterstützung bei der Auswertung der Tiefgefriersamenproben bedanken. Ohne Frau Kotarski wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für Alles.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten danke ich ganz herzlich Herrn Dr. Failing und Herrn Schaubmar von der AG Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches.

Herrn Dr. med. vet. Hartmut Rohrmann (Rövershagen) möchte ich für die Vermittlung zu Herrn Prof. Dr. Wehrend danken.

Des Weiteren danke ich Frau Antje Kerber (Geschäftsführerin des Landgestüts Redefin) sowie Herrn Dieter Brüsch, Deckstellenleiter des Landgestüts Redefin in Rente, für die Bereitstellung der Hengste und die schöne Zeit am Landgestüt. Dies gilt ebenfalls für den Kollegen Herrn Dr. med. vet. Lothar Makowei vom Zuchthof Gadebusch, der sich ebenfalls mit mehreren Hengsten an dieser Untersuchung beteiligt hat.

Ein weiterer Dank geht an die Gestütsleitung des Landgestüts Dillenburg sowie den Mitarbeitern der Besamungsstation, Frau Jenny Ple und Herrn Frank Stecher, für das herzliche Willkommensein und die gute Zusammenarbeit.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Sigmund Hintsche, Landstallmeister Sachsen-Anhalt, sowie Herrn Wilken Treu, ehemals Landgestüt Prussendorf, für die nette Kooperation und Bereitstellung der Hengste. Herrn Enrico Kurze von der Deckstation

des Landgestüts Prussendorf danke ich für die tolle Zusammenarbeit und die konstruktive Kritik.

Ich möchte mich zudem bei Herrn Michael Penker von der Firma Minitüb für die stets nette und immer hilfsbereite Zusammenarbeit bedanken.

Abschließend danke ich aller herzlichst meiner Familie, insbesondere meinen Eltern. Vielen Dank, dass ihr mir das alles ermöglicht habt und vielen Dank für all den Rückhalt und die Motivation bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Meiner ehemaligen Frau Franziska danke ich für die ständige Unterstützung meiner Träume und Ziele sowie ihrer unendlichen Geduld und Aufopferung. Vielen Dank für die vielen gemeinsamen Jahre.

Vielen Dank euch allen.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder 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.

Christoph Schepull



 *édition scientifique*
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN: 978-3-8359-6870-7



Photo cover (ice cubs): © Christoph Burgstedt @ stock.adobe.com
Photo cover (white horse): © Mari_art @ stock.adobe.com