



1 Einleitung

Der Einsatz geschlechtsspezifisch differenzierter Spermien ist für viele Nutztierassen interessant, in der kommerziellen Praxis jedoch bis heute ausschließlich bei Rindern etabliert (Rath et al., 2009). Hier birgt dieses System, speziell bei den Milchviehaltern, durch die Geburt einer erhöhten Anzahl von weiblichen Nachkommen große Vorteile. Kuhkälber haben einen höheren ökonomischen Wert als ihre männlichen Artgenossen und es treten weniger Schweregeburten auf, da weibliche Kälber in der Regel kleiner sind. Stehen mehr Nachkommen des gewünschten Geschlechts zur Verfügung, kann außerdem eine stärkere Selektion durchgeführt sowie ein vermehrter Zuchtviehverkauf realisiert werden. Betriebe mit einer hohen Bestandsergänzung oder wachsenden Herden kommen beim Einsatz sortierten Spermias mit einem geringeren Anteil an Zukauftieren aus, was Vorteile für die Tiergesundheit bietet. Außerdem kann durch die gezielte Anpaarung mit Y-chromosomalem Sperma der Wert von Kreuzungstieren erhöht werden, die nicht für die Milchproduktion bestimmt sind (Weigel, 2004; de Vries et al., 2008).

Die einzige derzeit verfügbare Methode, um das Geschlecht der Nachkommen mit einer Sicherheit von mehr als 90% zu gewährleisten, ist das durchflusszytometrische Sortieren mit der „Beltsville Sperm Sexing Technology“ (Johnson et al., 1999; Seidel und Garner, 2002; Seidel, 2007; Rath et al., 2009). Dabei handelt es sich um ein technisch anspruchsvolles und zeitaufwendiges System, weshalb sortiertes Sperma nur zu einem deutlich höheren Preis angeboten werden kann (Seidel, 2003; Klinc, 2005), der etwa 15,00 € bis 20,00 € über dem Preis von konventionellem Sperma liegt. Außerdem lässt sich geschlechtsspezifisch differenziertes Sperma nicht von allen Bullen erstellen, da die Befruchtungskapazität individuell durch den technischen Prozess belastet wird (Flint et al., 2003; Klinc, 2005) bzw. die hohe Ejakulatverdünnung, die mit dem Verlust des Seminalplasmas einhergeht, die Lebensdauer der Spermien einschränkt (Maxwell und Johnson, 1999). Deutliche, individuelle Effekte wurden auch für unsortiertes Sperma nachgewiesen (den Daas et al., 1998). Gleichzeitig steht von Spitzenvererbern nur begrenzt Sperma zum Sortieren zur Verfügung, da die geringe Sortiereffizienz keinen kostendeckenden Besamungseinsatz im Vergleich zu unsortierten Proben zulässt (Frese, 2009). Mit Ausnahme vom Schaf (de Graaf et al., 2009) führt der Sortiervorgang darüber hinaus bislang zu einer reduzierten Befruchtungsfähigkeit der geschlechtsspezifisch differenzierten Spermien (Johnson, 1991; Maxwell et al., 2004; Rath und Johnson, 2008).



Einleitung

Kürzlich wurde eine Studie über den praktischen Einsatz sortierten Spermas in den Vereinigten Staaten der Jahre 2006 bis 2008 veröffentlicht. Dort lag der Anteil tragender Färsen nach Erstbesamung bei 41% für sortiertes und 59% für nicht sortiertes Sperma. Bei den Kühen wurden 26% tragende Tiere mit sortiertem und 32% mit nicht sortiertem Sperma ermittelt (Norman et al., 2010). Der Nutzen des sortierten Spermas ist allerdings in hohem Maße von dessen Fertilität abhängig (Seidel et al., 1996; Vazquez et al., 2003), die einen direkten Einfluss auf die ökonomische Bilanz hat (Seidel, 2003). In Europa sind die Milchviehhalter mit der starken Varianz in der Fruchtbarkeit des sortierten Spermas unzufrieden (Rath und Johnson, 2008). Um sortiertes Sperma flächendeckend zum Einsatz zu bringen, ist es daher entscheidend, die Fertilität der sortierten Spermien an das Befruchtungspotential konventionellen Spermas anzunähern (Klinc, 2005).

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss verschiedener Spermaaufbereitungen auf die Lebensfähigkeit und Fruchtbarkeit sortierter Spermien zu untersuchen. Dabei kam unter anderem ein neues Sortier- und Einfrierprotokoll zum Einsatz, bei dem alle Verdünnerkomponenten sowie die Prozessschritte, vom Anfärben der Spermien über das Sortieren bis hin zum Einfrieren, den Bedürfnissen sortierter Spermien angepasst wurden (Rath et al., 2009). Die Qualität des Spermas wurde dazu sowohl unter Laborbedingungen als auch in einem Feldversuch evaluiert.



2 Literatur

2.1 Grundprinzip der durchflusszytometrischen Spermisortierung und dessen Effekte auf die Integrität und Befruchtungsfähigkeit der Spermien

Das Grundprinzip der geschlechtsspezifischen Differenzierung von Säugetierspermien mit Hilfe der Flowzytometrie beruht auf dem unterschiedlichen DNA-Gehalt von X- und Y-Chromosom tragenden Spermien (Johnson et al., 1987a; Johnson, 1990). Gemessen wird dabei der relative Unterschied im Gesamt-DNA-Gehalt der beiden Spermienpopulationen. Dieser differiert tierart- und teilweise rassespezifisch und liegt bei unseren Nutztieren zwischen 3,0% und 4,5% (Garner et al., 1983; Garner, 2006). Um diesen Unterschied zu messen und die Spermien in X- und Y-Chromosom tragende Populationen aufzuteilen, durchläuft jedes einzelne Spermium einen technisch anspruchsvollen Prozess, in dem es verschiedenen Faktoren ausgesetzt wird, die eine Belastung für die Zellen darstellen (Johnson et al., 1999; Maxwell et al., 2004; Rath und Johnson, 2008).

Für den Sortiervorgang werden die Spermien zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 angefärbt. Dazu ist es üblich, die Spermien mit dem Farbstoff für mindestens eine Stunde bei 34°C bis 38°C zu inkubieren (Klinc und Rath, 2005). Im Anschluss werden die Spermien im Durchflusszytometer hydrodynamisch ausgerichtet und passieren im freien Tröpfchenfluss den Strahl eines UV-Lasers. Bei der Ausrichtung werden die Spermien einem Druck von ca. 3 Bar ausgesetzt (Suh et al., 2005) und erfahren zudem beim Passieren der Strahldüse erhebliche Scherkräfte. Um die Spermien nach ihrer Identifizierung zu sortieren, werden sie elektrisch mit einer Spannung von 180 Volt aufgeladen. Die Spermien werden in einem diskontinuierlichen Flüssigkeitsstrom durch die Messeinheit geführt. In jedem dabei erzeugten Flüssigkeitströpfchen sollte sich nach Möglichkeit maximal ein Spermium befinden. Die Spermien hängen zunächst wie an einer Perlenkette aufgereiht aneinander. Der jeweils unterste Tropfen dieser Kette wird, je nachdem ob er ein X- oder ein Y-Chromosom tragendes Spermium enthält, positiv oder negativ aufgeladen. Unmittelbar nach dieser Aufladung reißt der Tropfen ab und befindet sich für die Ablenkung im elektrostatischen Feld im freien Fall. Der übrige Teil des Flüssigkeitsstroms wird elektrisch neutralisiert und der nächste Spermientropfen kann aufgeladen werden. Die Ladungen übertragen sich entlang des Flüssigkeitsstroms, wodurch die Spermien mehrmals wechselnde, unterschiedliche Aufladungen erfahren (Seidel et al., 1996; Johnson et al., 1999; Rath et al., 2003a).



Anschließend passieren die Spermien ein elektrostatisches Feld, in dem sie aufgrund der Ladungsunterschiede in die jeweiligen Populationen abgelenkt werden.

Gemeinsam mit großen Mengen einer Trägerflüssigkeit gelangen die Spermien dann mit hoher Geschwindigkeit in die Auffanggefäße. Zur Abmilderung des Aufpralls sowie zum Schutz der Spermien gegenüber katabolischen Prozessen enthält das Auffangmedium spezifische Zusätze. Aufgrund des hohen Volumens der Trägerflüssigkeit und der damit verbundenen Verdünnung, müssen die Proben nach dem Sortieren zentrifugiert werden. Danach werden die Spermien in eine definierte Menge Tiefgefrier- oder Frischspermaverdüner aufgenommen (Maxwell und Johnson, 1999).

2.2 Fruchtbarkeitsbeeinflussende Effekte der Spermisortierung im Durchflussszytometer

Bei geschlechtsspezifisch differenziertem Sperma kann eine beschleunigte Abnahme der Motilität im Thermo-Resistenztest gegenüber konventionellem Sperma beobachtet werden (Hollinshead et al., 2003; Rath et al., 2003b). Außerdem wurden bei sortierten Bullenspermien (Klinc, 2005) und Eberspermien (Parrilla et al., 2005) veränderte Geschwindigkeitsparameter gegenüber konventionellem Sperma beobachtet. Es ist zudem bekannt, dass biotechnische Maßnahmen kapazitationsähnliche Veränderungen an Spermien hervorrufen können (Maxwell et al., 1998; Maxwell und Johnson, 1999). Schließlich werden schädigende Einflüsse des Sortierens auf die Spermien-DNA diskutiert (de Ambrogi et al., 2006).

2.2.1 Einflüsse des Hoechst 33342-Fluoreszenzfarbstoffs und des Lasers

Da der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 an die Spermien-DNA bindet, ist es denkbar, dass Schädigungen am Spermienchromatin hervorgerufen werden (Johnson et al., 1989; Johnson et al., 1999), wie sie bei somatischen Zellen beobachtet wurden (Erba et al., 1988). Dass die DNA alleine durch die Anfärbung mit Hoechst 33342 geschädigt wird, ist jedoch unwahrscheinlich. Seidel und Garner (2002) ließen Spermien den Sortiervorgang mit und ohne Hoechst 33342-Färbung durchlaufen und erkannten keine Unterschiede in Motilität und DNA-Integrität. Außerdem wurden beim Schwein keine negativen Effekte auf die Embryonalentwicklung (Merton et al., 1997; Zhang et al., 2003) so-



wie die Trächtigkeitsraten und die Wurfgröße (Parilla et al., 2004) beobachtet, wenn die Spermien mit Hoechst 33342 behandelt wurden.

In den Spermienköpfen liegt das Chromatin in stark komprimierter Anordnung vor, was die Spermien-DNA vor äußeren Einflüssen schützt (Durand und Olive, 1982). Zudem werden geschädigte Spermien durch die Gegenfärbung mit dem Lebensmittelfarbstoff "FD#40 red food dye", der den Hoechst 33342-Farbstoff verdrängt, vom Sortiervorgang ausgeschlossen (Boe-Hansen et al., 2005). Daraus resultiert, dass kein Unterschied im Anteil chromatingeschädigter Spermien zwischen sortierten und unsortierten Spermien besteht, wie von de Ambrogi et al. (2006) dargestellt wird (3,4% vs. 3,3% Spermien mit erhöhtem DFI). Boe-Hansen et al. (2005) berichten, dass geschlechtsspezifisch differenzierte Spermien sogar einen geringeren Anteil chromatingeschädigter Spermien aufweisen können als konventionell erstellte Besamungsportionen ($p=0,011$). Die Autoren räumen jedoch eine reduzierte Homogenität der geschlechtsspezifisch differenzierten Bullenspermien gegenüber konventionellen Spermien ein.

Schädigungen resultieren vermutlich aus der Kombination von Fluoreszenzfarbstoff und der Bestrahlung durch den UV-Laser (Rath et al., 2009). Dabei spielt die Intensität des Lasers eine entscheidende Rolle. Eine höhere Laserintensität führt zu stärkeren Schädigungen, wie für Kaninchensperma (Johnson et al., 1996) und Bullensperma (Schenk und Seidel, 2007) gezeigt werden konnte. Montag et al. (2000) untersuchten die Auswirkungen der Laserintensität auf die Motilität der Spermien. Bei einer Energie von 0,25 mJ wurden 12% der Spermien dauerhaft und 66% der Spermien zeitweise (0,5 – 2,5 Minuten) immobilisiert. Wurde die Energie auf 2 mJ erhöht, kam es zu einer dauerhaften Immobilisierung sämtlicher Spermien. Der Einfluss durch die Belichtung mit dem UV-Laser auf die Motilität der Spermien könnte durch einen beschleunigten Ca^{2+} -Transport in den Spermien bedingt sein (Breitbart et al., 1996). Dieser fördert die Bindung von Ca^{2+} an die Plasmamembran und hemmt die Ca^{2+} -Aufnahme in den Mitochondrien (Lubart et al., 1997). Auf die Entwicklung von Embryonen aus bestrahlten Spermien scheinen bis zu einer Laserintensität von 125 mW keine negativen Auswirkungen aufzutreten (Guthrie et al., 2002; Catt et al., 1997). Mit abnehmender Laserintensität und der dadurch bedingten Fluoreszenzabnahme sinkt jedoch die Signalauflösung an den Fotozellen, woraus letztendlich eine reduzierte Sortierrate resultiert. Daher wird in der Regel mit höheren Laserintensitäten von mindestens 150 mW gearbeitet (Rath und Johnson, 2008).



Für die Integration des Hoechst 33342-Farbstoffs ist eine Inkubation der Spermien notwendig. Es ist bekannt, dass die Inkubation von Spermien eine Destabilisierung der Plasmamembran hervorruft. Maxwell und Johnson (1997) beobachteten eine Reduktion der membranintakten Spermien von 80,4% auf 68%, wenn Spermien vier Stunden bei 38°C gelagert wurden.

2.2.2 Mechanische Einflüsse

Die mechanischen Einflüsse während der durchflusszytometrischen Sortierung führen zu einer reduzierten Motilität, Membranschädigungen (Seidel und Garner, 2002; Suh et al., 2005; Garner, 2006) sowie Chromatinschädigungen (de Ambrogi et al., 2006) geschlechtsspezifisch differenzierter Spermien. Man geht davon aus, dass der Anteil membrangeschädigter Spermien durch den mechanischen Stress um 18,6% erhöht wird (Seidel und Garner, 2002; Garner, 2006). De Ambrogi et al. (2006) beobachteten Chromatinschädigungen bei Spermien, die nur dem mechanischen Druck in der Maschine, nicht jedoch dem Licht des Lasers ausgesetzt waren. Hier lag der Anteil von Spermien mit einem erhöhten DFI-Wert bei 6,86%, bei unsortierten Spermien hingegen bei 3,42%.

Als eine der Ursachen für die Spermaschädigungen wird der hohe Arbeitsdruck in der Sortiereinheit beschrieben (Suh und Schenk, 2003; Suh et al., 2005). In den Versuchen von Suh et al. (2005) wurde ein direkter Zusammenhang zwischen dem Druck und der Motilität sowie dem Druck und der Membranintegrität beobachtet. Die Autoren verglichen unsortierte Proben mit Spermien, die bei 50 psi sortiert wurden. Das unsortierte Sperma zeigte nach 30-minütiger Lagerung eine Motilität von 52,1%, das sortierte Sperma eine Motilität von 44,8%. Durch die Reduktion des Drucks auf 40 psi bzw. 30 psi ließ sich ein weniger starker Abfall der Motilität (48,6% bzw. 49,6%) gegenüber dem nicht sortierten Sperma beobachten. Der Anteil membranintakter Spermien schwankte zwischen 58,5% (unsortiert), 51,7% (sortiert bei 50 psi) und 57,8% (sortiert bei 30 psi). Des Weiteren sind möglicherweise die Schwingungen des Piezokristalls, die für die Tropfenbildung notwendig sind, dafür verantwortlich, dass die Lebensfähigkeit sortierter Spermien reduziert wird (de Ambrogi et al., 2006). Aber auch andere mechanische Einflüsse, wie die Zentrifugation nach dem Sortieren, haben einen negativen Effekt (de Ambrogi et al., 2006).



Weiterer Untersuchungen bedarf der Einfluss des Sortierens auf die Zusammensetzung der Spermienmembran. Die mechanischen Kräfte stehen in Verbindung mit den hohen Verdünnungen unter Verdacht, Proteine abzubauen und zu verändern, die an die Spermienmembran gebunden sind (McNutt und Johnson, 1996, zitiert in Leahy, 2009; de Graaf, 2007a). Die Zusammensetzung der Membranproteine spielt für die erfolgreiche Besamung eine entscheidende Rolle. Welchen Einfluss eine veränderte Proteinzusammensetzung hat, die durch das Sortieren hervorgerufen wird, ist noch nicht endgültig geklärt. Es ist dabei durchaus mit tierartspezifischen Unterschieden zu rechnen (de Graaf et al., 2007a).

2.2.3 Elektrische Aufladung und elektrostatische Ablenkung

Neben den mechanischen Belastungen (de Ambrogi et al., 2006) scheint die elektrische Aufladung und die elektrostatische Ablenkung der Spermien zur Aufteilung in die Spermienpopulationen hauptverantwortlich für die reduzierte Lebensfähigkeit sortierter Spermien zu sein (Rath und Johnson, 2008; Rath et al., 2009; Spinaci et al., 2006, 2010).

Die Ablenkung durch das elektrostatische Feld erfolgt in einem Spannungsbereich, der dem der Elektroporation ähnlich ist. Bei der Elektroporation werden Zellen ebenfalls kurzzeitig einem elektrischen Feld hoher Spannung ausgesetzt, um eine reversible Formation von Membranporen hervorzurufen. Dadurch ist es sowohl bei pflanzlichen als auch bei tierischen Zellen möglich, Fremd-DNA in Zellen zu integrieren oder an Zellen zu binden (Chu et al., 1987). Die Elektroporation stellt zum Beispiel beim spermienvermittelten Gentransfer (Sperm mediated gene transfer, SMGT) eine der Methoden dar, um die DNA-Spermien-Bindung zu verbessern (Horan et al., 1992; García-Vázquez et al., 2010). Gagné et al. (1991) konnten jedoch feststellen, dass der Einsatz elektroporierter Rinderspermien bei der In vitro Fertilisation (IVF) zu einer 30% geringeren Fruchtbarkeitsrate führt. Nach der Elektroporation von menschlichen Spermien kommt es u.a. zu einem höheren Anteil akrosomenreagerter Spermien (Thomkins und Houghton, 1988). Beim Rind konnte bereits ab einer Spannung von 500 V eine deutlich reduzierte Motilität (Kontrolle Spermien: 66% motile Spermien; elektroporierte Spermien: 44% motile Spermien) beobachtet werden (Gagné et al., 1991). Zur Ablenkung in die Populationen mit den X- und Y-Chromosom tragenden Spermien sind die Zellen kurzzeitig einer weit aus höheren Spannung ausgesetzt. Hier liegen für eine ausreichende Ablenkung ca. 3000 V an.



Es ist somit wahrscheinlich, dass die elektrischen Belastungen zu starken Schädigungen an den Spermien führen. Zum einen kann dieser Vorgang die Bildung von reaktiven Sauerstoffgruppen (reactive oxygen species, ROS) unterstützen, die, wenn sie in zu hohem Maße auftreten, Membranschädigungen hervorrufen (Alvarez et al., 1987; Aitken et al., 1989a; b). Zum anderen kommt es durch die elektrischen Belastungen zu einer Depolarisation der Membranen am Spermischwanz-Mittelstück, was eine temporäre Unterbrechung der ATP-Synthese zur Folge hat (Klinc et al., 2007; Klinc und Rath, 2007). Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop geben zudem Hinweise auf Veränderungen der Mitochondrienstruktur, sobald die Spermien das elektrostatische Feld passiert haben (Frese, 2011).

2.2.4 Auswirkungen hoher Ejakulatverdünnungen auf die Fruchtbarkeit

Vor, während und nach dem Sortieren treten Verdünnungseffekte auf, durch die das ursprüngliche Ejakulat, je nach Spezies, 3.000-30.000-fach verdünnt wird (Maxwell und Johnson, 1999). Die Verdünnung hat in Kombination mit der Zentrifugation nach dem Sortieren zur Folge, dass Proteine, natürliche Antioxidantien und andere nützliche Komponenten mit dem Seminalplasma entfernt werden. Die im Seminalplasma enthaltenen Substanzen haben wichtige Funktionen bei der Dekapazitation und sind für die Stabilität des Akrosoms verantwortlich. Daher spielen sie bei der Regulation der Kapazitation eine entscheidende Rolle (Austin, 1952; Maxwell und Johnson, 1999).

Um die Spermien vor Schädigungen wie den kapazitationsähnlichen Vorgängen zu schützen, kann Seminalplasma in die für die Sortierung und Lagerung der Spermien nötigen Medien gegeben werden (Maxwell et al., 1998; Centurion et al., 2003). Für sortiertes Ebersperma wurde gezeigt, dass die Zugabe von 10-50% Seminalplasma während der Anfärbung oder in den Auffangmedien zu einer verbesserten Qualität sortierter Spermien führt (Catt et al., 1997; Spinaci et al., 2006). Darüber hinaus werden durch die Behandlung von Eberspermien mit PSP I und PSP II positive Effekte erzielt (García et al., 2007). Es sind jedoch auch schädigende Effekte auf die Spermienqualität durch die Zugabe bestimmter Seminalplasmakonzentrationen und –zusammensetzungen bekannt (Maxwell et al., 1997; de Graaf et al., 2007). De Graaf et al. (2007) führten die potentiellen negativen Einflüsse des Seminalplasmas auf Veränderungen und Ablösungen oberflächengebundener Proteine durch den Sortiervorgang zurück. Genauere Informationen,



welche Proteine durch das Sortieren entfernt oder beeinflusst werden, wären erforderlich, um gezielt Seminalplasmabestandteile supplementieren zu können (Leahy, 2009).

Neben den protektiven Einflüssen auf das sortierte Sperma kann die Zugabe von Seminalplasma auch beim Einfrieren und der Lagerung von normal konzentrierten sowie bei nicht sortierten, hoch verdünnten Besamungsportionen zu einer verbesserten Qualität der Spermien führen (Garner et al., 2001; Hernandez et al., 2007).

2.2.5 Auswirkungen von oxidativem Stress auf geschlechtsspezifisch differenzierte Spermien

Oxidativer Stress entsteht, wenn das physiologische Gleichgewicht zwischen Antioxidantien (AO) und den ROS zu Gunsten der ROS gestört ist (Bansal und Bilaspuri, 2010). Bei geschlechtsspezifisch differenzierten Spermaportionen spielt dabei sowohl der Sortierprozess als auch die hohe Verdünnung eine entscheidende Rolle. Normalerweise sind für die Produktion der ROS Leukozyten und nicht ausgereifte (Garrido et al., 2004) sowie abgestorbene Spermien verantwortlich (Sariözkan et al., 2009). Der Sortierprozess wird durch die Inkubation mit dem Hoechst 33342 Farbstoff, den hohen Druck, die Belastung durch den Laser, die Zentrifugation sowie die elektrische Aufladung und die elektrostatische Ablenkung mit einer zusätzlichen Produktion von ROS in Verbindung gebracht (Klinc und Rath, 2007). Auf der anderen Seite ist durch die hohe Verdünnung des Seminalplasmas im Sortierprozess der Gehalt an AO deutlich herabgesetzt (Maxwell und Johnson, 1999), da das Seminalplasma sowohl enzymatische als auch nichtenzymatische AO wie die Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Katalase und Glutathionreduktase enthält. Außerdem scheinen die Belastungen durch den Sortiervorgang die Anfälligkeit der Spermien für oxidativen Stress zu erhöhen, wie an Schafbockspermien gezeigt wurde (Leahy et al., 2010).

ROS beeinflussen die Fertilitätseigenschaften der Spermien, da sie bei vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Unter anderem nehmen die ROS Einfluss auf die Tyrosin-Phosphorylierung, Hyperaktivierung, Kapazitation, Akrosomenreaktion, Spermien-Oocyten-Fusion sowie die Stabilisierung der mitochondrialen Kapsel (Aitken, 1995; Baumber et al., 2003; O'Flaherty et al., 2006; Bansal und Bilaspuri, 2010).

ROS sind Radikale, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aufweisen und daher sehr kurzlebig und reaktionsfreudig sind. Sie nutzen bevorzugt die Lipide und Proteine



der Membranen als Reaktionspartner, um durch die Aufnahme eines zweiten Elektrons eine chemisch stabilere Form einzunehmen (Alvarez et al., 1987; Aitken et al., 1989a; b; Iwasaki und Gagnon, 1992; Koksai et al., 2003). Da die Membranen der Säugetierspermatozoen reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) sind (Sikka, 1996), ruft eine übermäßige ROS-Produktion oder die Abwesenheit einer ausreichenden Menge von Antioxidantien eine Lipidperoxidation hervor (Rao et al., 1989). Durch die Lipidperoxidation kommt es zu Schädigungen an den Spermienmembranen, morphologischen Veränderungen, Beeinträchtigungen der Zellfunktionen und zu einer reduzierten Motilität (de Lamirande und Gagnon, 1992; Whittington und Ford, 1998; Bansal und Bilaspuri, 2010; Bucak et al., 2010). Die reduzierte Motilität ist unter anderem durch einen sehr schnellen Verlust von intrazellulärem Adenosintri-phosphat (ATP) und den daraus resultierenden Schädigungen am Axonem des Spermischwanzmittelstücks zu erklären (Sikka, 1996). Insgesamt kommt es durch den oxidativen Stress zu einer verkürzten Lebensfähigkeit der Spermien und zur Beeinträchtigung der Kapazitation und Akrosomenreaktion (de Lamirande und Gagnon, 1992; Oehninger et al., 1995; Ichikawa et al., 1999). Des Weiteren führt die Lipidperoxidation zu Schädigungen an der Spermien-DNA (Twigg et al., 1998a).

Neben den Schädigungen durch die Lipidperoxidation trägt oxidativer Stress dazu bei, die PT-Pore (Permeability Transition Pore) zu aktivieren, woraus eine erhöhte Apoptose-rate resultiert (Ortega Ferrusola et al., 2010). Insgesamt reduziert ein zu hoher Anteil von ROS die Fertilität der Spermien sowohl *in vitro* (Agarwall et al., 2005; 2006) als auch *in vivo* (Aitken et al., 1991).

Da die Spermien selbst sehr geringe Mengen an AO aufweisen, sind sie stark auf das sie umgebende Medium angewiesen, um den Einflüssen der ROS entgegenzuwirken (Potts et al., 2000). Um das Gleichgewicht zwischen AO und ROS herzustellen und die Spermien vor den durch die ROS hervorgerufenen Schäden zu schützen, können verschiedene AO dem Verdünnermedium zugesetzt werden. Durch die AO wird die oxidative Kettenreaktion durchbrochen und Schädigungen werden vermieden (Miller et al., 1993; Bansal und Bilaspuri et al., 2010). Die Zugabe von 7,5 mM Inositol bzw. 7,5 mM Carnitin führten in Versuchen von Bucak et al. (2010) zu signifikant höheren Motilitäten (45,6% bzw. 51,3% motile Spermien) gegenüber einer nicht mit AO behandelten Kontrollgruppe (39,4% motile Spermien). Darüber hinaus wurde ein geringerer Anteil morphologisch abnormer Spermien durch die Behandlung mit Inositol, Carnitin und Methio-



nin (17,2%, 16,8%, 20,4%) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (26,3%) beobachtet. Auch für sortierte, tiefgefrorene und aufgetaute Bullenspermien ist es durch die Zugabe von AO möglich, schützende Effekte zu realisieren. Klinc und Rath (2007) beobachteten, dass die Motilität nach sechsständiger Inkubation bei 37°C nach dem Sortieren ohne AO 24,6% betrug. Die mit AO behandelten Spermien zeigten hingegen eine Motilität von 47,1%. Auch der Anteil membranintakter Spermien war nach 24-stündigem Haltetest in der Gruppe mit AO (40,7%) deutlich gegenüber der Gruppe ohne AO (7,4%) erhöht. Eine Übersicht von AO, die in verschiedenen Spezies zu einem positiven Einfluss auf die Qualität tiefgefrorener und wieder aufgetauter Spermien führt, wurde von Grossfeld et al. (2008) veröffentlicht. In dieser werden für bovine Spermien Katalase, reduzierte Glutathione (GSH), Superoxid-Dismutase (SOD) und Vitamin E angegeben.

Anhand von Feldstudien zeigte Klinc (2005), dass der Einsatz von sortiertem Sperma, das entsprechend prozessiert wurde, zu Trächtigkeitsraten führt, die mit nicht sortiertem Sperma vergleichbar sind (73,1% vs. 77,5%). Leahy et al. (2010) stellten bei sortiertem Schafespermia ebenfalls fest, dass durch den Zusatz von Katalase (150 IE/ml) oder Seminalplasmaproteinen (4 mg Protein per 10^8 Spermien) die erhöhte Anfälligkeit sortierten Spermas gegenüber oxidativem Stress aufgehoben wird.

Bovines-Serum-Albumin (BSA) ist dafür bekannt, freie Radikale zu binden und trägt daher zum Erhalt der Membranintegrität bei (Wolfe et al., 2001; Uysal und Bucak, 2007). Darüber hinaus wurde beim Anfärben der Spermien für den Sortierprozess mit dem Hoechst 33342 Fluoreszenzfarbstoff beobachtet, dass BSA zu einer gleichmäßigeren Anfärbung der Zellen beiträgt. Daher konnte die Temperatur für das Anfärben der Spermien von 37°C auf 34°C reduziert werden. Anstatt die Spermien 1,5 Stunden zu inkubieren, reicht in der Anwesenheit von BSA eine einstündige Inkubationszeit aus (Klinc et al., 2007). Davon profitieren die Spermien, da sich geringere Temperaturen bei der Inkubation weniger schädlich auf die Stabilität der Akrosomen auswirken (Siri-vidyapong et al., 2000).

Auch einfache verfahrenstechnische Schritte tragen dazu bei, geschlechtsspezifisch differenzierte Spermien vor oxidativem Stress zu schützen. So ist es sinnvoll, die Proben nach dem Sortieren möglichst zeitnah zu zentrifugieren. Die Spermien werden so vom Auffangmedium und den großen Mengen an Trägerflüssigkeit getrennt und können in die Lagerungsverdüner überführt werden, die den Bedürfnissen der Spermien optimal angepasst sind (Klinc, 2005). Kommen eidotterhaltige Verdüner zum Einsatz, werden



die Zellen durch die antioxidativen Wirkungen des Eigelbs (Lu und Baker, 1986; Ishikawa et al., 2004) frühzeitig vor oxidativem Stress geschützt.

2.2.6 Einsatz von Natriumfluorid (NaF) zur Verbesserung der Qualität geschlechtsspezifisch differenzierter Spermien

Die Beweglichkeit von Spermien ist stark mit ihrer Eigenschaft verknüpft, ATP zu generieren und effektiv zu nutzen. Durch die Behandlung von Spermien mit Natriumfluorid (NaF) kann in die Produktion von ATP und, je nach Stoffwechsellage, der Transformation zu ADP oder AMP eingegriffen werden (Zakrzewska, 2006). Fluoride sind dafür bekannt, mit einer Vielzahl von Enzymen zu interagieren, speziell wenn diese mit den Kofaktoren Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} und Ca^{2+} ausgestattet sind. Daher kommt es nach dem Einsatz von NaF zu einer veränderten Aktivität z.B. der alkalischen Phosphatase, der Adenosin-Triphosphatase (ATPase), der Enolase und der Dehydrogenase (Chinoy et al., 1991; Zakrzewska et al., 2002; Liu et al., 2008; Sun et al., 2010). Diese Enzyme sind in zahlreiche zelluläre Funktionen wie der Glykolyse, der Respiration, dem Energiestoffwechsel und der Proteinsynthese eingebunden und spielen eine wichtige Rolle für die Motilität der Spermien (Sun et al., 2010). Die Auswirkung auf die Spermien scheint dabei dosisabhängig zu sein (Zakrzewska, 2006). So gibt es Hinweise, dass 30 mM bis 240 mM NaF toxische Effekte auf die Bullenspermien haben (Tanyildizi und Bozkurt, 2002) und NaF-Konzentrationen von 100 mol/l und 200 mol/l zu Schädigungen durch die Destabilisierung des Spermienmetabolismus führen. Werden jedoch deutlich geringere NaF-Konzentrationen von 4 mol/l bis 10 mol/l eingesetzt, scheinen keine negativen Effekte auf die Spermien hervorgerufen zu werden (Zakrzewska, 2006). Bei der Sortierung von Spermien in Anwesenheit von NaF wurde sogar ein positiver Einfluss auf die Lebensfähigkeit geschlechtsspezifisch differenzierter Spermien beobachtet (Klinc, 2005). In der Verbindung von NaF und Antioxidantien als Medienzusatz ist es Klinc (2005) in einem Feldversuch (n=190) gelungen, mit sortierten Spermien Trächtigkeitsraten zu erzeugen, die mit nicht sortiertem Sperma vergleichbar waren (77,5% vs. 65,9%).

NaF führt zu einer chemischen Immobilisierung von Spermien (Schoff und Lardy, 1987; Foote, 2001). Diese Immobilisierung ist bei sortiertem Sperma vollständig reversibel, wie Untersuchungen von Klinc (2005) und Mönch-Tegeeder (2008) zeigten. Dabei wurden Spermien in NaF-haltigen Medien gelagert und sortiert. Während der Zentrifugation im Anschluss an den Sortierprozess wurde das NaF aus der Spermien suspension gewa-



schen und die Spermien erhielten ihre Bewegungsfähigkeit zurück. Die mit NaF immobilisierten Spermien bilden zwar weiter ATP, der Stoffwechsel ist jedoch deutlich reduziert und der ATP-Abbau verlangsamt (Schoff und Lardy, 1987). Vor und während des Sortiervorgangs führt NaF also dazu, dass weniger Energie benötigt wird, die zu einem späteren Zeitpunkt wieder zur Verfügung steht, wodurch die Motilität über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt (Mönch-Tegeder, 2008). Klinc (2005) vermutete, dass NaF darüber hinaus Beeinträchtigungen der Mitochondrien reduziert, die bei der elektrischen Aufladung und der elektrostatischen Ablenkung entstehen können.

2.2.7 Auswirkungen geringer Spermienzahlen auf die Fruchtbarkeit

Die Besamungsportionen mit sortiertem Sperma enthalten aufgrund des zeitaufwendigen Herstellungsprozesses nur $1,5 \times 10^6$ bis $3,5 \times 10^6$ Spermien. Eine herkömmliche Besamungsportion mit tiefgefrorenem unsortiertem Sperma enthält dagegen etwa 15×10^6 Spermien. Alleine die höhere Verdünnung kann dazu führen, dass die Fruchtbarkeit auch bei nicht sortiertem Sperma reduziert wird (Maxwell und Johnson, 1999), wobei ein starker bullenindividueller Effekt bekannt ist (den Daas et al., 1998; Andersson et al., 2004; Bodmer et al., 2005; Ballaster et al., 2007).

Verschiedene Untersuchungen haben sich in den letzten Jahren mit dem Einfluss hoher Verdünnungen auf den Besamungserfolg beschäftigt. DeJarnette et al. (2008) untersuchten die Fruchtbarkeitsraten von drei Bullen, von denen geschlechtsspezifisch differenziertes Sperma in verschiedenen Konzentrationen zum Einsatz kam ($2,1 \times 10^6$, $3,5 \times 10^6$ und $5,0 \times 10^6$ Spermien/Besamungsportion). Bei zwei der drei Bullen konnte ein um 5% bzw. um 10% besseres Trächtigkeitsergebnis erzielt werden, wenn die Spermienkonzentration von $2,1 \times 10^6$ auf $3,5 \times 10^6$ Spermien pro Besamungsportion angehoben wurde. In einem weiteren Versuch von DeJarnette et al. (2010) zeigte eine Erhöhung der Spermienkonzentration von $2,1 \times 10^6$ auf $3,5 \times 10^6$ Spermien pro Besamungsportion hingegen bei sechs von sieben Bullen keinen Einfluss auf den Besamungserfolg. Durchschnittlich lag die Trächtigkeitsrate in jenen Versuchen mit $2,1 \times 10^6$ Spermien bei 43,9% und mit $3,5 \times 10^6$ Spermien bei 45,7%. Dies entspricht den Ergebnissen von Schenk et al. (2009) nach denen laktierende Kühe keine Unterschiede im Besamungserfolg aufwiesen (40,5% vs. 43,9%), wenn sie mit $2,0 \times 10^6$ oder $10,0 \times 10^6$ sortierten Spermien besamt wurden. Hierbei ist allerdings die geringe Anzahl von Besamungen mit nur jeweils 57 Tieren pro Versuchsgruppe zu beachten. Seidel und Schenk (2008) konnten bei 719 Besamungen



beobachten, dass eine Konzentration von $1,0 \times 10^6$ Spermien zu verringerten Trächtigkeitsraten führt, der Einsatz von $1,5 \times 10^6$ und $6,0 \times 10^6$ Spermien pro Besamungsportion jedoch vergleichbare Besamungserfolge hervorruft.

Somit bleibt unklar, ob die hohe Verdünnung oder der Sortierprozess den hauptsächlichen Effekt auf die geringere Fruchtbarkeit bei geschlechtsspezifisch differenziertem Sperma ausmacht. In Versuchen von Frijters et al. (2009) konnte an sieben Bullen gezeigt werden, dass die schlechteren Trächtigkeitsergebnisse mit sortiertem Sperma zu zwei Dritteln mit der hohen Verdünnung zu erklären sind und nur zu einem Drittel ein Resultat der Schädigungen aus dem Sortierprozess zu sein scheinen. Dabei waren jedoch starke bullenindividuelle Unterschiede auszumachen.

Wie viele Spermien eine Besamungsportion mit geschlechtsspezifisch differenziertem Sperma enthalten sollte, wird aufgrund dieser nicht eindeutigen Datenlage kontrovers diskutiert. DeJarnette et al. (2008) führen ökonomische Gründe gegen eine allgemeine Erhöhung der Spermienzahl an. Andersson et al. (2006) empfiehlt hingegen mehr Spermien pro Besamungsportion abzufüllen, ohne sich dabei auf eine Konzentration festzulegen. Rath et al. (2009) sprechen sich vor diesem Hintergrund dafür aus, sich von einer allgemein gültigen Gesamtzahl an Spermien pro Besamungsportion zu lösen und die Pailletten so zu befüllen, dass 2 Millionen lebende Spermien für die Besamung zur Verfügung stehen.

Bei anderen Spezies muss für den Einsatz geschlechtsspezifisch differenzierter Spermien noch deutlich stärker von der im konventionellen Einsatz üblichen Spermienzahl pro Besamungsportion abgewichen werden. So werden für eine herkömmliche Besamungsportion beim Schwein etwa $2,0 \times 10^9$ Spermien eingesetzt. Eine auch nur annähernd so große Anzahl geschlechtsspezifisch differenzierter Spermien für eine Besamungsportion zu produzieren, ist mit der derzeit verfügbaren Sortiertechnik, die auf der Messung jedes einzelnen Spermiums beruht, in praxi nicht realisierbar (Spinaci et al., 2010). So wird beim Schwein auf spezielle Besamungstechniken und andere biotechnische Verfahren wie IVF, Intracytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) oder „Gamete intrafallopian transfer“ (GIFT) zurückgegriffen, um sortiertes Sperma einzusetzen (Klinc und Rath, 2005).

Die chirurgische Besamung beim Schwein erlaubt es, die Besamungsdosis auf 5 Millionen Spermien zu reduzieren (Krueger et al., 1999). Bei dem unchirurgischen Verfahren



der tiefintrauterinen Besamung lassen sich mit $50-100 \times 10^6$ Spermien pro Besamung Trächtigkeiten erzeugen (Rath et al., 2003a; Vazquez et al., 2003; Grossfeld et al., 2005). Die hierzu notwendigen Besamungstechniken lassen sich jedoch kaum bei Jungsaunen anwenden und hatten verminderte Wurfgrößen zur Folge (Klinc und Rath, 2005). Zudem scheinen Eberspermien stärker als Bullen- und Schafbockspermien auf den Stress zu reagieren, der durch das Sortieren hervorgerufen wird (Vazquez et al., 2009). Die Lagerung und der Transport sortierter Eberspermien stellt ebenfalls eine große Herausforderung dar und müsste für den kommerziellen Einsatz deutlich verbessert werden (Spinaci et al., 2010). Unter den gegebenen Voraussetzungen ist der Einsatz in der landwirtschaftlichen Praxis daher nicht realisierbar. Da die Kastration männlicher Ferkel ohne Betäubung verboten werden soll, könnte der Einsatz X-chromosomalen Spermias in der Ferkelproduktion aus Aspekten des Tierschutzes sowie arbeitswirtschaftlicher und produktionstechnischer Sicht jedoch große Vorteile bringen (Klinc und Rath, 2005).

Beim Pferd werden für konventionelle Besamungen ebenfalls relativ hohe Besamungsdosen von 500×10^6 Spermien verwendet. Für den Einsatz sortierten Spermias muss die Besamungsportion daher wie beim Schwein drastisch reduziert werden. Dies gelingt mit der hysteroskopischen Besamungstechnik direkt auf die Eileiterpapille (Lindsey et al., 2002). Die Qualität von Hengstsperma differiert stark zwischen den Hengsten sowie den einzelnen Ejakulaten. Durch verschiedene Anpassungen wurde versucht die Qualität von sortiertem Hengstsperma zu steigern. So zeigten Knop et al. (2005), dass Hengstsperma weniger geschädigt wird, wenn die Zentrifugation mit einem Kissenzusatz erfolgt. Zudem hilft die Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) über einen diskontinuierlichen PureSperm[®]-Gradienten vor dem Sortieren und Einfrieren hochwertige Spermien zu selektieren, wodurch die Qualität der Besamungsportionen verbessert wird (Heer, 2007). Des Weiteren tragen modifizierte automatische Einfrierprotokolle zu einer besseren Lebensfähigkeit sortierter Hengstspermien bei (Buss, 2006; Clulow et al., 2008). Trotz dieser Entwicklungen sind die Trächtigkeitsraten nach dem Einsatz sortierten Hengstspermias gering (Lindsey et al., 2000; Lindsey et al., 2002). Auch in kürzlich veröffentlichten Versuchen von Mari et al. (2010) wurden von sieben unmittelbar nach dem Sortieren hysteroskopisch besamten Stuten nur zwei Trächtigkeiten (28,6%) erzeugt, woraus lediglich ein gesundes Fohlen geboren wurde. Clulow et al. (2008) besamten Stuten mit 6×10^6 , 13×10^6 oder 25×10^6 sortierten sowie nicht sortierten Spermien. Beim sortierten Sperma konnte lediglich eine Trächtigkeit bei 29 Zyklen ermittelt werden. Da in diesen



Versuchen ebenfalls nur zwei Trächtigkeiten aus 31 Zyklen bei den Kontrollpermien beobachtet wurden, gehen die Autoren davon aus, dass die schlechteren Trächtigkeitsraten überwiegend auf die hohe Verdünnung des Spermas zurückzuführen sind.

Interessanterweise ist es beim Schaf mittels laparoskopischer Besamung möglich, gute Besamungsergebnisse mit sortierten Spermien zu erreichen, die im Vergleich zu unsortiertem Sperma zumindest gleichwertig sind. So wurden in einem Versuch von de Graaf et al. (2007b) mit $1,0 \times 10^6$, $5,0 \times 10^6$ oder $15,0 \times 10^6$ sortierten Spermien vergleichbare Besamungsergebnisse erzielt, wie sie mit $15,0 \times 10^6$ oder $50,0 \times 10^6$ unsortierten Spermien erreicht wurden. Die Ergebnisse aus diesen Besamungen waren sogar besser als beim Einsatz von $1,0 \times 10^6$ und $5,0 \times 10^6$ unsortierter Spermien pro Besamungsportion. In diesem Zusammenhang steht die Beobachtung, dass beim Schaf das Lysozym-Ähnliche Protein SLLP1 nur in unwesentlichen Mengen in den sortierten Spermien zu finden war. Bei nicht sortierten Spermien hingegen, konnte dieses Protein, welches ein Indiz für bereits akrosomenreagierte Spermien ist, nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde das Protein im Ausschuss, der während des Sortierens anfällt, im erhöhten Maße gemessen. Somit scheinen bereits akrosomenreagierte Schafbockspermien während des Sortiervorgangs ausgesondert zu werden (Leahy et al., 2008; de Graaf et al., 2009). Zudem leidet sortiertes Schafsperma weniger bei der Lagerung als es beim Bullen und beim Schwein der Fall ist (Hollinshead et al., 2004; Garner, 2006).

Das Schaf ist darüber hinaus die einzige Nutztierspezies, bei der der Einsatz tiefgefrorener und aufgetauter, dann sortierter und im Anschluss erneut tiefgefrorener Spermien zu akzeptablen Fruchtbarkeitsergebnissen führt (de Graaf et al., 2007c). Auch beim Rind wurden auf diesem Gebiet deutliche Fortschritte *in vitro* gemacht (Underwood et al., 2009a). Dennoch ist der Besamungserfolg weit unterdurchschnittlich, wenn nach diesem Verfahren erzeugtes Bullensperma eingesetzt wird (Underwood et al., 2009b; 2010a;b).

2.3 Effekte des Einfrierens und des Auftauens auf die Spermaqualität

Das Abkühlen, Einfrieren und Auftauen von Spermien bedeutet zusätzliche Belastungen für die Zellen und führt u.a. zu subletalen Schädigungen. Daraus resultieren reduzierte Motilitätswerte sowie eine herabgesetzte Integrität der Akrosom- und Plasmamembran. Des Weiteren werden Schädigungen an der DNA hervorgerufen. Die Belastungen sind auf den Kälteschock, die Eiskristallbildung, den oxidativen Stress, die osmotischen Veränderungen und den Lipid-Protein-Reorganisationen in der Zellmembran zurückzuführen.



ren (Watson, 1995; Bailey et al., 2000; Bucak et al., 2010). Letztendlich führt der Einfrierprozess zu einer geringeren Befruchtungskapazität in vivo (Aitken et al., 1998; Vishwanath und Shannon 2000; Medeiros et al., 2002; Bucak et al., 2010). Die Auswirkungen des Einfrierens auf bovines Sperma werden in einem Versuch von Shannon und Vishwanath (1995) deutlich. Hier ergab sich für Frischsperma eine Motilität von 80% und für TG-Sperma eine Motilität von 40%. Nach der Besamung mit diesen Spermien ergaben sich für Portionen mit 20×10^6 TG-Spermien vergleichbare Trächtigkeitsraten wie mit $2,5 \times 10^6$ Frischspermien (67,6% bzw. 68,1% tragende Tiere). Bei höherer Verdünnung des Ejakulats musste eine eingefrorene Besamungsportion 5×10^6 Spermien enthalten um vergleichbare Trächtigkeitsraten wie mit $0,5 \times 10^6$ Frischspermien zu erreichen (59,7% bzw. 61,1% tragende Tiere). Die durch das Einfrieren bedingten Schäden führen also auch dazu, dass die Anzahl von Spermien pro Besamungsportion deutlich erhöht werden muss, um akzeptable Trächtigkeitsraten zu gewährleisten.

Zudem hat das Auftauverfahren einen bedeutenden Einfluss auf die Qualität der Spermien. Für das optimale Auftauverfahren spielt die Verpackungsart sowie die Größe der verwendeten Paillette (Chandler et al., 1984) und das daraus resultierende Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Pailletten (Senger, 1980) eine wichtige Rolle. Zudem muss das Auftauverfahren an die beim Einfrieren eingesetzten Verdüner, die Glycerinkonzentration sowie die Abkühl- und Einfrierrate angepasst werden. Auch die Toleranz der Spermien gegenüber unterschiedlichen Auftauregimen wird von diesen Punkten beeinflusst (Rodriguez et al., 1975; Robinson et al., 1976). Zusätzlich gibt es zwischen den Bullen und gegebenenfalls sogar zwischen den einzelnen Ejakulaten unterschiedliche Toleranzen gegenüber suboptimalen Auftauverfahren (DeJarnette et al., 2000; 2005).

Um zusätzliche Schädigungen durch das Einfrieren und Auftauen auszuschließen, kann es sinnvoll sein, sortiertes Frischsperma für die künstliche Besamung von Rindern einzusetzen. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die logistischen Voraussetzungen für die Verteilung von frisch gelagertem Sperma gegeben sind (Klinc et al., 2007).