

Klinik für Reproduktionsmedizin
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Heiner Bollwein

und

Institut für Fortpflanzung
landwirtschaftlicher Nutztiere Schönnow e.V. (IFN)

Untersuchungen zum Einfluss der Fütterung von Fett auf die Spermaqualität Deutscher Fleckviehbullen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Markus Gropper

Tierarzt

aus Memmingen, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Heiner Bollwein, Referent

Prof. Dr. med. vet. Harald Sieme, Korreferent

2015

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	4
2	SUMMARY	5
3	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	6
4	LITERATURÜBERSICHT	9
4.1	Fettsäuren in der Plasmamembran verschiedener Tierarten	9
4.2	Auswirkung der Fettsäurezusammensetzung auf die Spermienfunktion	10
4.3	Fütterungsversuche mit Omega-3-Fettsäuren	13
4.4	Fütterungsversuche mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren an kleinen Wiederkäuern	17
4.5	Fütterungsversuche mit Omega-3-Fettsäuren an Zuchtbullen	18
5	MATERIAL UND METHODEN	22
5.1	Material	22
5.1.1	Tiere	22
5.1.2	Fütterung	23
5.2	Methoden	24
5.2.1	Versuchsdurchführung	24
5.2.2	Spermagewinnung	27
5.2.3	Spermabeurteilung	27
5.2.4	Äquilibrierung, Konfektionierung und Einfriervorgang	28
5.2.5	Konventionelle Untersuchungen des kryokonservierten Spermias	28
5.2.6	Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie	31
5.2.7	Bestimmung des Vitamin E-Status	41
5.2.8	Bestimmung der Totalen Antioxidativen Kapazität	41
5.2.9	Statistische Auswertung	41
6	ERGEBNISSE	42
6.1	Tiergesundheit	42
6.2	Konventionelle Spermparameter	42
6.3	Mikroskopische Motilitätsanalyse	43
6.4	Computergestützte Motilitätsanalyse	44
6.5	Spermienmorphologie	45
6.6	Durchflusszytometrische Spermparameter	46
6.6.1	Plasmamembran und Akrosom	46
6.6.2	Mitochondrienmembranpotential	47
6.6.3	Bestimmung der Lipidperoxidation mittels C11-Bodipy ^{581/591}	49
6.6.4	DNA-Integrität	50
6.7	Vitamin E-Status aller Bullen	50
6.8	Totale Antioxidative Kapazität	51

7	DISKUSSION	52
7.1	Tiergesundheit	52
7.2	Futtermittel	52
7.3	Spermaquantität	53
7.4	Spermaqualität	55
7.5	Schlussfolgerungen und Ausblick	61
8	LITERATURVERZEICHNIS	63
	DANKSAGUNG	72
	CURRICULUM VITAE	73
9	ANHANG	74
9.1	Futtermittelzusammensetzung	74
9.1.1	ALikon® Omega-3	74
9.1.2	LactoPlus-FA (pansenstabiles Fettpulver)	75
9.1.3	Milchleistungsfutter II „I AM 163“	76
9.1.4	Bullenmineral Besamungsstation BVN NEA	77
9.1.5	Blattisan Vitamin E 65	78
9.2	Geräte und Chemikalien zur Beurteilung der Motilität und Morphologie	78
9.3	Herstellung der Reagenzien	79
9.3.1	Phosphatgepufferte NaCl – Lösung pH 7.0 (pNaCl)	79
9.3.2	Fixierlösung	79
9.4	Geräte und Chemikalien sowie Definition und Klassifizierung der Spermien und Subpopulationen am „Sperm vision“	80
9.5	Medien, Chemikalien und Geräte für die durchflusszytometrischen Versuche	81
9.5.1	Chemikalien und Fluorochrome	81
9.5.2	Tyrode-Medium	82
9.5.3	Medien für SCSA™	83
9.5.4	Geräte und Materialien	84
9.6	Geräte und Chemikalien zur Bestimmung der Totalen Antioxidativen Kapazität	85

1 Zusammenfassung

Markus Gropper:

Untersuchungen zum Einfluss der Fütterung von Fett auf die Spermaqualität Deutscher Fleckviehbullen

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der Zufütterung von Fettsäuren auf Spermaproduktion und -qualität zu untersuchen. Drei Gruppen Deutscher Fleckviehbullen ($n = 18$) wurden neben einer Grundration 400 g pansengeschützte Alpha-Linolensäure, 400 g gesättigte Fettsäuren (Versuchsgruppen) oder 1.6 kg kommerzielles Konzentrat (Kontrollgruppe) gefüttert. Die Futtermischung aller drei Tiergruppen war isoenergetisch. Über 27 Wochen wurden direkt nach der Samengewinnung Volumen, Dichte, Gesamtspermienzahl und Vorwärtsmotilität bestimmt. Im Rahmen der Qualitätsbeurteilung des kryokonservierten Spermas wurden Morphologie und Motilität der Spermien sowie durchflusszytometrisch der Anteil plasmamembran- und akrosomintakter (PMAI)/akrosomal gefärbter (AF) Spermien, die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion (IAR), das Mitochondrienmembranpotential (MMP), die Lipidperoxidation (LPO) der Spermienmembran sowie die DNA-Integrität (DFI) ermittelt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Supplementierung von Alpha-Linolensäure bzw. gesättigten Fettsäuren keinen Einfluss auf die Quantität und Qualität des nativen und kryokonservierten Spermas hatte ($p > 0.05$). Folglich konnten weder nach Zufütterung von ungesättigten noch gesättigten Fettsäuren Effekte auf die Spermaquantität bzw. -qualität beim Bullen beobachtet werden.

Stichworte: Fettsäuren, Spermaquantität, Spermaqualität, Kryokonservierung, Bulle

2 Summary

Markus Gropper:

Untersuchungen zum Einfluss der Fütterung von Fett auf die Spermaqualität Deutscher Fleckviehbullen (Investigations about the effect of feeding fat on sperm quality of German Simmental bulls)

The aim of the present study was to investigate the effects of feeding fatty acids on sperm production and semen quality. Three groups of German Simmental bulls (n = 18) were fed a standard ration, and apart were supplemented with either 400 g rumen protected alpha-linolenic acid or 400 g of saturated fat (experimental groups) or 1.6 kg commercial concentrate (control group). Feeding rations of all groups were isoenergetic. Ejaculate volume, sperm concentration, total sperm number, and progressive motility in raw semen were measured directly after collection for 27 weeks. After thawing, morphology and motility of the cryopreserved samples were determined and flow cytometric parameters as plasma membrane and acrosomal integrity (PMAI) and acrosomal staining (AS), inducibility of acrosome reaction (IAR), mitochondrial membrane potential (MMP), lipid peroxidation (LPO) of sperm membrane, and DNA integrity (DFI) were analyzed. The results showed, that supplementation of neither alpha-linolenic acid nor saturated fatty acids improved quantity and quality of bovine sperm before and after cryopreservation ($p > 0.05$). In summary no effects of unsaturated or saturated fatty acids on sperm quantity and quality parameters of bulls could be noticed.

Keywords: fatty acids, sperm quantity, sperm quality, cryopreservation, bull

3 Einleitung und Fragestellung

Moderne Milchviehbetriebe nutzen weltweit überwiegend die künstliche Besamung mit kryokonserviertem Sperma zur Reproduktion ihrer Herden (Curry 2000). Das Ziel der Tierhalter ist, beim Einsatz von Spitzenbullen hohe Trächtigkeitsraten zu erreichen. Die Besamungsorganisationen wollen deshalb ihren Kunden kryokonserviertes Sperma von höchster Qualität anbieten (Amann & DeJarnette 2012).

Bei der Kryokonservierung werden die Spermien durch Abkühlung, Eiskristallbildung, osmotische Veränderungen sowie oxidativen Stress geschädigt (Gao & Critser 2000, Chatterjee & Gagnon 2001, John Morris *et al.* 2012). Nach dem Wiederauftauen überleben jedoch nur 30 bis 50 % der Spermien diese Vorgänge (Vishwanath & Shannon 2000, Benson *et al.* 2012). So beeinflussen bei kryokonserviertem Sperma neben der Wahl des Bullen (García-Ispierto *et al.* 2007) auch die Anzahl der Spermien je Besamungsportion die Fruchtbarkeitsergebnisse (Pace *et al.* 1981, Shannon & Vishwanath 1995).

Vor der offiziellen Einführung der genomischen Selektion von Besamungsbullen waren die meisten nachzuchtgeprüften Bullen in der Lage, genügend Sperma zu produzieren, um die Nachfrage zu befriedigen. Nur 10 bis 15 % der von Besamungsstationen vermarkteten Bullen zählten zu den Spitzenvererbern mit einer besonders hohen Spermanachfrage. Aktuell entwickelt sich jedoch ein stark steigender Markt für über Single-Nucleotide-Polymorphism-Marker selektierte Jungbullen, deren Sperma ab einem Alter von ca. 15 Monaten den Milchviehhaltern angeboten wird. Allerdings haben diese Bullen im ersten Jahr eine um 35 bis 50 % geringere Produktionskapazität als Altbullen (Amann & DeJarnette 2012).

Die aktuelle Herausforderung beim Kryokonservieren ist nun, die Einfrierverluste zu reduzieren, um mit einer geringeren Spermienzahl je Portion auch mit den jungen genomischen Bullen ausreichende Produktionsmengen mit guten Fruchtbarkeitsergebnissen zu erzielen. Die in den vergangenen Jahren zunehmende Bedeutung von gesextem Bullensperma verlangt ebenfalls aufgrund der hier üblicherweise stark reduzierten Spermienzahl je Paillette eine Optimierung des Kryokonservierungsprozesses. Die Spermaaufbereitung (Arzondo *et al.* 2012), die Verdünnermedien (Vera-Munoz *et al.* 2009, Hu *et al.* 2010, Taşdemir *et al.* 2013), das Kühlregime und die Konfektionierung (Griga 2008, Anzar *et al.* 2011) bieten Ansatzpunkte zur Verbesse-

nung von kryokonserviertem Bullensperma. Eine möglichst intakte Spermienmembran nach der Kryokonservierung ist dabei von zentraler Bedeutung.

Laut Stubbs und Smith (1984) kann davon ausgegangen werden, dass ein zunehmender Anteil ungesättigter Fettsäuren der Plasmamembran in Zusammenhang mit dessen erhöhter Fluidität steht, die wiederum den Prozess der Kryokonservierung beeinflusst. So tolerieren Spermien mit einer hohen Membranfluidität die schädigenden Einflüsse der Kryokonservierung besser (Giraud *et al.* 2000). Die Zunahme von oxidativem Stress im Verlauf des Einfrier- und Auftauvorgangs von Bullenspermien führt zu einer zunehmenden Lipidperoxidation und reduziert die Membranfluidität (Chatterjee & Gagnon 2001).

Um die ungesättigten Fettsäuren der Phospholipidmembran möglichst vor der Oxidation zu schützen und die Spermaqualität zu verbessern, wurden bei der Kryokonservierung von Bullensperma erfolgreich Antioxidantien zum Verdünner hinzugegeben (Beconi *et al.* 1993, Bilodeau *et al.* 2002, Klinc & Rath 2007, Hu *et al.* 2011). Des Weiteren wurde in jüngerer Vergangenheit versucht, über die Zugabe von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zum Verdünnermedium die Membraneigenschaften positiv zu beeinflussen. Diesen Untersuchungen zufolge ist der Erhalt der Membranfluidität auf den Einbau ungesättigter Fettsäuren in die Spermienmembran zurückzuführen und ausschlaggebend für die verbesserte Spermaqualität (Takahashi *et al.* 2012, Towhidi & Parks 2012, Nasiri *et al.* 2012). Allerdings wird diese Aussage kontrovers diskutiert. So zeigten zwei Studien auch einen weniger vorteilhaften bzw. einen konzentrationsabhängigen nachteiligen Effekt der Fettsäuren auf die Qualität von kryokonserviertem Bullensperma (Soares *et al.* 2013, Abavisani *et al.* 2013), wenn notwendige Homogenisierungsmittel zur Lösung der hydrophoben Fettsäuren im hydrophilen Verdünner zu nativem Bullensperma hinzugegeben wurden (Abavisani *et al.* 2013).

Eine alternative Möglichkeit der Veränderung der Fettsäurezusammensetzung der Spermienzellmembran zur Verringerung der Membranschäden bei der Kryokonservierung stellt die orale Zufuhr von Fettsupplementen dar. In vorangegangenen Fütterungsversuchen bei Holstein-Friesian-Bullen mit Omega-3-Fettsäuren konnten positive Auswirkungen auf wichtige Spermaparameter festgestellt werden (Dehning 2008, Gholami *et al.* 2010, Moallem *et al.* 2015). Durch die Fettsupplementierung stieg entsprechend die Energiedichte in der Futtermittelration an. Auch die Energieversorgung von Bullen hat einen wichtigen Einfluss auf die Spermaproduktion (Kastelic 2014). Die

bisherigen Studien bei Bullen, mit Ausnahme der von Moallem *et al.* (2015), hatten allerdings diesen Umstand nicht berücksichtigt und keine energetisch gleichwertig gefütterte Versuchsgruppe ohne Fettsupplementierung eingesetzt, weshalb eine Vergleichbarkeit der festgestellten Ergebnisse zwischen Versuchs- und Kontrollgruppen nicht eindeutig gegeben ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit zu untersuchen, ob durch die Zufütterung von gesättigten bzw. ungesättigten Fettsäuren Spermaquantität und -qualität verändert werden. So wurden im Rahmen dieser Studie Fütterungsversuche zum einen mit einer Fettzulage sowie einer Ration mit einem erhöhten Anteil an der Omega-3-Fettsäure Alpha-Linolensäure (C18:3n3), zum anderen mit einer isoenergetischen Ration ohne Fettsupplementierung durchgeführt und deren Einfluss auf Volumen und Qualität der Ejakulate von Fleckvieh-Besamungsbullen verglichen.

4 Literaturübersicht

4.1 Fettsäuren in der Plasmamembran verschiedener Tierarten

Fettsäuren (FS) sind ein wichtiger Bestandteil der Phospholipiddoppelschicht von Zellmembranen. Innerhalb des Phospholipidmoleküls der zytoplasmatischen Membranen von Säugetieren sind jeweils gesättigte und ungesättigte FS wichtige molekulare Bestandteile (Sinowatz 2000). Nach Horn und Moc (2012) handelt es sich bei Palmitinsäure um die generell häufigste gesättigte FS (engl.: saturated fatty acid; SFA), bei Ölsäure um die bedeutendste ungesättigte FS der Zellmembranphospholipide. Auch in Plasmamembranen von Spermien ist die gesättigte Palmitinsäure anteilmässig am häufigsten vertreten (Poulos *et al.* 1973a, Poulos *et al.* 1973b, Lenzi *et al.* 1996). Im Unterschied zu Plasmamembranen somatischer Zellen beschreibt Rován (2001) jedoch einen ungewöhnlich hohen Anteil an mehrfach ungesättigten FS (engl.: polyunsaturated fatty acid; PUFA) in der Spermienmembran. Lenzi *et al.* (1996) stellten eine deutlich höhere PUFA-Konzentration insbesondere in zytoplasmatischen Membranen von Spermien gegenüber Blutplasma- und Erythrozytenmembranen fest. Die bei Fettsäureanalysen von Spermienphospholipiden diverser Mammalia in bedeutendem Umfang nachgewiesenen ungesättigten FS waren neben der einfach ungesättigten Ölsäure die mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolsäure (LA, C18:2n-6), Arachidonsäure (AA, 20:4n-6), Docosapentaensäure (DPA; C 22:5n-6) und Docosahexaensäure (DHA, C22:6 n-3; Abb.1). Die quantitativ am häufigsten auftretende ungesättigte FS davon war DHA (Poulos *et al.* 1973a, Poulos *et al.* 1973b, Lenzi *et al.* 1996).

Dabei unterscheiden sich die Gehalte der gesättigten und ungesättigten FS der Spermienzellmembranen tierartlich zum Teil deutlich. Betrachtet man dazu zunächst das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten FS der Spermienzellmembran verschiedener Spezies, so überwiegt der Anteil an PUFA bei Bullen (Poulos *et al.* 1973a, Poulos *et al.* 1973b), Büffelbullen (Jain & Anand 1976), Schafböcken (Poulos *et al.* 1973b), Ebern (Poulos *et al.* 1973b, Rooke *et al.* 2001, Cerolini *et al.* 2001, Amin *et al.* 2010) und Hengsten (Parks & Lynch 1992, Macías García *et al.* 2011a). Bei Hasen (Poulos *et al.* 1973b) und männlichen Affen (Connor *et al.* 1998) ist das Verhältnis gesättigter FS zu ungesättigten FS dagegen ausgeglichen. Hinsichtlich der Differenzierung von PUFAs in Abhängigkeit von dem Verhältnis der Omega-3-(n-3)-

zu den Omega-6-(n-6)-FS in der Spermienmembran der einzelnen Tierarten lässt sich folgende Erkenntnis erzielen: Bei Eber, Hengst und Hase überwiegt das Verhältnis von n-6: n-3 PUFA. Ursache dafür ist, dass speziell bei diesen Spezies die Omega-6-FS DPA (C 22:5n-6) in einem hohen Mass in den Phospholipiden vorliegt (Poulos *et al.* 1973b, Parks & Lynch 1992, Rooke *et al.* 2001, Cerolini *et al.* 2001, Am-in *et al.* 2010, Macías García *et al.* 2011a). Im Unterschied dazu sind n-3-FS bei Bullen-, Büffelbullen- und Schafbockspermien dominant: Bei diesen Spezies nimmt DHA (C 22:6n-3) den Grossteil der FS der Phospholipide ein (Poulos *et al.* 1973a, Poulos *et al.* 1973b, Jain & Anand 1976). In aktuellen Studien wurden bei Lipidanalysen von Spermien des Bullen die Omega-6-Fettsäuren Linolsäure (LA; C18:2n-6) und Arachidonsäure (AA; C20:4n-6) in nennenswertem Umfang isoliert, wobei der Anteil der Omega-3-Fettsäure DHA in allen Analysen höher war (Argov-Argaman *et al.* 2013a, Argov-Argaman *et al.* 2013b). Des Weiteren konnte für das Vorliegen von Omega-3- und Omega-6-Fettsäuren in der Membran von Bullenspermien festgestellt werden, dass sich die Parameter Alter des Bullen (Kelso *et al.* 1997a; Argov-Argaman *et al.* 2013a) und Jahreszeit (Argov-Argaman *et al.* 2013b) messbar auf den Anteil der ungesättigten Fettsäuren der Plasmamembran (v. a. DHA) auswirken. Dabei fiel der Anteil der ungesättigten FS und speziell der DHA mit zunehmendem Alter bzw. im Sommer ab.



Abb. 1: Strukturformel der Docosahexaensäure (DHA, C22:6n3)

4.2 Auswirkung der Fettsäurezusammensetzung auf die Spermienfunktion

Gesättigte und ungesättigte FS der Phospholipidmembranen haben allgemein wichtige Funktionen durch ihren regulativen Einfluss auf die Membranfluidität. Eine gesteigerte Fluidität wird grundsätzlich durch einen erhöhten Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Phospholipidmembran erreicht (Hall *et al.* 1991). Gesättigte FS wirken diesem Phänomen entgegen; nach Leekumjorn *et al.* (2008) sind Palmitylsäurereste in HepG2-Zellen unter anderem dafür verantwortlich, dass eine

niedrigere Fluidität der Membran und ein engerer Molekularverbund der einzelnen Membranbestandteile erreicht werden. Dies trifft vor allem auf die innen liegenden Areale des Phospholipidmoleküls zu, in denen die Palmitinsäurekonzentration besonders hoch ist.

Die Fluidität der Spermienmembran im Speziellen hat wichtige Auswirkungen auch auf die Funktionalität der Samenzellen. Connor *et al.* (1998) zufolge trägt die ungesättigte FS DHA mit ihren vielfachen Doppelbindungen entscheidend zur Membranfluidität bei, die für die Bewegung des Spermischwanzes und damit die Spermienmotilität notwendig ist. Bei Bullen ist bekannt, dass deren Fruchtbarkeit in enger Korrelation zur Motilität der Samenzellen steht (Christensen *et al.* 2005, Kasimanickam *et al.* 2006). Ebenfalls korrelierten die Plasmamembranintegrität (Christensen *et al.* 2005) sowie die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion von Bullenspermien (Whitfield & Parkinson 1995) positiv mit den Non-Return-Ergebnissen der untersuchten Bullen. Der Befruchtungserfolg kann wesentlich vom Gehalt verschiedener Fettsäuren der Membranphospholipide der Spermien abhängig sein, was Cerolini *et al.* (1997) anhand einer positiven Korrelation langkettiger PUFA der Phospholipide und der Fertilität von Hähnchensperma bestätigen konnten. Auch nach Argov-Argaman *et al.* (2013a) sind der Gehalt ungesättigter Fettsäuren und damit die Fluidität von grosser Wichtigkeit für die Funktionalität der Spermien bei ablaufenden Membranprozessen während der Fertilisation sowie Kryokonservierung.

Die für die Fluidität verantwortlichen cis-Doppelbindungen der PUFA sind allerdings chemisch besonders empfindlich gegenüber der von freien Radikalen (ROS; Reactive oxygen species) ausgelösten Lipidperoxidation (LPO) (Girotti 1985, Calisici 2010). Die LPO zeichnet sich durch einen deutlich negativen Einfluss auf die Haltbarkeit der Samenzellen aus. In einer Vielzahl von Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine LPO der Membranlipide zu veränderten Spermieigenschaften und/oder einem verringerten Fertilitätspotential von Bullen (Nair *et al.* 2006, Kasimanickam *et al.* 2007), Büffeln (Kadirvel *et al.* 2009), Hengsten (Neild *et al.* 2005), Ebern (Guthrie *et al.* 2008, Kumaresan *et al.* 2009), Geflügel (Wishart 1984) und Männern (Aitken & Clarkson 1987, Aitken *et al.* 1989, Aitken 1994, Alvarez *et al.* 1987, Selley *et al.* 1991, Sikka *et al.* 1995) führt.

Die Spermakonservierung und der damit verbundene oxidative Stress begünstigen den Ablauf von Lipidperoxidationen in den Membranen der Spermien. Das Sperma ist während des Konservierungsprozesses dem umgebenden Luftsauerstoff und ei-

nem Kälteschock ausgesetzt – beide Einflüsse erhöhen die Empfindlichkeit gegenüber einer LPO. Im Vergleich zu Nativsperma konnte ein allgemein höherer Grad der LPO bei Flüssigkonservierung und Kryokonservierung nachgewiesen werden (Kadirvel *et al.* 2009, Chatterjee & Gagnon 2001). Nach dem Gefrier- und Auftauprozess von Spermien verschiedener Spezies reduzierte sich der Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Phospholipide bei einer Zunahme des Anteils an gesättigten Fettsäuren (Alvarez & Storey 1992, Cerolini *et al.* 2001, Chakrabarty *et al.* 2007). Nach Alvarez & Storey (1992) und Cerolini *et al.* (2001) ist die verstärkte LPO während der Kryokonservierung Ursache der veränderten Fettsäuremuster. Während nach White (1993) die speziesspezifische Kälteschockempfindlichkeit und damit auch die weniger erfolgreiche Kryokonservierung der Spermien mit einem hohen Verhältnis von PUFA zu SFA und niedrigen Cholesterolanteilen der Membran in direktem Zusammenhang stehen, sehen Studien aus jüngerer Vergangenheit (Giraud *et al.* 2000, Miller *et al.* 2004, Melville *et al.* 2012, Martínez-Soto *et al.* 2013) eher die Bedeutung im Vorkommen von erhöhten Anteilen ungesättigter Fettsäuren der Zellmembran, um den Schaden durch den Kälteschock zu reduzieren und dabei die Toleranz der Spermien gegenüber dem Abkühlen und der Kryokonservierung zu verbessern. Die Plasmamembran von Spermienzellen erfährt durch den Temperatursturz eine Änderung der Phasen der Membranlipide und wechselt dabei vom flüssigkristallinen in den gelartigen Zustand. Die dabei entstehenden physikalischen Veränderungen (Phasenseparationen) führen zu Membranschäden (Drobnis *et al.* 1993). Der Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren und damit die Fluidität der Spermienzellmembran können den Schädigungsgrad beeinflussen; der Erfolg der Kryokonservierung von Spermienzellen ist nachweislich mit einer hohen Fluidität der Plasmamembran eng assoziiert (Giraud *et al.* 2000, Blesbois *et al.* 2008). Ferner korreliert der Gehalt der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (v. a. DPA) von Hengstspermien mit der Integrität der Spermienmembran im Anschluss an das Auftauen. Dagegen stehen die gesättigten Fettsäuren in direktem Zusammenhang zu Schäden der Zytoplasmamembran (Macías García *et al.* 2011b). Bei verschiedenen Eberassen waren insbesondere ein hoher DPA-Gehalt und das Vorkommen von DHA in positive Verbindung mit der Unversehrtheit der Zellmembran zu bringen (Waterhouse 2006). Auch Vergleiche diverser Studien unterschiedlicher Wildtierarten (Elefanten (Swain & Miller 2000), Füchse (Miller *et al.* 2005) und Beuteltiere (Miller *et al.* 2004)) konnten verdeutlichen, dass ein hoher Gehalt der Spermienmembran an DHA und DPA

grundsätzlich mit dem Erfolg der Kryokonservierung der Spermienzellen der jeweiligen Art in direktem, positivem Zusammenhang steht.

Bei Bullen konnte durch Fütterung von Omega-3-FS der DHA-Gehalt in den Spermien erhöht und in der Folge eine Verbesserung der Membraneigenschaften von kryokonserviertem Sperma bewirkt werden (Dehning 2008). In der letztgenannten Arbeit konnte aber auch durch Fütterung von gesättigten FS die Spermaqualität verbessert werden. Gesättigte FS nehmen dabei eine Reihe wichtiger zellulärer Funktionen (Legrand & Rioux 2010) ein: Nach Jan *et al.* 2004 beeinflussen gesättigte FS unter anderem die Desaturaseaktivität. Bei Ratten führten diätetisch verabreichte gesättigte FS zu einem Einbau von PUFA in das Körpergewebe (Legrand *et al.* 2010).

4.3 Fütterungsversuche mit Omega-3-Fettsäuren

Die beobachtete Veränderung der Fettsäuremuster während der Spermienreifung (Poulos *et al.* 1973a, Hall *et al.* 1991, Aveldano *et al.* 1992) führte zu der Annahme, dass die Fettsäurezusammensetzung von Spermien über diätetische Massnahmen beeinflusst werden kann. Die biochemische Basis und die Ausgangssubstanzen zur Manipulation der Fettsäurestruktur von Spermienzellmembranen über die Nahrung sind die essenziellen Fettsäuren (engl.: essential fatty acids; EFAs) Linolsäure (LA, C18:2n-6) und Alpha-Linolensäure (ALA, 18:3n-3). Aus Linolsäure (18:2n-6) entsteht Arachidonsäure (AA, 20:4n-6) als Hauptendprodukt des n-6-Stoffwechselwegs. Linolsäure kommt in Pflanzenölen wie Mais-, Sonnenblumen-, Distel-, Raps- und Olivenöl vor. Eicosapentaensäure (EPA, 20:5n-3) und Docosahexaensäure (DHA, 22:6n-3) sind bedeutende Fettsäuren, die über enzymatische Elongations- und Desaturationsprozesse aus Alpha-Linolensäure synthetisiert werden können. ALA ist in Lipiden von Chloroplasten der Pflanzen enthalten und über Blätter, Gras und Silage aufnehmbar. Leinöl ist eines der wenigen Pflanzenöle mit hohem ALA-Gehalt und einem auch beträchtlichen LA-Gehalt. Fischöl ist ebenso reich an ALA und eine gleichzeitig direkte Quelle von EPA und DHA (Sargent 1997), die dem Zellstoffwechsel somit ohne vorangehende biochemische Syntheseprozesse zur Verfügung stehen können. Die in Studien an diversen Spezies überwiegend verabreichten Fettsupplemente waren Leinöl bzw. Leinsamen und Fischöl (siehe Tab. 1). Zusammenfassend hatte bei Studien an Geflügel (Surai *et al.* 2000a, Blesbois *et al.* 2004), Ebern (Rooke *et al.* 2001, Mitre *et al.* 2004, Strzezek *et al.* 2004, Maldjian *et al.* 2005, Estienne *et al.*

2008, Castellano *et al.* 2010b), Hengsten (Brinsko *et al.* 2005, Harris *et al.* 2005, Schmid-Lausigk & Aurich 2014) und Kaninchen (Gliozzi *et al.* 2009, Mourvaki *et al.* 2010) die Fütterung mehrfach ungesättigter Fettsäuren grundsätzlich positive Effekte auf verschiedene Spermaqualitätsparameter und auch auf das Spermaproduktionsvermögen. Die zahlreichen an unterschiedlichen Spezies durchgeführten Fütterungsversuche mit PUFA erbrachten keine eindeutigen Aussagen zu einem individuellen oder speziestypischen Effekt auf die Spermienmotilität. Diese war nur in wenigen Fütterungsstudien von den PUFAs positiv beeinflusst worden und hier insbesondere bei über mehrere Stunden bzw. Tage flüssigkonserviertem Sperma (Mitre *et al.* 2004, Brinsko *et al.* 2005, Castellano *et al.* 2010b, Schmid-Lausigk & Aurich 2014).

Bei Männern (Conquer *et al.* 2000) und Ebern (Paulenz *et al.* 1995, Castellano *et al.* 2010a) hatte die PUFA-Supplementierung keine Auswirkungen auf die Spermaqualität oder Fruchtbarkeitsmerkmale. Trotz Zunahme der Membranintegrität (Zaniboni *et al.* 2006) verbesserten sich die Fruchtbarkeitsparameter bei Truthähnen nicht. Nur Kelso *et al.* (1997b) stellten nach ersten positiven Effekten der Alpha-Linolensäure auf die Fertilität von Hähnen bei fortdauernder Fütterung nachteilige Auswirkungen fest. Zusammenfassend hat die Fütterung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in den meisten Studien enormen Einfluss auf die Fettsäurezusammensetzung der Spermienzellmembran verschiedener Spezies. Nur Conquer *et al.* (2000) konnten keine Veränderung der Fettsäuregehalte der Spermien feststellen, während sich in den übrigen erwähnten Studien v. a. der DHA-Anteil der Fettsäuren der Spermienmembran durch die Fettsupplemente erhöhte.

Tab. 1: Überblick über Studien zu Effekten von Fettfütterung auf Spermaquantität und -qualität bei verschiedenen Spezies

Autoren	Spezies	Supplement	Kontrolle	Antioxidantien	Effekt auf FS in den Spermien	Effekt auf Spermavolumen/-konzentration	Effekt auf Motilität Frischsamen*	Effekt auf Motilität TG-Sperma#	Sonstige Effekte
Brinsko <i>et al.</i> 2005	Hengst	Fischöl	ohne FS	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Motilität bei 48h Flüssigkonservierung
Harris <i>et al.</i> 2005	Hengst	Fischöl	ohne FS	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Morphologie (erhöhter Anteil morphologisch normaler Spermien)
Schmid-Lausigk & Aurich 2014	Hengst	Leinöl	ohne FS	Ja	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	Nein	Motilität und Membraneigenschaften bei 24h Flüssigkonservierung
Paulenz <i>et al.</i> 1995	Eber	Fischöl	ohne FS	Nein	Ja	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	Nein (Non-Return Raten-unverändert)
Rooke <i>et al.</i> 2001	Eber	Fischöl	ohne FS	Ja	Ja	Ja	Ja	nicht untersucht	Membraneigenschaften
Strzezek <i>et al.</i> 2004	Eber	Fischöl	ohne FS	Ja	nicht untersucht	Ja	Nein	nicht untersucht	Morphologie Membraneigenschaften
Mitre <i>et al.</i> 2004	Eber	Fischöl	ohne FS	Nein	Ja	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	Motilität bei 2 h Flüssigkonservierung
Maldjian <i>et al.</i> 2005	Eber	Fischöl	ohne FS	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
Estienne <i>et al.</i> 2008	Eber	Fischöl	ohne FS	Nein	nicht untersucht	Ja	Nein	nicht untersucht	Paarungsverhalten (Reaktionszeit, Ejakulationsdauer)
Castellano <i>et al.</i> 2010 _a	Eber	Fischöl	isoenergetisch (mit FS)	Ja	Ja	Nein	Nein	nicht untersucht	Nein
Castellano <i>et al.</i> 2010 _b	Eber	Fischöl	isoenergetisch (mit FS)	Ja	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	Nein	Motilität bei Langzeit-Flüssigkonservierung

Autoren	Spezies	Supplement	Kontrolle	Antioxidantien	Effekt auf FS in den Spermien	Effekt auf Spermavolumen/-konzentration	Effekt auf Motilität Frischsamen* (Nativsamen)	Effekt auf Motilität TG-Sperma#	Sonstige Effekte
Kelso et al. 1997b	Hahn	Leinöl	isoenergetisch (mit FS)	Ja	Ja	Nein	Nein	nicht untersucht	Fertilität (Anzahl befruchteter Eier)
Surai et al. 2000a	Hahn	Fischöl	isoenergetisch (mit FS)	Ja	Ja	Ja	nicht untersucht	nicht untersucht	Nein
Blesbois et al. 2004	Truthahn	Fischöl	ohne FS	Nein	Ja	Nein	Nein	nicht untersucht	Fertilität verbessert bei zunehmendem Alter
Zaniboni et al. 2006	Truthahn	Fischöl	ohne FS	Ja	Ja	Nein	Nein	nicht untersucht	Membraneigenschaften
Gliozzi et al. 2009	Kaninchen	Fischöl	ohne FS	Ja	Ja	Ja	Nein	nicht untersucht	Nein
Mourvaki et al. 2010	Kaninchen	Leinsamen	ohne FS	Ja	Ja	Nein	Nein	nicht untersucht	Membraneigenschaften
Conquer et al. 2000	Mann	Algenöl u. Sonnenblumenöl	ohne Fs.	Ja	Nein	Nein	Nein (Nativsamen)	nicht untersucht	Nein

FS = Fettsäure

Frischsamen* = flüssigkonserviertes Sperma unmittelbar nach Zugabe eines Verdünnermediums zum Nativejakulat

TG-Sperma# = kryokonserviertes Sperma

(übereinstimmende Legende mit Tab. 2 und Tab. 3)

4.4 Fütterungsversuche mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren an kleinen Wiederkäuern

In Zusammenhang mit deutlichen züchterischen Vorteilen der künstlichen Besamung auch in der Schafzucht stehen aktuelle Versuche, die Qualität von flüssigkonserviertem bzw. kryokonserviertem Schafbocksperma zu verbessern (Cseh *et al.* 2012). Dazu wurden in jüngerer Vergangenheit ungesättigte Fettsäuren an Schafböcke verabreicht. Die beabsichtigte Beeinflussung der Fettsäurezusammensetzung der Spermienmembran gestaltet sich beim Wiederkäuer im Allgemeinen grundsätzlich schwieriger. Im Gegensatz zum Monogastrier, der Fettsäuren aus der Nahrung unverändert absorbiert, werden beim Wiederkäuer ungeschützte Fette im Pansen verstoffwechselt. Dabei können negative Effekte auftreten, wie etwa ein Rückgang der scheinbaren Verdaulichkeit der wichtigsten Nährstoffe (insbesondere der Rohfaser), eine Minderung der ruminalen Essigsäurekonzentration sowie der Infusorienzahl und die Biohydrierung ungesättigter Fettsäuren (Jilg *et al.* 1988). Bei der mikrobiellen Hydrierung werden die mehrfach ungesättigten FS in den Vormägen zu weniger stark ungesättigten und zu gesättigten FS umgewandelt. Des Weiteren entstehen während desselben Vorgangs sog. trans-Fettsäuren und Polyensäuren (Schröder *et al.* 2000). Weitere Einzelheiten dazu können der Dissertation von Dehning (2008) entnommen werden. Das den Schafböcken in den Versuchen überwiegend verabreichte Supplement war Fischöl. Dieses erhöhte in den erwähnten Studien nachweislich den EPA-(Eicosapentaensäure) bzw. DHA-Anteil der Fettsäuren in den Spermien (Fair *et al.* 2014, Jafaroghli *et al.* 2014). Die Spermaproduktion der Böcke steigerte sich ausnahmslos. Die Motilität des Frischsamens wurde ebenso überwiegend positiv beeinflusst. Nicht einheitlich waren die Effekte auf die Motilität kryokonservierten Spermas. Auch die Auswirkungen auf die Integrität der Spermienmembran waren unterschiedlich. Einzelheiten zu den Effekten der FS auf die Spermaproduktion und -motilität sind in Tab. 2 zusammenfassend aufgeführt. Die Art des verabreichten Fischöls in Bezug auf dessen Pansenstabilität scheint dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen. Sowohl bei der Fütterung von unbehandeltem Fischöl (Samadian *et al.* 2010, Esmaeili *et al.* 2012) als auch bei der Verabreichung von Fischöl in geschützter Form (Fair *et al.* 2014) konnten Spermamerkmale grundsätzlich verbessert werden. Nach Ashes *et al.* (1992) sind die Eicosapentaensäure (C 20:5n-3) und die Docosahexaensäure (C 22:6n-3) aus Fischöl, auch aus ungeschütztem Fischöl, von der Biohy-

drogenierung im Allgemeinen nicht betroffen. Nur in einer Fütterungsstudie (Graaf *et al.* 2007) wurden negative Effekte bei Verabreichung von Öl- bzw. Linolsäure in Form von Olivenöl bzw. Sonnenblumenöl festgestellt. Nach sechs Wochen Fütterung reduzierte sich die Motilität des kryokonservierten Spermias der Schafböcke bei den jeweiligen Versuchsgruppen. Des Weiteren nahm der Anteil der membran- und akrosomintakten Spermien ab. Den Autoren zufolge könnte die Bildung gesättigter FS aufgrund der Biohydrogenierung der ungeschützten Supplemente die Spermaqualität negativ beeinflusst haben. Ausserdem könnte eine Zunahme der LPO durch den Anstieg der ungesättigten FS in der Ration bei gleichzeitig nicht verabreichten Antioxidantien ursächlich für die negativen Effekte gewesen sein.

4.5 Fütterungsversuche mit Omega-3-Fettsäuren an Zuchtbullen

Dehning führte 2008 einen Fütterungsversuch mit Omega-3-Fettsäuren an Zuchtbullen durch. In dieser Arbeit wurde geprüft, ob eine Zufütterung der Omega-3-Fettsäure Alpha-Linolensäure (C18:3 n-3) die Spermaqualität des Bullen grundsätzlich beeinflusst und ob in diesem Zusammenhang der Gehalt der Omega-3-Fettsäure Docosahexaensäure (C22:6 n-3) in den Spermien verändert werden kann. Der Versuchsgruppe, bestehend aus 9 Holsteinbullen, wurden zusätzlich zur Grundration 800 g gecoatete (pansenstabile) Alpha-Linolensäure (entspricht 400 g Alpha-Linolensäure) gefüttert und an eine Kontrollgruppe bestehend aus 8 Holsteinbullen 400 g Palmitinsäure über 3 Monate verabreicht. Die Zugabe der Alpha-Linolensäure hatte keine Auswirkungen auf die klassischen und durchflusszytometrisch bestimmten Spermaqualitätsparameter im flüssigkonservierten Sperma. Obwohl der DHA-Gehalt nur in den Spermien der Versuchsgruppe anstieg, nahm direkt nach der Kryokonservierung der Anteil der plasmamembranintakten (PMI-)Spermien bis zum Ende des Versuchs in beiden Gruppen zu und der Anteil der akrosomgefärbten (AF-)Spermien im gleichen Beobachtungszeitraum ab (Dehning 2008). Wegen eines festgestellten Vitamin E-Mangels wurde beiden Tiergruppen während des Versuchs zusätzlich Vitamin E verabreicht. Nach Dehning (2008) war der beobachtete positive Effekt somit nicht eindeutig auf die Fettsupplementierung zurückzuführen. Auch bei Nili-Ravi-Büffelbullen (*Bubalus bubalis*) verbesserte die Fütterung von Fetten die Spermaqualität (Adeel *et al.* 2009). Neben einer Kontrollgruppe, die kein Fettsupplement erhielt, wurde eine Gruppe konsequent 63 Tage lang mit Sonnenblumenöl und eine weitere

mit Sonnenblumensamen gefüttert. Der Fettanteil betrug 1 % der täglichen Trockensubstanzaufnahme. Die Motilität wurde anschliessend mikroskopisch und die Plasmamembranintegrität mittels Hypoosmotischem Schwelltest (HOS) untersucht. In den Nativejakulaten waren keine Veränderungen der genannten Kriterien zu beobachten. In den Gruppen mit Fettsupplement verbesserten sich dagegen die Motilität und Plasmamembranintegrität des kryokonservierten Spermas. Gholami *et al.* (2010) verabreichten ein fischöhlhaltiges Supplement. Einer Gruppe von 9 Holsteinbullen wurden neben der Standardration 100 g eines handelsüblichen Nahrungsergänzungsmittels mit 25 % Omega-3-Fettsäuren (10 % DHA) gefüttert. Die Kontroll- und die Versuchsgruppe wurden zunächst 3 Monate identisch versorgt. Erst im Anschluss bekam die Versuchsgruppe über 12 Wochen zusätzlich das Supplement. Es konnte eine Verbesserung der mittels HOS-Test und CASA-Untersuchungen an Frischsperma erhobenen Spermaparameter festgestellt werden. Im Gegensatz dazu waren an kryokonservierten Proben keine signifikanten Effekte auf die Spermaqualität festzustellen. Moallem *et al.* (2015) verabreichten drei verschiedene pansengeschützte Fettquellen (SFA-Gruppe: 360 g gesättigtes Fettsupplement; ALA-Gruppe: 450 g leinsamenöhlhaltiges Fettsupplement (netto 84.2 g Alpha-Linolensäure); EPA/DHA-Gruppe: 450 g fischöhlhaltiges Fettsupplement (netto 8.7 g EPA und 6.5 g DHA)) an drei Gruppen von je fünf Holsteinbullen täglich über 13 Wochen als isoenergetische Rationen. Nach 35 Tagen Fütterung konnte eine Zunahme des DHA- und eine Abnahme des DPA-Gehalts der Spermien der Bullen, die mit Fischöl bzw. Leinsamenöl gefüttert wurden, beobachtet werden. In den Nativejakulaten waren die Motilität und die progressive Motilität der ALA-Gruppe gegenüber der EPA/DHA-Gruppe erhöht, während sich aber diese Parameter der EPA/DHA-Gruppe nicht signifikant von denen der SFA-Gruppe unterschieden. Die Gesamtmotilität, progressive Motilität und Bahngeschwindigkeit der kryokonservierten Spermien der ALA-Gruppe waren gegenüber denjenigen der EPA/DHA-Gruppe und SFA-Gruppe grundsätzlich höher.

Das Volumen, die Spermienkonzentration und die Gesamtspermienzahl blieben in allen erwähnten Studien an Bos-taurus-Bullen bzw. Büffelbullen von der Fettfütterung unbeeinflusst (siehe Tab. 3).

Zu energiereiche Futterrationen können bei Bullen zur Verfettung und zu vermehrten Fetteinlagerungen in das Skrotum führen. Die dadurch möglicherweise erhöhte Hodentemperatur kann sich wiederum nachteilig auf die Spermio-genese und Sperma-

qualität auswirken (Coulter *et al.* 1997, Kastelic 2014). Das Gewicht der Büffelbullen (Adeel *et al.* 2009) sowie die Körperkondition und der Hodenumfang der Holsteinbullen (Gholami *et al.* 2010) erhöhten sich jedoch in den erwähnten Studien durch die jeweils verabreichten Fettsupplemente nicht. Negative Auswirkungen auf die Spermaqualität konnten nicht festgestellt werden.

Tab. 2: Überblick über Studien zu Effekten von Fettfütterung auf Spermaquantität und -qualität beim Schafbock

Autoren	Supplement	Kontrolle	Antioxidantien	Effekt auf FS in den Spermien	Effekt auf Spermavolumen/-konzentration	Effekt auf Motilität Frischsamen*	Effekt auf Motilität TG-Sperma [#]	Sonstige Effekte
Graaf <i>et al.</i> 2007	Olivenöl bzw. Sonnenblumenöl	ohne FS	Nein	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	Ja (negativ)	Membraneigenschaften (negativ)
Samadian <i>et al.</i> 2010	Fischöl	isoenergetisch (mit FS)	Ja	Ja	Ja	Ja	nicht untersucht	Nein
Esmaeili <i>et al.</i> 2012	Sonnenblumenöl bzw. Fischöl	isoenergetisch (mit FS)	Ja	nicht untersucht	Ja	Ja	Ja	Membraneigenschaften
Selvaraju <i>et al.</i> 2012	Sonnenblumenöl	isoenergetisch (mit FS)	Nein	nicht untersucht	Ja	Ja	nicht untersucht	Membraneigenschaften
Fair <i>et al.</i> 2014	Fischöl	isoenergetisch (mit FS)	Ja	Ja	Ja	nicht untersucht	nicht untersucht	Nein
Jafaroghli <i>et al.</i> 2014	Fischöl	isoenergetisch (mit FS)	Ja	Ja	Ja	Ja	nicht untersucht	Membraneigenschaften

Tab. 3: Überblick über Studien zu Effekten von Fettfütterung auf Spermaquantität und -qualität beim Bullen

Autoren	Supplement	Kontrolle	Antioxidantien	Effekt auf FS in den Spermien	Effekt auf Spermavolumen/-konzentration	Effekt auf Motilität Frischsamen*	Effekt auf Motilität TG-Sperma [#]	Sonstige Effekte
Dehning 2008	Leinöl	FS	Ja	Ja	Nein	Nein (Nativsamen)	Nein	Membraneigenschaften
Adeel <i>et al.</i> 2009	Sonnenblumenöl/-samen	ohne FS	Nein	nicht untersucht	Nein	Nein (Nativsamen)	Ja	Membraneigenschaften
Gholami <i>et al.</i> 2010	Fischöl	ohne FS	Ja	nicht untersucht	Nein	Ja	Nein	Membraneigenschaften
Moallem <i>et al.</i> 2015	Fischöl bzw. Leinöl	FS	Ja	Ja	Nein	Ja (Leinölgruppe) (Nativsamen)	Ja (Leinölgruppe)	Reduzierte Verluste bei Kryokonservierung (Leinölgruppe)

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Tiere

Für die Studie stand ein Tierkollektiv aus 22 Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh des Besamungsvereins Neustadt an der Aisch e.V. (BVN) zur Verfügung. Es wurden jeweils sechs Bullen drei verschiedenen Gruppen zugeordnet (Tab. 4).

Tab. 4: Gruppeneinteilung der Bullen in Abhängigkeit von der Fütterung mit unterschiedlichen Fetten

Gruppenbezeichnung	Tierzahl	Alter der Tiere (Jahre)
Ungesättigte-Fettsäure-Gruppe (UFSG)	9 (3)	4.58 ± 1.97
Gesättigte-Fettsäure-Gruppe (GFSG)	6 (0)	5.75 ± 2.43
Kontrollgruppe (KG)	7 (1)	5.50 ± 2.12

Die Zahlen in Klammern stellen die aus dem Versuch ausgeschiedenen Tiere dar.

Vier Bullen, drei der UFSG und einer der KG, mussten aus nicht mit der Fütterung in Verbindung stehenden Gründen aus dem Versuch ausgeschlossen werden, wurden aber durch vier weitere Tiere ersetzt und nach identischem, aber zeitversetztem Probenplan untersucht.

Die Gruppen bestanden aus jeweils einem Jungbullen und weiteren fünf nachzuchtgeprüften Vererbern. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen (Tab. 4). Alle Tiere wurden während des Versuchsablaufes in einem Anbindestall mit Stroheinstreu gehalten. Während der gesamten Versuchsdauer zeigten sie ein ungestörtes Allgemeinbefinden und wiesen weder Sexualstörungen noch Erkrankungen der Geschlechtsorgane auf.

Für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden Bullen ausgesucht, von denen schon über mehrere Monate Sperma gewonnen worden war, um die Einflüsse einer wechselhaften Spermatogenese auszuschliessen. Es wurden nur gesunde, im Verhalten unkomplizierte Bullen mit guter Libido für die Studie ausgewählt, um mögliche Störfaktoren bei der Spermagewinnung zu eliminieren. Weiterhin konzentrierte sich die Selektion auf Bullen mit erfahrungsgemäss guter Spermaqualität, sowohl der nati-

ven als auch der kryokonservierten Ejakulate. Bei den Versuchstieren handelte es sich um züchterische Spitzenbulln der Rasse Deutsches Fleckvieh. Von den 18 Bullen, die im Versuch verblieben, waren 15 tochtergeprufte Vererber mit bekannt guten Fruchtbarkeitsergebnissen.

5.1.2 Fütterung

Neben der für alle Tiere einheitlichen und während der gesamten Versuchsphase konstanten Grundration erhielten die Bullen entsprechend dem Studienaufbau unterschiedliche Zusatzfuttermittel, die so zur Grundration ergänzt wurden, dass der Erhalt einer isoenergetischen Ration gesichert war, für deren Zusammenstellung Herr Prof. Dr. M. Kaske, Departement für Nutztiere, Vetsuisse Fakultät Zürich, verantwortlich war. Als Grundration wurde eine Mischration, bestehend aus Grassilage, Maissilage (Silageanteile 1:1), 1.5 kg Stroh und 200 g Mineralfutter (Bullenmineral Besamungsstation BVN DEWA, Höveler Spezialfutterwerke GmbH & Co KG, Dormagen), gefutert. Heu (ca. 3–5 kg) wurde zusätzlich zweimal täglich vorgelegt. Der UFSG wurden 400 g Omega-3-Fett (ALIkon® Omega-3, Erbo Spraytec AG, Butzberg, Schweiz) verabreicht. Die GFSG erhielt einmal täglich 400 g pansenstabiles, nahezu gesättigtes Fettpulver (LactoPlus FA®, BEWITAL agri GmbH & Co. KG, Südlohn-Oeding) und die KG einmal täglich 1.6 kg kommerzielles Krafftutter (I AM 163 Milchleistungsfutter II zu ausgeglichenen Grundfutterrationen, DEWA-Krafftutterwerke, Emskirchen). Die genaue Zusammensetzung der Futtermittel findet sich im Anhang unter 9.1. Die Fettpulver wurden einmal täglich mit einem Messbecher – handdosiert – über die Silagemischration verabreicht und von den Bullen bei allgemein guter Akzeptanz mit dieser gemeinsam aufgenommen. Zudem erhielten alle Versuchstiere bereits sieben Wochen vor und über die gesamte Versuchsdauer täglich 40 g eines Vitamin-E-Selen-Konzentrats (Blattisan Vit E 65, Höveler Spezialfutterwerke GmbH & Co KG, Dormagen) bei ebenfalls guter Aufnahme durch die Bullen.

5.2 Methoden

5.2.1 Versuchsdurchführung

Die 27-wöchige Studie war gegliedert in eine 3-wöchige Vorversuchs- und eine 24-wöchige Hauptversuchsphase und wurde vom 02.01.2012 bis zur letzten Hauptbe-
probung am 04.07.2012 durchgeführt. Die Probenentnahme bei den Ersatzbullen er-
folgte zeitversetzt bei zwei Bullen vom 13.02.2012 bis 01.08.2012 bzw. zwei weiteren
vom 16.04.2012 bis 26.09.2012 (s. Tab. 5.1). Im Oktober und November 2011, d. h.
zwei bis drei Monate vor Beginn der Vorversuche, waren bei den meisten der Ver-
suchsbullen ein Mangel an Vitamin E und niedrige Selen-Blutwerte festgestellt wor-
den, weshalb sie ab 14.11.2011 ein Vitamin-E-Selen-Konzentrat (Blattisan Vit E 65,
Höveler Spezialfutterwerke GmbH & Co KG, Dormagen) erhielten. Bei Untersuchun-
gen im Dezember 2011 waren die Bullen nach den Referenzangaben von Dirksen
(2006) ausreichend mit Vitamin E und Selen versorgt.

Die Samenentnahme erfolgte zweimal wöchentlich im Abstand von zwei bis fünf Ta-
gen (jeweils Montag und Mittwoch) über 27 Wochen. Die gesamte Periode der
Probennahme wurde in drei Phasen geteilt:

- Phase I: 1 bis 2 Wochen vor Beginn der Fütterungsversuche
- Phase II: 3. Woche (Fütterungsbeginn) bis 12. Woche nach Versuchsbeginn
- Phase III: 15. bis 27. Woche (Fütterungsende) nach Versuchsbeginn

Zur Beurteilung des Spermas wurden direkt nach der Spermagewinnung Volumen,
Dichte und Gesamtpermienzahl des Ejakulates bestimmt und die Vorwärtsmotilität
mikroskopisch geschätzt (Tab. 5.2). Anschliessend wurde das Sperma kryokonser-
viert. An den kryokonservierten Proben wurde direkt nach dem Auftauen mikrosko-
pisch und nach 30- sowie 120-minütiger Inkubation die Motilität mit CASA bestimmt
und die Morphologie anhand von Färbungen untersucht.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen erfolgten nach 30- sowie 180-minüti-
ger Inkubation, wobei die Spermaparameter Anteil plasmamembran- und akrosomin-
takter Spermien (PMAI) sowie akrosomal gefärbter Spermien (AF) mittels FITC-
PNA/PI-Färbung, die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion mittels Ca-Ionophor nach
FITC-PNA/PI-Färbung, das Mitochondrienmembranpotential mit JC-1-Färbung, der
Grad der Lipidperoxidation mittels C11-Bodipy^{581/591}-Färbung und die DNA-Integrität
mit dem SCSA™ ermittelt wurden.

Das Probenmaterial umfasste je 10 Pailletten kryokonserviertes Sperma pro Ejakulat sowie 0.5 ml Nativsamen und 1 ml Blutserum, das in speziellen Probenröhrchen eingefroren und wie die Pailletten in Stickstoffcontainern bis zur Untersuchung gelagert wurde.

Tab. 5.1: Zeitpunkte der Untersuchungen, Art und Anzahl der entnommenen Proben pro Versuchswoche

Woche	Kryokonservierte Ejakulate	Blutserum
1	2	1
2	2	0
3	0 (Fütterungsbeginn)	0
4	0	1
7	2	0
8	0	1
11	2	0
12	0	1
15	2	0
16	0	1
19	2	0
20	0	1
23	2	0
24	0	1
27	2	0
28	0	1

Tab. 5.2: Untersuchungen, die an nativem und kryokonserviertem Sperma durchgeführt wurden

Art des Spermas	Untersuchungszeitpunkt	Untersuchungsmethode
nativ	unmittelbar nach der Gewinnung	Motilität (geschätzt)
kryokonserviert	30 min. und 2h* bzw. 3h# nach dem Auftauen	Morphologie (geschätzt) Motilität (geschätzt) Motilität (CASA)
		Durchflusszytometrie (FITC-PNA/PI, JC-1, Bodipy/PI, SCSA™) CASA* (Motilität)
		Durchflusszytometrie# (FITC-PNA/PI; Ca-Ionophor, JC-1, Bodipy/PI, SCSA™)

CASA = Computergestützte Motilitätsanalyse (*engl.* = computer assisted sperm analysis);
 FITC-PNA/PI = Fluoreszein-Isothiocyanat-Peanut-Agglutinin/ Propidiumiodid; JC-1 = 5, 5', 6,
 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide; Bodipy = Boron-
 dipyrromethene; SCSA™ = Spermachromatinstrukturanalyse (*engl.* = Sperm Chromatin
 Structure Assay)

*: CASA; #: Durchflusszytometrie

5.2.2 Spermagewinnung

Im Sprungraum des BVN erfolgte die Spermagewinnung. Unterstellbullen und ein Phantom standen als Sprungpartner zur Verfügung. Nach zwei bis drei Blindsprüngen wurde die Samenentnahme mithilfe einer künstlichen Vagina (KV), Modell „Neustadt/Aisch“ (Müller, Nürnberg), durchgeführt. Im Vaginenraum wurden die künstlichen Vaginen in einem Wärmeschrank auf 42 °C vorgewärmt. Die innere Wand der KV wurde mit Tragantschleim für einen reibungslosen Absamvorgang gleitfähig gemacht. Das Ejakulat wurde in einem Einwegkunststoffröhrchen (Minitüb, Tiefenbach) aufgefangen, welches über einen Gummitrichter an der KV befestigt war und sich in einem wärmeisolierten Schutzmantel befand, um einen zu starken Temperaturabfall zu vermeiden. Durch eine Schleuse wurde das Röhrchen in den Laborbereich gereicht und in ein auf 32 °C eingestelltes Temperiergerät (Kugelbad, Fa. Minitüb, Tiefenbach) gestellt.

5.2.3 Spermabeurteilung

Zunächst erfolgte eine makroskopische Untersuchung des Spermas auf Farbe, Konsistenz und Fremdanteile. Nur einwandfreie Ejakulate wurden weiterverarbeitet. Das Ejakulatvolumen wurde mit einer Digitalwaage (Kern/Fa. Minitüb, Tiefenbach) bestimmt und der prozentuale Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien im Nativsperma subjektiv geschätzt. Dazu wurde ein Mikroskop (Typ Eclipse 50i, Fa. Nikon, Düsseldorf) mit beheiztem Objektträgertisch, positivem Phasenkontrast und einem Okular sowie einem Objektiv mit jeweils 10-facher Vergrößerung verwendet. Ejakulate mit weniger als 60 % motilen Spermien wurden verworfen, wobei dies bei je einem Ejakulat eines Bullen der UFSG, GFSG und KG der Fall war. Während der gesamten Versuchsdauer wurde das Nativsperma von der Laborleiterin des BVN untersucht. Die Spermienkonzentration der Ejakulate (Milliarden/ml) wurde mit einem Fotometer (SMD 5, Programm 4, Minitüb, Tiefenbach) bestimmt. Bei Dichten von < 0.4 Milliarden Spermien/ml wären die Ejakulate nicht weiterverarbeitet worden, was bei keinem Ejakulat des Versuchs zutraf. Anschliessend wurde das Sperma mit Triladyl®-Eigelbverdünner (Minitüb, Tiefenbach) auf eine Spermienkonzentration von 60 Mio./ml eingestellt.

5.2.4 Äquilibrierung, Konfektionierung und Einfriervorgang

Das verdünnte Sperma wurde in braunen Gläsern für 24 Stunden zur Äquilibrierung bei 4 °C in Kühltruhen gelagert, dann erst folgte die Konfektionierung. Das maschinelle Abfüllen in Pailletten (Typ Mini-Pailletten, Einheit 0.25 ml, IMV, L'Aigle, Frankreich) erfolgte mit einer auf 4 °C temperierten und im Kühlkabinett stehenden Abfüllmaschine (MPP Quattro, Fa. Minitüb, Tiefenbach). Dabei wurden die Portionen mit einem Drucker (JET 2 SE, Leibinger, Tuttlingen) beschriftet. Anschliessend wurden die Pailletten visuell auf eine korrekte Befüllung kontrolliert und auf Rampen aufgelegt. Das Einfrieren der Besamungsportionen erfolgte in Stickstoffdampf bei -95 °C für 9 Minuten (NIFA Technologies BV, Leeuwarden, Niederlande). Dann wurden die Pailletten in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196 °C in einem Stickstoffcontainer gelagert.

5.2.5 Konventionelle Untersuchungen des kryokonservierten Spermas

5.2.5.1 Auftaumotilität

Frühestens 24 h nach der Kryokonservierung wurde jedes Ejakulat mikroskopisch auf den prozentualen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien untersucht. Es wurden je zwei Pailletten pro Ejakulat einzeln untersucht und anschliessend der Mittelwert bestimmt. Zum Auftauen wurden die Pailletten für 11 Sekunden bei 38 °C in ein Auftaugerät (Minitüb, Tiefenbach) gegeben. Die Pailletten wurden entnommen, abgetrocknet und einzeln in Tubes entleert, die in einem Wärmeblock auf 37 °C erwärmt worden waren. Alle im Versuchsverlauf gewonnenen Spermachargen waren bei einem Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien > 40 % nach der Kryokonservierung als tauglich eingestuft worden.

Die weiteren Untersuchungen wurden am Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. (IFN) und an der Klinik für Reproduktionsmedizin der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich durchgeführt.

5.2.5.2 Morphologie

Morphologische Untersuchungen an Spermien werden durchgeführt, um Veränderungen der normalen Zellstruktur zu erfassen, die durch Erkrankungen der Bullen, genetisch oder pathologisch bedingt, oder durch die jeweilige Behandlung des Spermias hervorgerufen wurden. Während für die beiden oben genannten Kriterien die Beurteilung des morphologischen Gesamtzustandes der Spermien im Vordergrund steht, können Konservierungseinflüsse oftmals bereits anhand der alleinigen Beurteilung der Akrosommorphologie eingeschätzt werden.

Die Morphologie wurde im Feuchtpräparat beurteilt. Die konservierten Spermaproben wurden hierzu mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung, der zur Immobilisierung der Spermien Formalin zugesetzt wurde, verdünnt (Herstellung der Reagenzien und Präparate siehe Anhang). Die formalinfixierten Spermaproben wurden innerhalb von 30 Stunden untersucht. Aus der fixierten Probe wurde ein Tropfen von 4 µl auf den Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas (18 x 18 mm) abgedeckt. Je Probe wurden 200 Spermien bei 800-facher Vergrößerung klassifiziert. Die Klassifizierung erfolgte nach dem in Tab. 5.3 aufgezeigten Schema. Die Anteile der einzelnen Kategorien wurden in Prozent [%] angegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die morphologisch intakten Spermien sowie diejenigen mit Kopf- oder Kopfkappenveränderungen berücksichtigt.

Tab. 5.3: Morphologische Klassifizierung der Spermien

Klasse	Abkürzung
morphologisch intakte Spermien	N
Kopfveränderungen (zu klein, zu gross, birnenförmig etc.)	K
Kopfkappenveränderungen (geschwollen, in Ablösung, abgelöst, granulär)	KK
Kopfkappendeformation	KKD
Mittelstückveränderungen (lose Köpfe, gebrochen, verdickt, zu kurz etc.)	M
proximale Plasmatropfen	Pprox
distale Plasmatropfen	Pdis
umgeschlagene Schwänze mit innenliegendem Plasmatropfen	SPS
Schwanzveränderungen (umgeschlagen, zu kurz etc.)	S
Mehrlingsbildungen	MB

5.2.5.3 Totale akrosomintakte motile Spermien

Mehrere Einzelparameter, welche verschiedene Merkmale charakterisieren, wurden in einem Indexwert zusammengefasst, der die totalen akrosomintakten motilen Spermien (TAIMS) angibt. Der TAIMS-Wert errechnet sich aus der Spermienzahl je Paillette ($\times 10^6$), dem Anteil an Spermien mit intaktem Akrosom ($100 - KK$ in %) und dem Anteil motiler Spermien (%), geschätzt nach 30 Minuten Inkubation im TRT.

$$\text{TAIMS} = \text{Spermien je Paillette} \cdot \frac{(100 - \text{KK})}{100} \cdot \frac{\text{motile Spermien (Schätzwert 30 min)}}{100}$$

5.2.5.4 Computergestützte Motilitätsanalyse

In Abhängigkeit von der jeweiligen Fragestellung können der Anteil motiler Spermien und andere Parameter wie Geschwindigkeiten und Bewegungsformen der einzelnen Spermien mittels CASA (computer assisted sperm analysis) erfasst werden. Beim IFN wurde hierfür das SpermVision®-System (Fa. Minitüb, Tiefenbach) verwendet. Zur Untersuchung des gefrierkonservierten Bullenspermas wurden 3 Pailletten pro Ejakulat aufgetaut und gepoolt in ein 1.5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde bei 38 °C im Thermoblock inkubiert. Die Messungen erfolgten 30 bzw. 120 Minuten nach dem Auftauen. Aus der Spermaprobe wurde ein Tropfen von 3 µl entnommen, nachdem die Probe vorher durch vorsichtiges Schwenken nochmals durchmischt worden war. Dieser Tropfen wurde auf eine temperaturgleiche Lejakammer® (LEJA Products B.V., Nieuw-Venep, Niederlande) aufgebracht, wobei sich durch die Kapillarwirkung die Messkammer selbsttätig befüllte. Die Messung erfolgte nach ca. 30 s, sobald die Probe zur Ruhe gekommen war. Der Vorgang wurde bei unvollständiger Befüllung oder sichtbaren Luftblasen in der Kammer wiederholt. Die Lejakammern® entstammten alle der gleichen Charge. Das Programm war so konzipiert, dass 15 Blickfelder oder aber max. 1.000 Spermienzellen je Probe untersucht wurden. Es wurde die progressive Motilität (PMOT) der Spermien mittels SpermVision®-Software erfasst. Nur Spermien mit DSL(distance straight-line)-Werten von mindestens 4.5 µm wurden als progressiv motil bezeichnet (weitere Informationen 9.4). Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden in eine d-base-Datei (Ashton-Tate Corporation, Torrance, USA) umgewandelt, sodass die Daten im Programm Excel (Microsoft Corporation, USA) bearbeitet werden konnten.

5.2.6 Untersuchungen mittels Durchflusszytometrie

5.2.6.1 Durchflusszytometer

Die Untersuchungen wurden mit dem Durchflusszytometer Epics XL der Firma Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA) durchgeführt. Dieses Gerät arbeitet mit einem luftgekühlten Argonionenlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm.

Zur Messung standen drei verschiedene Filter zur Auswahl:

- FL-1 (530/30BP nm) für die grüne Fluoreszenz
- FL-2 (585/20BP nm) für die orangefarbene Fluoreszenz
- FL-3 (650LP nm) für die rote Fluoreszenz

Zur Aufnahme und Analyse der anfallenden Messwerte war ein IBM-kompatibler Computer (Fa. NEC, Irving, Texas, USA) an das Durchflusszytometer angeschlossen. Mit den Software-Programmen EXPO 32 ADC XL 4 Color™ und EXPO 32 Analysis™ (Fa. Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) erfolgte die Bearbeitung und Auswertung der Daten. Die Auswertung der SCSA™-Daten wurde mit der De-Novo-Software FCS Express 3 (De Novo Software, Glendale, USA) durchgeführt.

Am Anfang und Ende eines jeden Messtags wurde das Durchflusszytometer zweimal mit einer Cleanse-Flüssigkeit (Coulter Clenz®, Fa. Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) und danach zweimal mit Aqua bidest. gespült. Die Fluoreszenzintensität (x-Median CV) des Geräts wurde mit Flow-Check™-Flüssigkeit (Fa. Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA) täglich überprüft. Es wurden bei jeder Messung 10.000 Spermien analysiert.

5.2.6.2 Chemikalien, Verdünnungsmedien und Fluorochrome

Vor Beginn eines jeden Messtages wurden das zur Verdünnung des Spermas benötigte Tyrode-Medium, sämtliche Fluorochrome sowie das Calcium-Ionophor A23187 auf 37 °C (Tyrode-Medium im Wasserbad, in Eppendorf-Gefäße abgefüllte Farb- und Zusatzstoffe in einem Heizblock) erwärmt.

Der für den SCSA™-Test benötigte TNE-Puffer sowie die Säuredetergenz- und Akridinorange-Gebrauchslösung wurden während der gesamten Probenaufbereitung auf Eis gelagert. Im Anhang (Kap. 9.5) sind die genauen Zusammensetzungen, Konzentrationen und Molaritäten aller verwendeten Medien, Zusatzstoffe und Fluorochrome zu finden.

5.2.6.3 Auftauen und Verdünnen des Spermas

Es wurden jeweils 4 Pailletten aus dem Stickstoffcontainer entnommen und sofort im Wasserbad bei 37 °C für 30 Sekunden aufgetaut. Um Variationen innerhalb ver-

schiedener Pailletten eines Ejakulates auszugleichen, wurden diese in vorgewärmten Eppendorf-Gefäßen gepoolt, die sich in einem 37 °C warmen Heizblock befanden. Aus der Ursprungskonzentration von 60×10^6 Spermien/ml wurde dann für alle Färbungen mittels Tyrode-Medium eine Verdünnung mit einer Konzentration von 1.2×10^6 /ml hergestellt. Dazu wurden 5 µl Sperma mit 241 µl Tyrode versetzt. Für die Spermachromatinstrukturanalyse (SCSA™) wurden die Proben mittels eisgekühltem TNE-Puffer auf eine Spermienendkonzentration von 2×10^6 /ml verdünnt.

5.2.6.4 FITC-PNA/PI-Färbung

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Integrität der Plasmamembran und des Akrosoms der Spermien wurde die FITC-PNA/PI-Färbung verwendet. Der Farbstoff PI (Propidiumiodid; Fa. Sigma-Aldrich, München) kann nur geschädigte Plasmamembranen durchdringen. Er fügt sich in die Doppelhelixstruktur der DNA ein. PI löst bei plasmamembrangeschädigten Spermien eine Rotfluoreszenz aus. Der Farbstoff Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) ist an das Arachis-hypogaea-Lektin (PNA: peanut agglutinin; Fa. Sigma-Aldrich, München) gekoppelt, welches sich selektiv an die gefärbte äussere Akrosommembran bindet. Liegt eine Akrosomreaktion oder ein Akrosomschaden vor, bindet sich das Lektin an das Akrosom und löst eine Grünfluoreszenz aus. Es wurden zu 246 µl der verdünnten Spermien suspension 1.5 µl Propidiumiodid (PI; 2.99 mM) und 2.5 µl Fluoreszein-Isothiocyanat-Peanut-Agglutinin (FITC-PNA; 100 µg/ml) pipettiert und auf einem Vortexer ca. 5 Sekunden gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Probe kurz vor der Messung ein zweites Mal durch den MPL (Multiplatteloader) mit der Option „resuspendieren“ homogenisiert. Dann wurde gemessen. Ein zweiter Ansatz ohne Fluorochrome und ein dritter Ansatz ohne Fluorochrome (244.25 µl) mit Zugabe von 1.75 µl Calcium-Ionophor A23187 (Kap. 9.5.1) zur Induktion der Akrosomreaktion wurden für 2 h 45 min bei 37 °C inkubiert. Erst dann wurden diese beiden Ansätze entsprechend der Vorgehensweise wie beim ersten Ansatz gefärbt und gemessen.

Bei der Ergebnisauswertung ergab die Dotplot-Darstellung (Abb. 5.1 und 5.2) vier Spermienpopulationen.

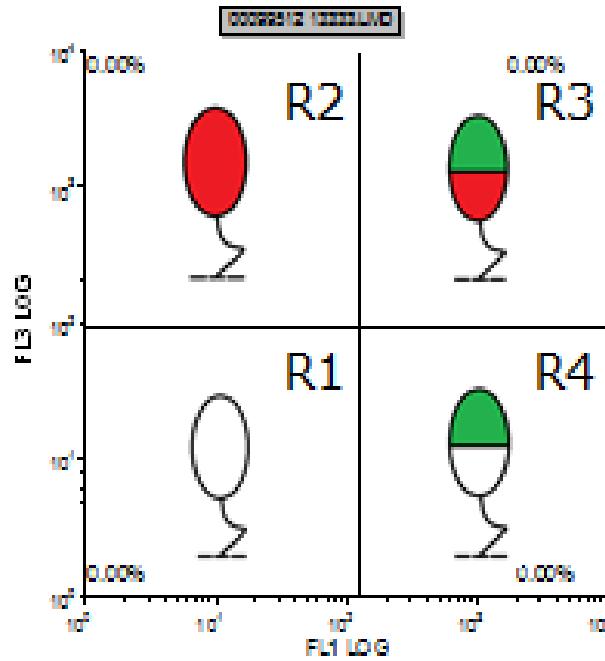


Abb. 5.1: Schematische Dotplot-Darstellung der Spermienpopulationen (plasmamembran- und akrosomintakte Spermien (R1), plasmamembrandefekte, nicht akrosomgefärbte Spermien (R2), plasmamembrandefekte, akrosomgefärbte Spermien (R3), plasmamembranintakte, akrosomgefärbte Spermien (R4)) nach FITC-PNA/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung

Daraus leiten sich die verwendeten Ergebnisparameter PMAI (%) sowie AF (%) ab. PMAI (%) (Plasmamembran und Akrosom intakt) ist der prozentuale Anteil der Spermien im Feld R1. AF (%) (Akrosom gefärbt) ist der prozentuale Anteil der Spermien in den Feldern R3 und R4.

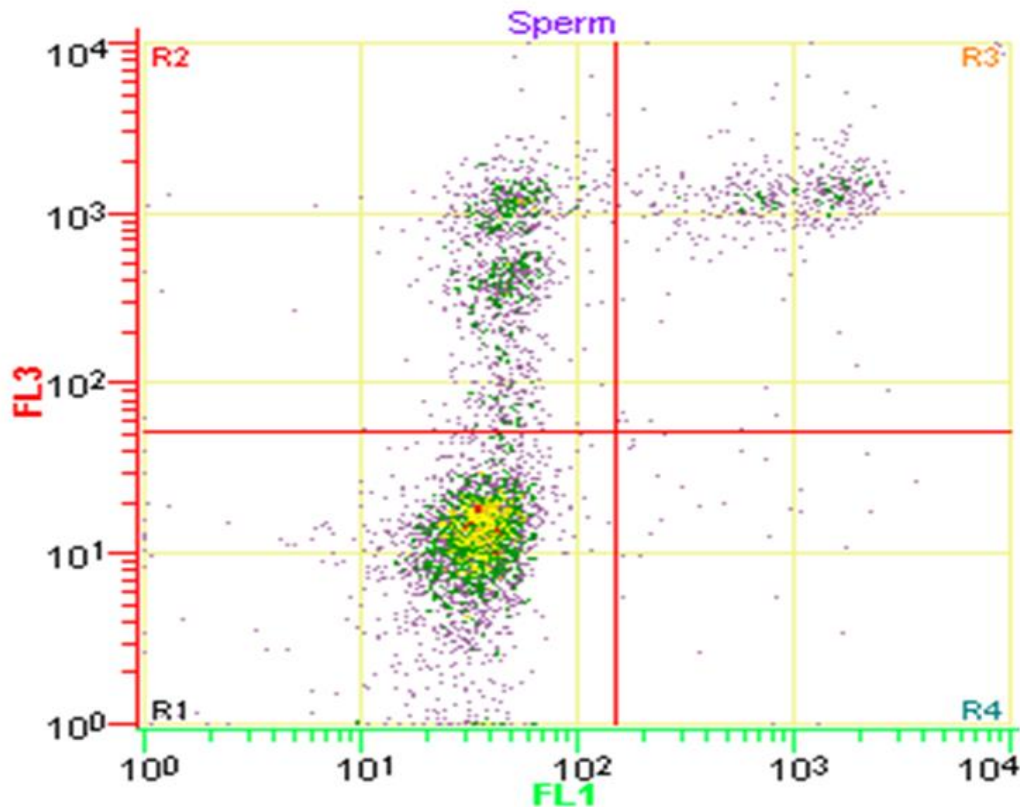


Abb. 5.2: Dotplot-Darstellung (FL3-PI und FL1-FITC/PNA) mit unterschiedlichen Spermienpopulationen (plasmamembran- und akrosomintakte Spermien (R1), plasmamembrandefekte, nicht akrosomgefärbte Spermien (R2), plasmamembrandefekte, akrosomgefärbte Spermien (R3), plasmamembranintakte, akrosomgefärbte Spermien (R4)) nach FITC-PNA/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung

5.2.6.5 Beurteilung des Mitochondrienmembranpotentials mittels JC1-Assay

Das Fluorochrom JC1 kann sowohl als Monomer (grüne Fluoreszenz) vorliegen als auch reversibel Aggregate (orange Fluoreszenz) bilden. Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (hMMP) emittieren orangefarbenes Licht und Spermien mit niedrigem Mitochondrienmembranpotential (lMMP) grünes Licht. Bei der JC1-Färbung wurden 246 μl einer verdünnten Spermiesuspension (Konzentration $1.2 \times 10^6 / \text{ml}$) mit 4 μl JC-1 (0.153 mM) versetzt, 15 min inkubiert und anschließend gemessen. Ein zweiter Ansatz der Verdünnung wurde vor der Färbung für 2 h 45 min in einem Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert, bevor hier analog vorgegangen wurde.

Eingesetzt wurden für die Messungen der FL-1-Filter für die grüne und der FL-2-Filter für die orangefarbene Fluoreszenz. Bei der Auswertung wurde der prozentuale Anteil der Spermien mit erhöhter Orange fluoreszenz, d. h. mit hohem MMP bestimmt (Abb. 5.3). Durch die Kombination der Ergebnisse des FITC-PNA/PI-Assays und des JC1-Assays wurde der Anteil der Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential und intakter Plasma- Akrosommembran (PMAI - HMMP%) berechnet.

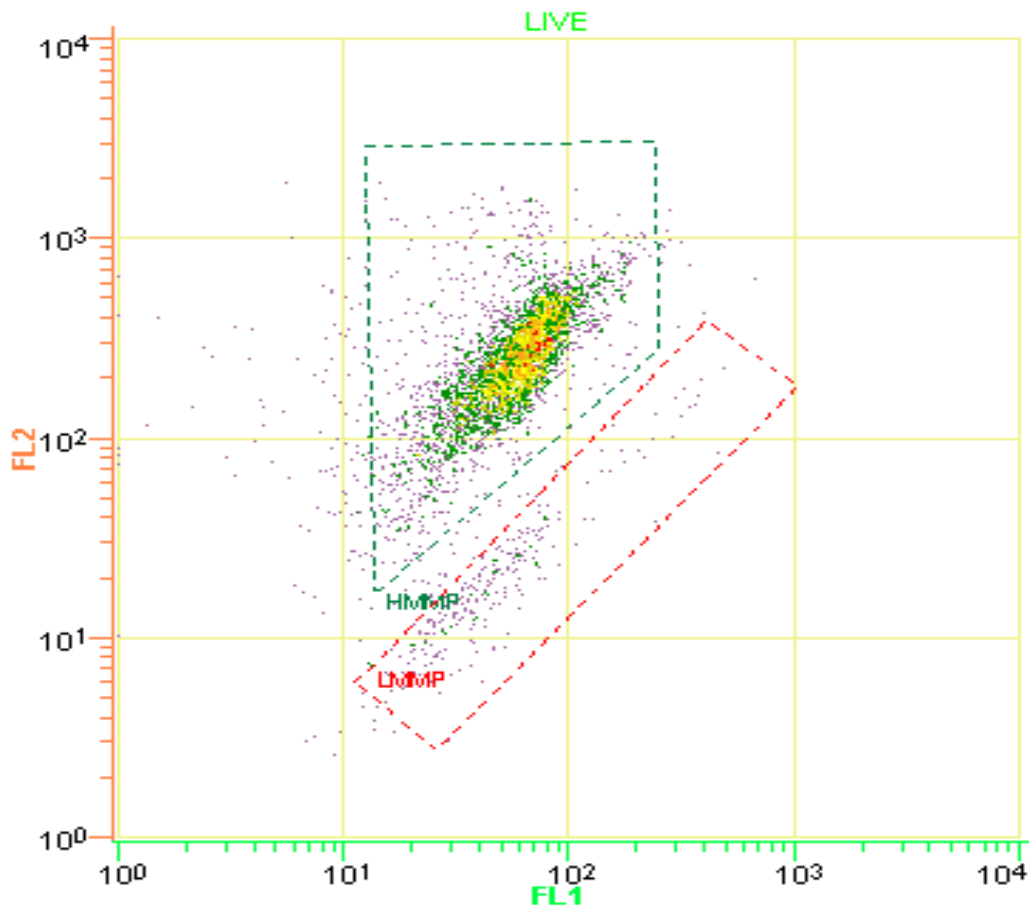


Abb. 5.3: Dotplot-Darstellung der beiden Spermienpopulationen nach JC-1-Färbung und anschliessender durchflusszytometrischer Auswertung; FL-1: grüne Fluoreszenz, FL-2: orangefarbene Fluoreszenz; grün umrahmt oben = Spermien mit hohem MMP (hMMP), rot umrahmt unten = Spermien mit niedrigem MMP (IMMP)

5.2.6.6 C11-Bodipy^{581/591} (Bodipy) / PI-Färbung

Der Farbstoff C11-Bodipy^{581/591} (Fettsäureanalogon) lagert sich in die Spermienzellmembran ein und ändert bei Lipidperoxidation seine Struktur. Dabei kommt es zur Emission grüner Fluoreszenz, die bei erhöhtem oxidativen Stress zunimmt. Nach der unter 5.2.6.3 beschriebenen Vorbehandlung des Spermias wurden 492 µl der verdünnten Suspension mit 5 µl Bodipy (1000 µM) versetzt. Es wurden 2 Flow-Röhrchen mit 248.5 µl dieses Ansatzes vorbereitet. Jeder Probe wurde zum entsprechenden Zeitpunkt (Ansatz 2, also nach 2 h 45 min Inkubation) 1.5 µl PI (2.99 mM) zugesetzt. Nach jeweils fünfzehnminütiger Inkubation im Wärmeschrank erfolgten die Messungen der 0-h- und 3-h-Werte. Bei den Messungen kamen der FL-1-Filter für die grüne und der FL-3-Filter für die rote Fluoreszenz zum Einsatz. Während der Auswertung konnte zum einen aufgrund fehlender oder vorhandener Rotfluoreszenz zwischen vitalen und nicht vitalen Spermien differenziert werden, zum anderen bei verstärkter Grünfluoreszenz auf Lipidperoxidationsvorgänge geschlossen werden (Abb. 5.4).

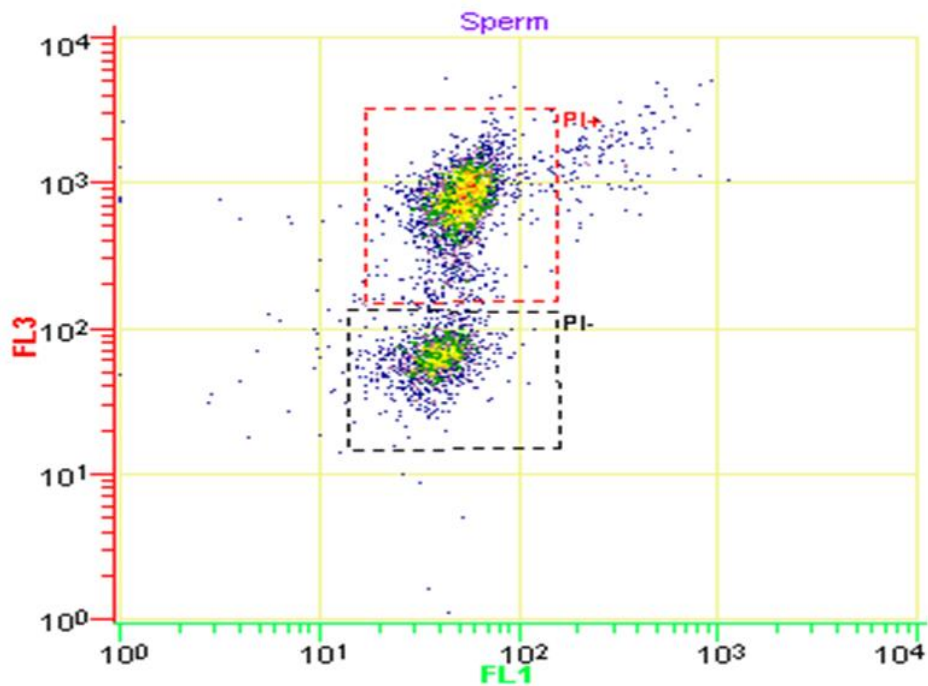


Abb. 5.4: Dotplot-Darstellung der beiden Spermienpopulationen nach Bodipy/PI-Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Auswertung; FL-1: grüne Fluoreszenz, FL-3: rote Fluoreszenz; rot umrahmt oben = nicht vitale Spermien, blau umrahmt unten = vitale Spermien

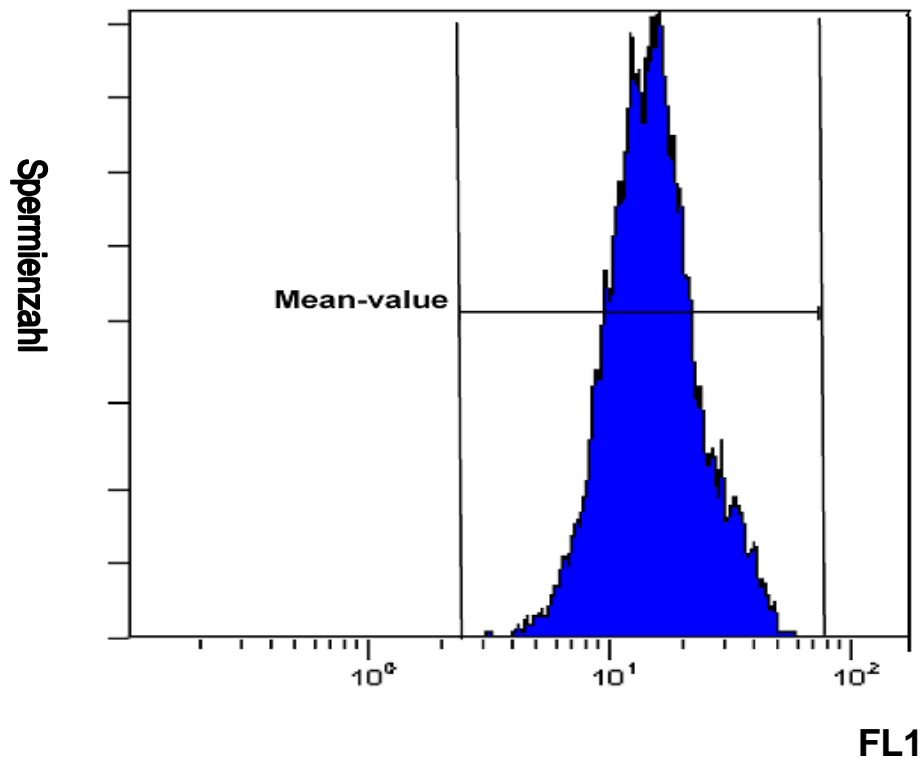


Abb. 5.5: Histogrammdarstellung zur Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (Mean-value), um den Grad der Lipidperoxidation der Spermien zu beurteilen; FL-1: grüne Fluoreszenz (Kanäle).

5.2.6.7 Spermienchromatinstrukturanalyse (SCSA™)

Mit dem SCSA™ (Sperm Chromatin Structure Assay) wird die DNA-Integrität der Spermien nach Säuredenaturierung bestimmt. Nach Zusatz des Fluoreszenzfarbstoffs Akridinorange entstehen zwei Spermienpopulationen. Vermehrt grün gefärbte Spermien besitzen hauptsächlich doppelsträngige DNA und gelten als chromatinstabil. Vor allem rot gefärbte Spermien weisen vermehrt einzelsträngige DNA auf und gelten als chromatininstabil (siehe Abbildung 5.6). Die Spermproben wurden direkt nach dem Auftauen und nach einer dreistündigen Inkubation des Spermas bei 37 °C analysiert. Für den SCSA™ wurde eine Spermienkonzentration mit eisgekühltem TNE-Puffer hergestellt (2×10^6 /ml; vergleiche Kapitel 5.2.6.3). Von dieser verdünnten Spermien suspension wurden 200 µl mit 0.4 ml Säuredetergenzlösung versetzt und

für 30 Sekunden auf einem Vortexer gemischt. Danach wurden 1.200 µl Akridinorange-Gebrauchslösung hinzugegeben und die Probe bei Raumtemperatur für genau drei Minuten inkubiert, bevor sie anschliessend ausgemessen wurde. Zu Beginn der Messungen und nach jeder zehnten Probe wurde eine Referenzprobe gemessen und die Grünfluoreszenzintensität auf einen Wert (Kanal) von 500 und die Rotfluoreszenz auf einen Wert (Kanal) von 130 eingestellt. Mit einer computergestützten Auswertung der Punktwolkendiagramme wurde für jedes Spermium der Anteil der Rotfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz (rot + grün) ausgerechnet und nach Evenson und Jost (2000) als DFI%-Wert (DNA-Fragmentationsindex) bezeichnet. Alle DFI-Werte einer Samenprobe wurden in Abhängigkeit ihrer Höhe in einem Verteilungshistogramm dargestellt. Dann wurde eine Markierungslinie manuell eingezeichnet und die Spermien mit hohen DFI-Werten von denjenigen mit erniedrigten DFI-Werten abgegrenzt. Mit dem Computerprogramm wurde anschliessend der prozentuale Anteil der Spermien mit erhöhten DFI-Werten an der Gesamtpopulation berechnet. Bei der Auswertung wurden die DFI-Spermien von Spermien mit intakter DNA und Zelldebris unterschieden.

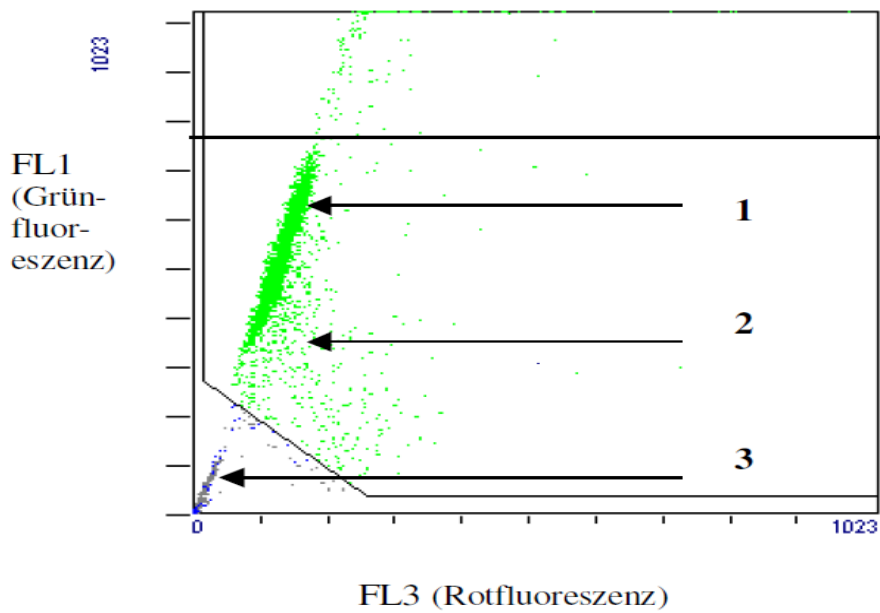


Abb. 5.6.: Dotplot-Darstellung bei Spermienchromatinstrukturanalyse mit dem SCSA™ (1: vorwiegend grün fluoreszierende Spermien mit überwiegend intakter DNA; 2: vorwiegend rot fluoreszierende Spermien mit vermehrter DNA-Schädigung; 3: Zelldebris)

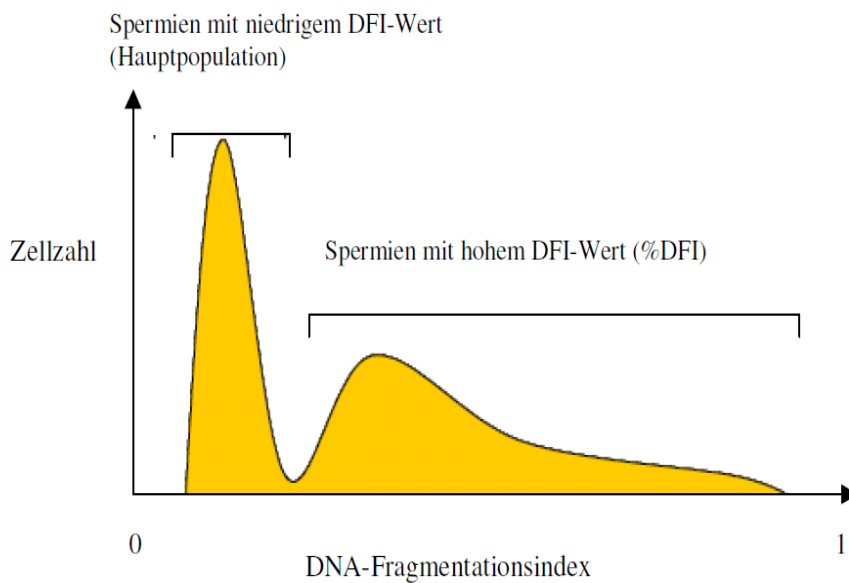


Abb. 5.7: Häufigkeitsverteilung der Spermien in Abhängigkeit von der Höhe des DNA-Fragmentationsindex (DFI) (modifiziert nach Evenson *et al.* 2002)

5.2.7 Bestimmung des Vitamin E-Status

Der Vitamin E-Gehalt der Bullen wurde im Blutserum bestimmt. Die Analyse erfolgte nach der in der Dissertation von Mudron (1994) beschriebenen Methode.

Es wurde zwei Wochen vor sowie in der 5. und 9. Woche nach dem Beginn der Fütterung je eine Blutprobe analysiert.

5.2.8 Bestimmung der Totalen Antioxidativen Kapazität

Die Totale Antioxidative Kapazität der Bullen wurde im Blutserum bestimmt. Dazu wurde am Institut für Physiologie der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern der OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity (TAC) Assay Kit (Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA) verwendet. Die Analyse erfolgte nach der im Product Manual der Firma Cell Biolabs für diesen Testkit beschriebenen Methode (vgl. Anhang 9.6).

Es wurde je eine Serumprobe pro Woche von drei Bullen der UFSG und sechs Bullen der GFSG in den Versuchsphasen I (zwei Wochen vor Beginn der Fütterung), II (1., 5. u. 9. Woche nach Beginn der Fütterung) und III (13., 17., 21. und 25. Woche nach Beginn der Fütterung) untersucht.

5.2.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden LSQ-Mittelwerte mit der Procedure MIXED aus SPSS19 (IBM) gebildet. Im Modell sind als fixe Effekte Gruppe x Phase und das Datum innerhalb der Phase berücksichtigt worden. Die Bullen wurden (innerhalb der Gruppe) als zufälliger Effekt betrachtet. Diese Modellwahl erfolgte bei Vernachlässigung weiterer Interaktionen unter Berücksichtigung des Informationskriteriums nach Akaike (1973). Die Daten der einzelnen Parameter wurden durch die LSQ-Mittelwerte, deren Standardabweichung und Konfidenzintervall beschrieben. Den statistischen Auswertungen vorangestellt wurde die Berechnung der rohen statistischen Masszahlen einschliesslich Schiefe und Exzess, die gegebenenfalls die Abweichungen von der Normalverteilung deutlich machen (deskriptive Statistik). Mit dem F-Test (Fisher) wurde geprüft, ob zwischen den Gruppen Unterschiede in den Parametern vor und nach Beginn der Fettfütterung bestanden. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ wurden als signifikant bezeichnet.

6 Ergebnisse

6.1 Tiergesundheit

Eine Beeinträchtigung der Tiergesundheit aufgrund der verabreichten Fettsupplemente konnte bei keinem Bullen festgestellt werden. Die Fettpulver wurden gemeinsam mit der Silagemischung von den Bullen gut aufgenommen. Auch das Vitamin E-Supplement wurde ohne unerwünschte Nebenwirkungen gut akzeptiert.

6.2 Konventionelle Spermaparameter

Die an den Nativejakulaten bestimmten Werte für die Parameter Ejakulatvolumen (Volumen), Spermienkonzentration (Konzentration) und Gesamtspermienzahl sind der Tab. 6.1 zu entnehmen. Die Werte stellen jeweils die LSQ-Mittelwerte und Standardfehler aus je vier Ejakulaten von je 6 Versuchsbullen der drei Gruppen in den Phasen I bis II und von 7 Ejakulaten in Phase III dar. Hinsichtlich des Ejakulatvolumens (Volumen), der Spermienkonzentration (Konzentration) und der Gesamtspermienzahl waren bei den Bullen der UFSG, GFSG und KG keine Unterschiede ($p > 0.05$) zwischen den Phasen festzustellen. Ausserdem bestanden keine Unterschiede ($p > 0.05$) zwischen den Tiergruppen in den einzelnen Phasen der Untersuchungen.

Tab. 6.1: Konventionelle Spermaparameter der mit ungesättigten (UFSG), gesättigten (GFSG) Fettsäuren und ohne zusätzliche Fettsäuren gefütterten Bullen (KG). Es wurden in den Phasen I (zwei und eine Woche vor Beginn der Fütterung), II (4. u. 8. Woche nach Beginn der Fütterung) und III (12., 16., 20.* und 24. Woche nach Beginn der Fütterung) von 6 Bullen jeder Gruppe je 2 Ejakulate pro Woche analysiert (*1 Ejakulat pro Woche)

Gruppe	Phase	Ejakulatvolumen (ml)	Spermakonzentration (10 ⁹ /ml)	Gesamtspermienzahl (x 10 ⁹)
UFSG	I	5.92 ± 0.88	1.56 ± 0.11	9.54 ± 1.37
	II	6.23 ± 0.89	1.40 ± 0.11	8.99 ± 1.40
	III	4.15 ± 0.86	1.42 ± 0.11	5.39 ± 1.33
GFSG	I	4.96 ± 1.00	1.66 ± 0.13	8.10 ± 1.64
	II	5.19 ± 0.97	1.59 ± 0.13	8.56 ± 1.57
	III	3.87 ± 0.90	1.55 ± 0.11	6.07 ± 1.41
KG	I	5.60 ± 0.94	1.72 ± 0.12	9.25 ± 1.52
	II	5.77 ± 0.93	1.56 ± 0.12	8.82 ± 1.48
	III	5.08 ± 0.86	1.51 ± 0.11	7.52 ± 1.33

6.3 Mikroskopische Motilitätsanalyse

Die mikroskopische Motilitätsanalyse wurde zunächst am Nativejakulat (Motilität 1) und danach am kryokonservierten Sperma direkt nach dem Auftauen (Motilität 2) einer Probe durchgeführt. Die Spermienmotilität des Gefrierspermas war direkt nach dem Auftauen im Vergleich zur Motilität des Nativejakulates deutlich eingeschränkt ($p \leq 0.05$). Es waren jedoch bei den Bullen der UFSG, GFSG und KG keine Unterschiede in der Motilität ($p > 0.05$) zwischen den Tiergruppen in den einzelnen Phasen der Untersuchung festzustellen. Es bestanden auch keine Differenzen ($p > 0.05$) zwischen den Phasen innerhalb der jeweiligen Gruppe (Tab. 6.2).

Tab. 6.2: Anhand mikroskopischer Motilitätsanalyse ermittelte Motilität der Nativejakulate und des kryokonservierten Spermias direkt nach dem Auftauen der mit ungesättigten (UFSG), gesättigten (GFSG) Fettsäuren und ohne zusätzliche Fettsäuren gefütterten Bullen (KG). Es wurden in den Phasen I (zwei und eine Woche vor Beginn der Fütterung), II (4. u. 8. Woche nach Beginn der Fütterung) und III (12., 16., 20.* und 24. Woche nach Beginn der Fütterung) von 6 Bullen jeder Gruppe je 2 Ejakulate pro Woche analysiert (*1 Ejakulat pro Woche)

Gruppe	Phase	M 1 (%)	M 2 (%)
UFSG	I	71.38 ± 1.15*	47.26 ± 1.61 [#]
	II	70.30 ± 1.19*	48.15 ± 1.71 [#]
	III	71.16 ± 1.09*	49.09 ± 1.49 [#]
GFSG	I	72.82 ± 1.49*	49.00 ± 2.24 [#]
	II	72.31 ± 1.41*	50.09 ± 2.11 [#]
	III	71.43 ± 1.20*	48.43 ± 1.68 [#]
KG	I	70.31 ± 1.35*	48.01 ± 1.99 [#]
	II	72.18 ± 1.31*	46.99 ± 1.94 [#]
	III	70.86 ± 1.09*	47.97 ± 1.47 [#]

Motilität (M) 1 = Nativsperma; Motilität (M) 2 = kryokonserviertes Sperma 0 h nach dem Auftauen
 *, #: Werte derselben Parameter (M) mit unterschiedlichen Asterisks innerhalb der Zeile unterscheiden sich ($p \leq 0.05$)

6.4 Computergestützte Motilitätsanalyse

Für die Bestimmung der progressiven Motilität der Spermien (PMOT) des kryokonservierten Spermias wurde die computergestützte Motilitätsanalyse 30 Min. (PMOT 30 min) und 120 Min. (PMOT 120 min) nach dem Auftauen herangezogen. Zu beiden Zeitpunkten zeigten sich bei allen Tiergruppen ähnliche Werte ($p > 0.05$), wobei allen Gruppen gemein war, dass die Werte für die progressive Spermienmotilität in Phase II numerisch geringgradig höher waren als in den anderen Versuchsphasen. Es lagen aber bezüglich der progressiven Spermienmotilität (PMOT) bei den Bullen der UFSG, GFSG und KG zwischen den Phasen und zwischen den Tiergruppen in den einzelnen Phasen der Untersuchungen keine Unterschiede ($p > 0.05$) vor (Tab. 6.3).

Tab. 6.3: Mittels computergestützter Motilitätsanalyse ermittelte Progressive Motilität (PMOT) 30 und 120 Minuten nach dem Auftauen kryokonservierter Spermaproben der mit ungesättigten (UFSG), gesättigten (GFSG) Fettsäuren und ohne zusätzliche Fettsäuren gefütterten Bullen (KG). Es wurden in den Phasen I (zwei und eine Woche vor Beginn der Fütterung), II (4. u. 8. Woche nach Beginn der Fütterung) und III (12., 16., 20.* und 24. Woche nach Beginn der Fütterung) von 6 Bullen jeder Gruppe je 2 Ejakulate pro Woche analysiert (*1 Ejakulat pro Woche)

Gruppe	Phase	PMOT 30 min (%)	PMOT 120 min (%)
UFSG	I	57.78 ± 3.22	57.62 ± 3.70
	II	60.71 ± 3.30	57.64 ± 3.81
	III	59.27 ± 3.11	49.31 ± 3.57
GFSG	I	54.96 ± 3.94	52.79 ± 4.59
	II	63.56 ± 3.76	59.76 ± 4.36
	III	59.45 ± 3.32	50.87 ± 3.84
KG	I	53.99 ± 3.62	50.86 ± 4.20
	II	60.44 ± 3.52	56.68 ± 4.08
	III	58.01 ± 3.11	51.45 ± 3.57

PMOT 30 min = progressive Motilität kryokonserviertes Sperma 30 min nach dem Auftauen;
 PMOT 120 min = progressive Motilität kryokonserviertes Sperma 120 min nach dem Auftauen

6.5 Spermienmorphologie

Es gab weder zwischen den einzelnen Versuchsphasen innerhalb der Tiergruppen noch zwischen den Tiergruppen innerhalb der Untersuchungsphasen Unterschiede in den morphologischen Parametern und in den TAIMS-Werten ($p > 0.05$). Tendenzielle Unterschiede lagen bei Kopfveränderungen vor ($0.05 < p \leq 0.10$). Die Werte der UFSG in den Phasen I bis III waren gegenüber den Werten der GFSG und KG erniedrigt, jedoch ohne Vorliegen einer Signifikanz (Tab. 6.4).

Tab. 6.4: Spermienmorphologie sowie totale-akrosomintakte-motile Spermien (TAIMS) in kryokonservierten Ejakulaten der mit ungesättigten (UFSG), gesättigten (GFSG) Fettsäuren und ohne zusätzliche Fettsäuren gefütterten Bullen (KG). Es wurden in den Phasen I (zwei und eine Woche vor Beginn der Fütterung), II (4. u. 8. Woche nach Beginn der Fütterung) und III (12., 16., 20.* und 24. Woche nach Beginn der Fütterung) von 6 Bullen jeder Gruppe je 2 Ejakulate pro Woche analysiert (*1 Ejakulat pro Woche)

Gruppe	Phase	N (%)	K (%)	KK (%)	TAIMS (%)
UFSG	I	75.63 ± 2.21	1.01 ± 0.32 ^d	15.34 ± 1.10	10.80 ± 0.56
	II	73.30 ± 2.27	0.74 ± 0.34 ^d	16.44 ± 1.15	10.84 ± 0.59
	III	72.12 ± 2.13	1.29 ± 0.30 ^d	16.07 ± 1.03	9.49 ± 0.52
GFSG	I	70.95 ± 2.72	2.20 ± 0.44 ^c	17.23 ± 1.48	11.65 ± 0.76
	II	72.33 ± 2.59	1.64 ± 0.42 ^c	16.78 ± 1.39	10.73 ± 0.71
	III	71.33 ± 2.28	1.81 ± 0.34 ^c	16.77 ± 1.15	10.01 ± 0.58
KG	I	73.33 ± 2.49	2.17 ± 0.40 ^c	17.07 ± 1.32	10.45 ± 0.68
	II	74.20 ± 2.42	1.84 ± 0.38 ^c	16.52 ± 1.28	10.21 ± 0.65
	III	71.73 ± 2.13	1.58 ± 0.29 ^c	18.94 ± 1.03	9.83 ± 0.52

N= morphologisch intakte Spermien; K= Kopfveränderungen; KK= Kopfkappenveränderungen; TAIMS= Total-Akrosomintakte-Motile-Spermien

c,d: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb der Spalte unterscheiden sich tendenziell ($0.05 < p \leq 0.10$)

6.6 Durchflusszytometrische Spermaparameter

6.6.1 Plasmamembran und Akrosom

Auch bei der Untersuchung der PMAI- bzw. AF-Spermien fanden sich direkt nach dem Auftauen des Gefrierspermas und nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C weder Differenzen ($p > 0.05$) zwischen den Tiergruppen noch zwischen den Versuchsphasen jeder Tiergruppe. Es zeigte sich, dass die PMAI-Werte direkt nach dem Auftauen deutlich ($p \leq 0.05$) höher waren als nach dreistündiger Inkubation, was sich auch mit dem grösseren Anteil akrosomgefärbter Spermien nach drei Stunden Inkubation gegenüber deren Anteil direkt nach dem Auftauen deckte (Tab. 6.5).

Bezüglich der Werte für IAR konnten im Gruppenvergleich ebenfalls keine Unterschiede ($p > 0.05$) ausgemacht werden und auch zwischen den verschiedenen Versuchsphasen bei den jeweiligen Tiergruppen waren keine Veränderungen zu beobachten ($p > 0.05$; Tab. 6.5).

Tab. 6.5: Anteil plasmamembran- und akrosomintakter (PMAI)/akrosomal gefärbter (AF) Spermien direkt nach dem Auftauen sowie nach 3-stündiger Inkubation und Induzierbarkeit der Akrosomreaktion (IAR) in % nach 3-stündiger Inkubation der kryokonservierten Ejakulate der mit ungesättigten (UFSG), gesättigten (GFSG) Fettsäuren und ohne zusätzliche Fettsäuren gefütterten Bullen (KG). Es wurden in den Phasen I (zwei und eine Woche vor Beginn der Fütterung), II (4. u. 8. Woche nach Beginn der Fütterung) und III (12., 16., 20.* und 24. Woche nach Beginn der Fütterung) von 6 Bullen jeder Gruppe je 2 Ejakulate pro Woche analysiert (*1 Ejakulat pro Woche)

Gruppe	Phase	PMAI 0 h (%)	PMAI 3 h (%)	AF 0 h (%)	AF 3 h (%)	IAR 3 h (%)
UFSG	I	60.88±2.45*	41.83±2.15 [#]	14.40±1.45*	34.89±1.62 [#]	39.86±2.93
	II	60.32±2.53*	40.01±2.21 [#]	14.87±1.48*	36.17±1.66 [#]	37.58±2.99
	III	55.55±2.33*	39.97±2.07 [#]	16.29±1.42*	34.24±1.57 [#]	36.23±2.85
GFSG	I	57.68±3.15*	35.73±2.67 [#]	14.79±1.71*	36.71±1.96 [#]	34.00±3.46
	II	58.37±2.98*	37.45±2.54 [#]	14.79±1.64*	36.94±1.87 [#]	37.51±3.32
	III	54.61±2.55*	34.03±2.23 [#]	16.46±1.49*	36.34±1.67 [#]	34.46±3.01
KG	I	58.13±2.86*	35.39±2.44 [#]	15.33±1.59*	38.28±1.81 [#]	31.68±3.22
	II	59.05±2.77*	37.98±2.37 [#]	14.86±1.56*	37.05±1.76 [#]	36.03±3.15
	III	56.94±2.33*	36.54±2.08 [#]	16.83±1.42*	35.84±1.57 [#]	33.81±2.86

PMAI 0 h = Plasmamembran- und akrosomintakte Spermien direkt nach dem Auftauen, PMAI 3 h = Plasmamembran- und akrosomintakte Spermien nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C, AF 0 h = Spermien mit akrosomaler Färbung direkt nach dem Auftauen, AF 3 h = Spermien mit akrosomaler Färbung nach dreistündiger Inkubation bei 37°C, IAR 3 h = Induzierbarkeit der Akrosomreaktion drei Stunden nach der Zugabe des Ca-Ionophors

*, #: Werte derselben Parameter (PMAI, AF) mit unterschiedlichen Asterisks innerhalb der Zeile unterscheiden sich ($p \leq 0.05$)

6.6.2 Mitochondrienmembranpotential

Die hMMP-Werte waren in allen Tiergruppen in jeder Versuchsphase direkt nach dem Auftauen höher ($p \leq 0.05$) als nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C. Während die hMMP-0h-Werte direkt nach dem Auftauen keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen und den Phasen innerhalb der Gruppen zeigten ($p > 0.05$), waren die hMMP-3h-Mittelwerte in Phase I bei den Bullen der KG signifikant niedriger als bei denen der UFSG (Tab. 6.6). Die hMMP-3h-Werte der Kontrollbullen hatten in den Phasen II und III gegenüber Phase I deutlich zugenommen und unterschieden sich in diesem Zeitintervall nicht mehr ($p > 0.05$) von den entsprechenden Werten der Bullen der anderen beiden Gruppen. Die PMAI-hMMP-0h-Werte zeigten keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen und den Phasen innerhalb der Gruppen ($p > 0.05$). Die

PMAI-hMMP-3h-Werte der Bullen der KG in Phase I waren gegenüber denen der UFSG in Phase I tendenziell erniedrigt ($0.05 < p \leq 0.10$), jedoch lag im Gegensatz zum hMMP 3h-Wert keine Signifikanz vor.

Tab. 6.6: Mitochondrienmembranpotential (hMMP) sowie Plasmamembran- und akrosomintakte Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential (PMAI-hMMP) der kryokonservierten Ejakulate direkt nach dem Auftauen sowie nach 3-stündiger Inkubation der mit ungesättigten (UFSG), gesättigten (GFSG) Fettsäuren und ohne zusätzliche Fettsäuren gefütterten Bullen (KG). Es wurden in den Phasen I (zwei und eine Woche vor Beginn der Fütterung), II (4. u. 8. Woche nach Beginn der Fütterung) und III (12., 16., 20.* und 24. Woche nach Beginn der Fütterung) von 6 Bullen jeder Gruppe je 2 Ejakulate pro Woche analysiert (*1 Ejakulat pro Woche)

Gruppe	Phase	hMMP 0 h (%)	hMMP 3h (%)	PMAI-hMMP 0h (%)	PMAI-hMMP 3h (%)
UFSG	I	90.29 ± 1.23*	75.11 ± 2.98 ^{a,#}	54.97 ± 2.53*	31.72 ± 2.50 ^{c,#}
	II	87.58 ± 1.28*	73.03 ± 3.03 [#]	52.97 ± 2.62*	29.86 ± 2.55 [#]
	III	88.26 ± 1.16*	75.17 ± 2.92 [#]	49.11 ± 2.42*	30.82 ± 2.44 [#]
GFSG	I	90.77 ± 1.63*	69.21 ± 3.44 [#]	51.90 ± 3.23*	24.84 ± 2.94 [#]
	II	90.72 ± 1.53*	74.74 ± 3.32 [#]	52.75 ± 3.05*	28.49 ± 2.83 [#]
	III	90.21 ± 1.28*	75.26 ± 3.05 [#]	49.15 ± 2.63*	25.86 ± 2.57 [#]
KG	I	89.65 ± 1.46*	66.08 ± 3.23 ^{b,#}	51.89 ± 2.93*	23.43 ± 2.74 ^{d,#}
	II	89.91 ± 1.41*	76.13 ± 3.16 ^{a,#}	53.11 ± 2.84*	29.08 ± 2.68 ^{c,#}
	III	88.29 ± 1.15*	76.50 ± 2.92 ^{a,#}	50.30 ± 2.42*	28.10 ± 2.44 ^{c,#}

hMMP 0 h = Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential direkt nach dem Auftauen, hMMP 3 h = Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential nach dreistündiger Inkubation, PMAI-hMMP 0 h = Plasmamembran- und akrosomintakte Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential direkt nach dem Auftauen, PMAI-hMMP 3 h = Plasmamembran- und akrosomintakte Spermien mit hohem Mitochondrienmembranpotential nach dreistündiger Inkubation

a,b: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb der Spalte unterscheiden sich ($p \leq 0.05$)

c,d: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb der Spalte unterscheiden sich tendenziell ($0.05 < p \leq 0.10$)

*,#: Werte derselben Parameter (hMMP, PMAI-hMMP) mit unterschiedlichen Asterisks innerhalb der Zeile unterscheiden sich ($p \leq 0.05$)

6.6.3 Bestimmung der Lipidperoxidation mittels C11-Bodipy^{581/591}

Die Bodipy-Werte der vitalen Spermien waren nach dreistündiger Inkubation bei 37 °C gegenüber den unmittelbar nach dem Auftauen gemessenen Werten angestiegen ($p \leq 0.05$). In allen Fällen hatte sich die Fluoreszenzintensität danach mindestens verdoppelt (Tab. 6.7). Im Vergleich der Tiergruppen und auch der einzelnen Phasen in den jeweiligen Tiergruppen bestanden aber keine Unterschiede ($p > 0.05$). Lediglich tendenzielle Unterschiede lagen für den Parameter FI Mean Bodipy nach dreistündiger Inkubation vor ($0.05 < p \leq 0.10$). Die Werte der KG waren gegenüber den Werten der GFSG und UFSG in der Phase I erhöht, jedoch waren diese, wie erwähnt, nicht signifikant.

Tab. 6.7: Mittels C11-Bodipy^{581/591}-Färbung bestimmte Lipidperoxidation des kryokonservierten Spermas direkt nach dem Auftauen sowie nach 3-stündiger Inkubation der mit ungesättigten (UFSG), gesättigten (GFSG) Fettsäuren und ohne zusätzliche Fettsäuren gefütterten Bullen (KG). Es wurden in den Phasen I (zwei und eine Woche vor Beginn der Fütterung), II (4. u. 8. Woche nach Beginn der Fütterung) und III (12., 16., 20.* und 24. Woche nach Beginn der Fütterung) von 6 Bullen jeder Gruppe je 2 Ejakulate pro Woche analysiert (*1 Ejakulat pro Woche)

Gruppe	Phase	FI Mean Reg Bodipy	FI Mean Reg Bodipy
		(Kanäle) 0 h	(Kanäle) 3 h
UFSG	I	44.48 ± 1.46*	89.37 ± 3.48 ^{c, #}
	II	48.04 ± 1.55*	101.29 ± 3.68 [#]
	III	45.05 ± 1.34*	92.21 ± 3.20 [#]
GFSG	I	43.94 ± 2.04*	88.84 ± 4.83 ^{c, #}
	II	49.90 ± 1.92*	104.22 ± 4.54 [#]
	III	47.57 ± 1.52*	97.47 ± 3.62 [#]
KG	I	45.09 ± 1.81*	101.11 ± 4.30 ^{d, #}
	II	50.97 ± 1.77*	102.42 ± 4.18 [#]
	III	47.10 ± 1.33*	99.02 ± 3.17 [#]

FI Mean Reg BODIPY(Kanäle) 0 h = Fluoreszenzintensität Bodipy direkt nach dem Auftauen,
 FI Mean Reg BODIPY(Kanäle) 3 h = Fluoreszenzintensität Bodipy nach dreistündiger Inkubation
 c,d: Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb der Spalte unterscheiden sich tendenziell ($0.05 < p \leq 0.10$)

*,#: Werte derselben Parameter (FI Mean Reg BODIPY) mit unterschiedlichen Asterisks innerhalb der Zeile unterscheiden sich ($p \leq 0.05$)

6.6.4 DNA-Integrität

Die DFI%-Werte waren bei allen Gruppen und in allen Phasen nach dreistündiger Inkubation im Vergleich zu den unmittelbar nach dem Auftauen gemessenen Werten angestiegen ($p \leq 0.05$). Zudem zeigten sich numerisch, aber nicht signifikant steigende DFI-Werte (DNA-Fragmentationsindex), je weiter die Fütterungsphase fortgeschritten war, d. h. Phase I wies in allen Gruppen niedrigere Werte auf als in Phase III. Es waren auch keinerlei Unterschiede ($p > 0.05$) zwischen den Gruppen in den einzelnen Phasen des Versuchszeitraumes festzustellen (Tab. 6.8).

Tab. 6.8: DNA-Integrität direkt nach dem Auftauen sowie nach 3-stündiger Inkubation der kryokonservierten Ejakulate der mit ungesättigten (UFSG), gesättigten (GFSG) Fettsäuren und ohne zusätzliche Fettsäuren gefütterten Bullen (KG). Es wurden in den Phasen I (zwei und eine Woche vor Beginn der Fütterung), II (4. u. 8. Woche nach Beginn der Fütterung) und III (12., 16., 20.* und 24. Woche nach Beginn der Fütterung) von 6 Bullen jeder Gruppe je 2 Ejakulate pro Woche analysiert (*1 Ejakulat pro Woche)

Gruppe	Phase	DFI% 0 h	DFI% 3 h
UFSG	I	3.90 ± 0.93*	8.92 ± 1.80 [#]
	II	3.94 ± 0.94*	6.85 ± 1.82 [#]
	III	4.53 ± 0.92*	9.13 ± 1.77 [#]
GFSG	I	4.10 ± 1.02*	10.15 ± 2.02 [#]
	II	4.30 ± 0.99*	9.39 ± 1.96 [#]
	III	4.59 ± 0.94*	9.72 ± 1.83 [#]
KG	I	3.22 ± 0.97*	10.25 ± 1.91 [#]
	II	3.50 ± 0.96*	10.00 ± 1.88 [#]
	III	4.00 ± 0.92*	10.38 ± 1.77 [#]

DFI% 0 h = DNA-Fragmentationsindex direkt nach dem Auftauen, DFI% 3 h = DNA-Fragmentationsindex nach 3-stündiger Inkubation

*,#: Werte mit unterschiedlichen Asterisks innerhalb der Zeile unterscheiden sich ($p \leq 0.05$)

6.7 Vitamin E-Status aller Bullen

Der Vitamin E-Gehalt des Blutserums der Bullen war vor dem Beginn der Versuche deutlich niedriger als 3 mg/l. Nach der über 6-wöchigen Supplementierung war dieses Defizit zu Versuchsbeginn ausgeglichen. Die Vitamin E-Werte der Bullen

lagen anschliessend zu allen Probezeitpunkten des Versuchs bei allen Tiergruppen über dem Referenzwert von 3 mg/l.

Tab. 6.9: Vitamin E-Gehalt des Serums der mit Vitamin E-Supplement gefütterten Bullen (UFSG, GFSG und KG). Es wurden in den Phasen I (zwei Wochen vor Beginn der Fütterung) und II (5. u. 9. Woche nach Beginn der Fütterung) je eine Serumprobe pro Woche aller zum Probenzeitpunkt beteiligten Bullen analysiert.

Versuchswoche	Phase	Vit E mg/l
1	I	3.99 ± 0.97
8	II	3.34 ± 1.04
12	II	5.03 ± 2.53

6.8 Totale Antioxidative Kapazität

Die Bestimmung der Totalen Antioxidativen Kapazität erfolgte aus dem Blutserum von je drei Bullen der UFSG und je sechs Bullen der GFSG. Die Werte stellen jeweils die LSQ-Mittelwerte und Standardfehler aus je einer Blutprobe der Versuchsbullen in Phase I sowie aus je drei Blutproben der Phase II und von jeweils vier Blutproben in Phase III dar. Im Vergleich der Tiergruppen und auch der einzelnen Phasen in den jeweiligen Tiergruppen bestanden keine Unterschiede ($p > 0.05$).

Tab. 6.10: Totale Antioxidative Kapazität des Serums der mit ungesättigten (UFSG) und gesättigten (GFSG) Fettsäuren gefütterten Bullen. Es wurden in den Phasen I (zwei Wochen vor Beginn der Fütterung), II (1., 5. u. 9. Woche nach Beginn der Fütterung) und III (13., 17., 21. und 25. Woche nach Beginn der Fütterung) von 3 Bullen der UFSG und 6 Bullen der GFSG je eine Serumprobe pro Woche analysiert.

Gruppe	Phase	TAC $\mu\text{mol/l}$
UFSG	I	395.36 ± 16.03
	II	402.11 ± 11.62
	III	398.14 ± 8.13
GFSG	I	395.66 ± 11.37
	II	394.93 ± 8.32
	III	395.64 ± 6.04

TAC = Total Antioxidant Capacity

7 Diskussion

7.1 Tiergesundheit

Während der sechs Monate andauernden Fütterungsphase konnte bei keinem Tier eine Beeinträchtigung der Gesundheit aufgrund der verabreichten Fette festgestellt werden. Die Fettsupplemente wurden von den Bullen gut aufgenommen. Dasselbe traf für Vitamin E zu. Dehning (2008), Adeel *et al.* (2009), Gholami *et al.* (2010) und Moallem *et al.* (2015) beobachteten ebenfalls keine negativen Effekte auf die Gesundheit von Bullen bei der Fütterung von Fetten.

7.2 Futtermittel

Während der Verwendung von v. a. ungesättigten Fettsupplementen muss beim Versuchstier Wiederkäuer der ruminale Bypass sichergestellt werden, um nachteilige Effekte (Kapitel 4.4) auf pansenphysiologische Prozesse und die tatsächliche Fettresorption wirksam ausschliessen zu können. In der vorliegenden Fütterungsstudie wurde der Versuchsgruppe die Omega-3-Fettsäure α -Linolensäure (C18:3n-3) als eine mögliche Vorstufe von DHA in pansenstabiler, kristalliner Form zugeführt. Die hohe Pansenstabilität wird dabei durch eine Mikroverkapselung der Omega-3-Fettsäuren in pansenstabilem Fett erreicht. Grundsätzlich können Fettsupplemente beim Rind zusammen mit dem Futter verabreicht werden, allerdings kann es durch selektives Fressverhalten der Tiere zur unvollständigen Aufnahme der Fettration kommen (Berning 2004). In dem vorliegenden Versuch wurden die Fettpulver einmal täglich über die Silagemischration gegeben und bei guter Akzeptanz mit dieser verfüttert. Das Fettsupplement der GFSG wurde zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Studie von Dehning (2008) verabreicht. Das dazu eingesetzte kristalline Fettpulver bestand hauptsächlich aus gesättigten C16- und C18-Fettsäuren (Palmölbasis). Kristalline Fette sind aufgrund ihres oberhalb der Körpertemperatur liegenden Schmelzpunktes ($>50\text{ }^{\circ}\text{C}$) panseninert und gut verträglich (Schröder *et al.* 2000). Durch die feine Partikelstruktur der kristallinen Fette ist eine vollständige Gallensäure-abhängige Emulgierung im Dünndarm gewährleistet und somit eine ausreichende Verdaulichkeit sichergestellt (Drochner & Yildiz 1999,

Schröder *et al.* 2000). Dies trifft für die beiden eingesetzten Fettsupplemente analog zu. Um Negativeffekte auf die Futteraufnahme und das Pansenmilieu möglichst gering zu halten, wurde die Fettration so ausgewählt, dass 3 bis 5 % der Trockenmasse der Tagesration davon nicht überschritten wurden. Drochner und Heller (1995) bewerten die Fütterung geschützter Fette in dieser Dosierung an Wiederkäuer als unbedenklich. Der Fettsäureanteil der Alpha-Linolensäure (C 18:3n-3) im Futtermittel betrug nach Herstellerangaben 11 bis 13 %, sodass die Bullen aus den täglich verabreichten 400 g Fettsupplement 44 bis 52 g Omega-3-FS aufnahmen. Bei Holsteinbullen wurden bisher in vergleichbaren Versuchen 400 g Leinsamenöl mit einem Anteil von 56 bis 71 % Alpha-Linolensäure (224 bis 284 g C 18:3n-3) gefüttert (Dehning 2008). In einer weiteren Studie wurden 100 g eines kommerziellen Supplements mit 25 % Omega-3-FS, davon 10 % DHA, verabreicht (Gholami *et al.* 2010). Bei der jüngsten Studie von Moallem *et al.* (2015) wurden verschiedene pansengeschützte Fettquellen verabreicht: einer Gruppe 450 g leinsamenöhlhaltiges Fettsupplement (netto 84.2 g Alpha-Linolensäure) und einer weiteren Gruppe 450 g fischöhlhaltiges Fettsupplement (netto 8.7 g EPA und 6.5 g DHA). Die Bullen der Studien von Dehning (2008) und Moallem *et al.* (2015) erhielten damit wesentlich höhere Mengen an ALA als die Bullen der vorliegenden Studie. Das Vitamin-E-Selen-Supplement (pulverisiert) wurde in der gleichen Art und Weise wie die Fettsupplemente vorgelegt und von den Bullen gut angenommen, was sich in dem kontinuierlich hohen Blutserumgehalt von mehr als 3 mg/l (Dirksen 2006) während des Versuchs widerspiegelte.

7.3 Spermaquantität

Volumen, Konzentration und Gesamtspermienzahl der Ejakulate der Fleckviehbullen veränderten sich durch die Fettsupplement-Zulage im Futter nicht.

Ähnliche Fütterungsversuche an Holstein- (Dehning 2008, Gholami *et al.* 2010, Moallem *et al.* 2015) und Büffelbullen (Adeel *et al.* 2009) kamen zu der gleichen Feststellung. Nach Kelso *et al.* (1997a) hat der Anteil von mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Phospholipide in Spermien von Bullen einen Einfluss auf die Konzentration des Ejakulats. So wurden die altersbedingt reduzierte Spermienkonzentration und Motilität bei Bullen mit einer Abnahme der Arachidon- (C20:4n-3) und Docosahexaensäure (C22:6n-3) des Phosphatidylethanolamins sowie des Phosphatidyl-

cholins in Zusammenhang gebracht (Kelso *et al.* 1997a). Es konnte im Rahmen von Studien an anderen Tierarten gezeigt werden, dass die Fütterung von Omega-3-Fettsäuren bei Hengsten (Brinsko *et al.* 2005, Harris *et al.* 2005) und bei Ebern (Rooke *et al.* 2001, Strzezek *et al.* 2004, Maldjian *et al.* 2005, Estienne *et al.* 2008) zu einem grösseren Spermavolumen und einer erhöhten Spermiedichte führt, ganz im Gegensatz zu den vorliegenden bzw. erwähnten Ergebnissen bei Bullen. Die Gemeinsamkeit zwischen Hengst- und Eberspermien, DPA als häufigste FS der Phospholipidmembran zu enthalten und DHA physiologischerweise wesentlich weniger als bei Bullen, könnte zu einer erhöhten Einlagerungskapazität von DHA in Spermien dieser beiden Tierarten führen. Nach Maldjian *et al.* (2005) kann, ausgehend von der Annahme, dass die Spermatogeneseaktivität durch einen Mangel an essentiellen Fettsäuren unterdrückt wird, ein entsprechendes Supplement die Bioverfügbarkeit der DHA erhöhen und die Spermatogeneserate damit steigern. Einen ebenfalls hohen DHA-Gehalt in der Phospholipidmembran – so wie der Bulle – weist der Schafbock auf. Und dennoch wurde bei Schafböcken in mehreren aktuellen Fütterungsversuchen mit Fettsäuren eine Zunahme der Spermienkonzentration bzw. der Spermiengesamtzahl erzielt (Samadian *et al.* 2010, Esmaeili *et al.* 2012, Fair *et al.* 2014). Dies steht im Gegensatz zu der Annahme, dass die Kapazität des Einbaus von ungesättigten Fettsäuren (DHA) vom physiologischen Ausgangswert der Zellen bzw. dem Angebot aus dem Futter abhängt und Einfluss auf die Spermaquantität hat. In diesen Versuchen mit Schafböcken erwies sich als besonders auffällig das Phänomen, dass im Allgemeinen diejenigen Versuchsgruppen, die mit Fischöl supplementiert wurden, den Kontrollgruppen, die jeweils isoenergetisch mit Palmöl (Fair *et al.* 2014) bzw. mit Palmöl oder Sonnenblumenöl (C18:2) (Esmaeili *et al.* 2012) gefüttert wurden, überlegen waren. Nach Ashes *et al.* (1992) sind die Eicosapentaensäure (C-20:5n-3) und die Docosahexaensäure (C-22:6n-3) in Fischöl auch in ungeschützter Form bei Schafen von der Biohydrogenierung nicht betroffen, während rein ungesättigte C-18-Fettsäuren (Ölsäure und Linolsäure) von den metabolischen Prozessen der Pansenmikroorganismen erfasst wurden. Es kann in diesem Zusammenhang von einer eventuell vorteilhafteren Aufnahme und Verstoffwechslung der ungesättigten Fettsäuren des Fischöls in direktem Vergleich zu C-18 PUFA in Sonnenblumenöl oder Leinöl ausgegangen werden. Eine derartige Wirkung könnte auch Einfluss auf die Spermatogenese nehmen. Auch Gholami *et al.* (2010) verabreichten Bullen Fischöl (Kap. 4.5), aber im Vergleich zur Fischölfütterung an Schafböcken anderer Studien

mit einer Höhe von 2–3 % der Trockensubstanz in einer verhältnismässig deutlich geringeren Menge von nur 1 % der TS. Den Bullen der vorliegenden Studie wurde wie auch bei Dehning (2008) und Adeel *et al.* (2009) zu keinem Zeitpunkt Fischöl verfüttert. Dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen Bullen und Schafböcken der verschiedenen Studien erklären.

7.4 Spermaqualität

Durch eine homogene Auswahl von sich über mehrere Monate in der Produktion befindenden Bullen mit bekannt positiven Spermaeigenschaften war eine hohe Spermaqualität der Tiere gewährleistet.

Bei den Bullen der Studie von Dehning (2008) handelte es sich dagegen um Wartebullen, die über einen längeren Zeitraum nicht für die Spermaproduktion eingesetzt worden waren. Im Gegensatz zu der vorliegenden Studie mit konstant gleichbleibender Spermaqualität aller Gruppen des Versuchs verbesserten sich in der Studie von Dehning (2008) die Spermienmembranparameter beider Versuchsgruppen im Fütterungszeitraum. Das kann als ein Indiz dafür gewertet werden, dass die Aktivierung der Spermatogenese durch die einsetzende Spermaproduktion sowie veränderte Managementbedingungen die verbesserte Spermaqualität bei beiden Gruppen des Versuchs von Dehning auslöste. Bei den Studien von Dehning (2008), Gholami *et al.* (2010) und Moallem *et al.* (2015) an Holsteinbullen wurden positive Effekte von Futterfetten auf die Spermaqualität erzielt. Erstmals wurden bei der vorliegenden Studie die Untersuchungen an Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh durchgeführt. Rassebedingte Unterschiede können sich generell auf Spermparameter auswirken (Brito *et al.* 2002; Snoj *et al.* 2013).

Die Motilität der Spermien in den Nativejakulaten wie auch in den kryokonservierten Proben der Fleckviehbullen blieb in allen Gruppen im Versuchsverlauf unbeeinflusst von den gefütterten Fettsupplementen; bei Holsteinbullen kam Dehning (2008) grundsätzlich zu der gleichen Feststellung. Gholami *et al.* (2010) konnten dagegen bei Frischsperma von Holsteinbullen durch die Verabreichung von PUFAs verbesserte Motilitätswerte erzielen; Gleiches gelang Adeel *et al.* (2009) bei kryokonserviertem Büffelbullensperma. Eine Verbesserung der Motilitätsparameter sowohl bei Nativsperma als auch bei kryokonserviertem Bullensperma war das Ergebnis der Verabreichung von PUFA durch Moallem *et al.* (2015).

Nach Conner *et al.* (1998) ist v. a. der DHA-Anteil der Membran des Spermien-schwanzes bedeutend für die Vorwärtsbeweglichkeit der Samenzellen. Mourvaki *et al.* (2010) konnten nach Leinsamenfütterung eine Zunahme des PUFA-Gehalts bei Hasenspermien feststellen. Dabei wurde durch eine partielle Analyse der FS der Membran des Spermien-schwanzes hauptsächlich in diesem Membranabschnitt der Einbau der DHA lokalisiert. In zahlreichen Fütterungsversuchen wurden somit ungesättigte Fettsäuren eingesetzt, in der Erwartung, die Spermienmotilität zu verbessern. Evaluierungen der Motilitätsergebnisse von Fütterungsversuchen bei Schafböcken (Graaf *et al.* 2007, Samadian *et al.* 2010, Esmaeili *et al.* 2012, Selvaraju *et al.* 2012, Jafaroghli *et al.* 2014) wie auch bei Ebern (Rooke *et al.* 2001, Mitre *et al.* 2004, Strzezek *et al.* 2004, Maldjian *et al.* 2005, Estienne *et al.* 2008, Castellano *et al.* 2010a, Castellano *et al.* 2010b) und Hengsten (Brinsko *et al.* 2005, Harris *et al.* 2005, Schmid-Lausigk & Aurich 2014) konnten aber deutlich zeigen, dass die Fütterung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch innerhalb der gleichen Spezies nur teilweise (Tab. 1 u. 2) zu einem Anstieg der Motilität führte. Bei Fettfütterung an Hengste verbesserten sich prinzipielle Motilitätsparameter in zwei (Brinsko *et al.* 2005, Schmid-Lausigk & Aurich 2014) von drei Studien. Durch Fettsupplementierung nahmen bei Ebern nur bei drei (Rooke *et al.* 2001, Mitre *et al.* 2004, Castellano *et al.* 2010b) von sieben Studien die Motilitätsparameter zu, während dies bei Schafböcken in vier (Samadian *et al.* 2010, Esmaeili *et al.* 2012, Selvaraju *et al.* 2012, Jafaroghli *et al.* 2014) von fünf Studien der Fall war. Orientiert am Konfektionierungszustand des untersuchten Spermias konnte man auch im Vergleich der Studien keine eindeutigen Tendenzen ableiten, auf welche Art der Konfektionierung Fettsäuren sich primär positiv auswirken. So wurde an Schafböcken bei vier Versuchen die Motilität von Frischsamen durch die Fette verbessert (Samadian *et al.* 2010, Esmaeili *et al.* 2012, Selvaraju *et al.* 2012, Jafaroghli *et al.* 2014), während bei kryokonserviertem Sperma eine Studie positive (Esmaeili *et al.* 2012) und eine andere negative (Graaf *et al.* 2007) Effekte nachwies.

Bei Ebern konnte die Motilität von Frischsperma durch verabreichte Fettsäuren bei vier Studien (Strzezek *et al.* 2004, Maldjian *et al.* 2005, Estienne *et al.* 2008, Castellano *et al.* 2010a) nicht erhöht werden; nur in einer einzigen Arbeit (Rooke *et al.* 2001) war eine tatsächliche Verbesserung erzielt worden. Dagegen konnte die Qualität von kryokonserviertem Ebersperma in keiner Studie gesteigert werden (Maldjian *et al.* 2005, Castellano *et al.* 2010b).

Weder Brinsko *et al.* (2005) noch Harris *et al.* (2005) erreichten durch die PUFA-Supplemente einen Anstieg in der Motilität des Frischsamens von Hengsten. Bei Betrachtung der Motilitätsergebnisse individueller Hengste konnten Harris *et al.* (2005) aber bei einem Tier mit anfänglich niedriger Motilität eine deutliche Verbesserung im Versuchsverlauf bei 48 h Flüssigkonservierung feststellen. Auffällig ist bei Betrachtung der Motilitätsergebnisse von Hengsten vor allem die Steigerung der Motilität bei über einen längeren Zeitraum gelagertem flüssigkonserviertem Sperma (Brinsko *et al.* 2005, Schmid-Lausigk & Aurich 2014).

Eine Steigerung der Motilität durch eine erhöhte Fluidität der Membran nach Fettsäure-Einbau wäre vor allem bei kryokonserviertem Sperma zu erwarten gewesen, blieb aber bei den meisten Studien aus. Nur Adeel *et al.* (2009) und Moallem *et al.* (2015) konnten im Gegensatz zur vorliegenden Studie die Qualität von kryokonserviertem Büffelbullen- bzw. Bullensperma durch PUFA-Supplemente verbessern.

Hinzu kommt, dass Ergebnisse der Motilitätsanalyse entscheidend von der Methode der Untersuchung beeinflusst sein können. Die verbesserte Motilität des kryokonservierten Büffelbullenspermas der Studie von Adeel *et al.* (2009) wurde anhand einer Motilitätsschätzung festgestellt. Malmgren (1997) sieht in der objektiven computergestützten Auswertung eindeutige Vorteile zur Motilitätsschätzung, die einer gewissen Subjektivität unterliegen kann. Gholami *et al.* (2010) zum Beispiel stellten bei der klassischen mikroskopischen Motilitätsuntersuchung des Frischspermas keine Verbesserung der Motilitätsparameter fest, wobei im Gegensatz dazu bei den Ergebnissen der computergestützten Motilitätsanalyse (CASA) Differenzen nachweisbar waren. In der vorliegenden Arbeit wurde aus diesem Grund grosses Augenmerk auf eine umfangreiche Motilitätsuntersuchung gelegt: Die Nativejakulate wurden dazu jeweils bereits vor der Verarbeitung beurteilt, die kryokonservierten Ejakulate wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Auftauen sowohl standardmässig mikroskopisch geschätzt als auch mittels CASA bestimmt. Die Ergebnisse waren dabei aber in allen Gruppen im Versuchsverlauf unabhängig von der Untersuchungsmethode. Mit beiden Messmethoden waren keine Einflüsse der Fettfütterung auf die Spermaqualität festzustellen. Ein Vergleich der objektiv mit CASA festgestellten Ergebnisse der progressiven Motilität des kryokonservierten Spermas der vorliegenden Studie (PMOT) mit denen von Gholami *et al.* (2010) bzw. Moallem *et al.* (2015) zeigt zum Teil grosse Differenzen: Die Anteile progressiv motiler Spermien der Versuchsgruppe lagen bei Gholami *et al.* (2010) in Versuchs-

woche 1 bei 29.57 %, in Versuchswoche 9 bei 35.27 %. Die Werte der UFSG der zeitlich vergleichbaren Versuchsphasen I und II in der vorliegenden Studie waren dagegen mit 57.78 % bzw. 60.71 % wesentlich höher. Die progressive Motilität der ALA-Gruppe der Studie von Moallem *et al.* (2015) lag im Mittel der Versuchswochen sieben bis dreizehn bei 43.23 %. Die Werte der UFSG der vorliegenden Studie waren in Phase II und III mit 60.71 % bzw. 59.27 % ebenfalls höher. Diese deutlichen Unterschiede in den Motilitätsergebnissen könnten auf der Verwendung verschiedenartiger CASA-Systeme in der Arbeit von Gholami *et al.* (2010) (CASA-System Hamilton-Thorne) bzw. Moallem *et al.* (2015) (CASA-System SQA-Vb Medical Electronic Systems) und in der vorliegenden Studie (CASA-System Minitüb SpermVision) beruhen. Die differierenden Ergebnisse könnten aber auch darauf zurückzuführen sein, dass in der eigenen Studie die Spermaqualität der Versuchsbullen, wie am Anfang des Kapitels bereits beschrieben, schon zu Beginn der Studie von überdurchschnittlicher hoher Qualität war, wodurch kein weiterer Anstieg in der Spermaqualität mehr zu erzielen war.

Die Spermienmorphologie des kryokonservierten Spermas der Fleckviehbullen änderte sich im Versuchsverlauf nicht. Nach Harris *et al.* (2005) war die durch das Fett-supplement verbesserte Morphologie von Hengstspermien besonders bei denjenigen Tieren mit minderwertiger Ausgangsqualität der Spermien deutlich. Wie bereits beschrieben, wurden in der vorliegenden Studie nur Bullen mit bekannt guter Spermaqualität für den Versuch verwendet. Dies könnte so wie bereits in der Diskussion der Motilitätsanalyse dargestellt, die Konstanz der morphologischen Parameter erklären.

Die PMAI-Werte, die akrosomalen Schäden sowie die Induzierbarkeit der Akrosomreaktion lassen ebenfalls keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Fütterung erkennen. Auch das Mitochondrienmembranpotential der Versuchsbullen änderte sich durch die Verabreichung von Fettsupplementen grundsätzlich nicht. Auch Gholami *et al.* (2010) gelang es nicht, durch das PUFA-Supplement die Membraneigenschaften von kryokonserviertem Bullensperma zu verbessern; in der letztgenannten Arbeit wurden jedoch die Membraneigenschaften von Bullenfrischsamen untersucht. Dagegen konnte Dehning (2008) bei Holsteinbullen bei kryokonserviertem Sperma eine Zunahme des Anteils plasmamembranintakter Spermien und eine Abnahme der akrosomalen Schädigungen beobachten. Diese Änderungen begrenzten sich aber nicht nur auf die Versuchsbullen, denen PUFA verabreicht

worden war, wodurch der Anteil an DHA der Membran in diesem Zuge anstieg, sondern zeigten sich auch in gleichem Ausmass bei den mit SFA gefütterten Kontrolltieren, bei denen die Fettsäurezusammensetzung der Spermien unverändert blieb. Bei Ebern jedoch konnte weder nach Verabreichung von PUFAs noch nach der Fütterung gesättigter Fettsäuren an die Kontrollgruppe eine Verbesserung der Membran- und Akrosomintegrität erreicht werden (Castellano *et al.* 2010b). Im Vergleich zu den Studien von Dehning (2008) und Castellano *et al.* (2010b), bei denen sowohl die Versuchsgruppen als auch die Kontrollgruppen eine Fettergänzung erhalten hatten, war in der vorliegenden Arbeit zusätzlich eine Kontrollgruppe mit einem kommerziellen Konzentrat energetisch gleichwertig ohne Fettergänzung versorgt worden. Die Annahme Dehnings (2008), dass die Fettsupplemente, gesättigt oder ungesättigt, die Membran- und Akrosomeigenschaften positiv beeinflussen könnten, kann durch die Ergebnisse von Castellano *et al.* (2010b) sowie die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Träfe die Annahme zu, hätten sich v. a. in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse der erwähnten Kontrollgruppe, die kein Fettsupplement erhielten, von denen der supplementierten Tiere signifikant unterscheiden müssen.

Zunehmende PUFA-Gehalte des Futters beeinflussten bei verschiedenen Tierarten den antioxidativen Status des Spermias (Surai *et al.* 2000b, Castellini *et al.* 2003, Zaniboni *et al.* 2006). Grundsätzlich positive Effekte von Fettsupplementen auf die Membraneigenschaften stellten sich immer dann ein, wenn in den Versuchsstudien zeitgleich auch Antioxidantien verabreicht wurden (Rooke *et al.* 2001, Strzezek *et al.* 2004, Dehning 2008, Gholami *et al.* 2010). Hohe PUFA-Gehalte der Nahrung machen folglich die Verabreichung von Antioxidantien notwendig, um die Spermien gegen LPO und die damit verbundenen nachteiligen Folgen zu schützen. Vitamin E ist aufgrund seiner lipophilen antioxidativen Eigenschaften von besonders grosser Bedeutung in der Prävention der Membranfunktionen von Spermien (Beconi *et al.* 1993; Sikka *et al.* 1995; Cerolini *et al.* 2000).

Bei den Bullen der Studie von Dehning (2008) wurde zu Beginn der Versuche ein Vitamin E-Mangel festgestellt. In dieser Studie kam es auch, wie bereits erwähnt, zu einem Anstieg in der Membranqualität der Kontrollgruppe, die keine Omega-3-FS, sondern SFA und Vitamin E bekamen (Dehning 2008). Es ist in diesem Zusammenhang möglich, dass der beobachtete Effekt von der sich anschliessenden Vitamin E-Verabreichung ausgegangen ist. Das Fischölsupplement der Studie von Gholami *et*

al. (2010) enthielt ebenfalls einen Vitamin E-Zusatz, sodass auch hier ein Einfluss auf die Verbesserung der Frischsamenqualität nicht ausgeschlossen werden kann. Die konstant hoch bleibenden Ergebnisse der untersuchten Spermienmembranparameter PMAI, AF, IAR und hMMP aller Gruppen der vorliegenden Studie könnten aus der beschriebenen guten Versorgung der Bullen mit Vitamin E resultieren. Das in diesem Versuch verabreichte Vitamin E könnte mögliche nachteilige Effekte der Futterfette in Zusammenhang mit LPO, ähnlich wie in Studien von Cerolini *et al.* (2000) an Eberspermien und Zaniboni *et al.* (2006) an Truthahnspermien beschrieben, kompensiert und sich auf die Spermaqualität der Kontrollgruppe stabilisierend ausgewirkt haben, sodass schliesslich bei allen Gruppen ein ausgeglichenes Ergebnis resultierte.

Es ist auch denkbar, dass die Konzentration der im Rahmen dieser Arbeit verabreichten Fettsupplemente zu niedrig gewählt wurde, um einen signifikanten Effekt auf die beschriebenen Membraneigenschaften erzielen zu können. Im Vergleich zur vorliegenden Studie erhielten die Bullen der Versuchsgruppe von Dehning (2008) mehr als die fünffache Menge an Alpha-Linolensäure. Weiterhin ist es möglich, dass die hier besprochenen Ergebnisse durch die Versuchstierauswahl beeinflusst wurden: Die Bullen der Studie von Dehning (2008) waren Wartebullen und ursprünglich nicht für die Spermaproduktion genutzt worden; eine wie bei der vorliegenden Studie getroffene Vorauswahl der Versuchsbullen mit dem Kriterium einer stabilen Spermaproduktion könnte die Unterschiede in den Effekten auf die PMAI- bzw. AS-Werte der Studie von Dehning (2008) und der vorliegenden Arbeit erklären.

Während die hMMP-0h-Werte direkt nach dem Auftauen keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen und den Phasen innerhalb der Gruppen zeigten ($p > 0.05$), waren die hMMP-3h-Werte in Phase I bei den Bullen der Kontrollgruppe signifikant niedriger ($p < 0.05$) als bei denen der UFSG (Tab. 6.6). Die hMMP-3h-Werte der Kontrollbullen hatten in den Phasen II und III gegenüber Phase I deutlich zugenommen und unterschieden sich in diesem Zeitintervall nicht mehr von den entsprechenden Werten der Bullen der anderen beiden Gruppen. Dieses Ergebnis ist nicht erklärbar, sodass die Differenzen wahrscheinlich zufällig bedingt waren und nicht auf die Fütterung zurückzuführen sind.

Weder bei den Versuchs- noch bei den Kontroll-Bullen traten während der Zeit des Experiments Änderungen der DNA-Integrität auf. In Übereinstimmung mit dem vorliegenden Ergebnis waren auch in der Studie von Dehning (2008) keine Änderungen der DFI%-Werte trotz eines höheren DHA-Anteils der Bullenspermien zu

verzeichnen. Auch Studien an anderen Tierarten bestätigen diese Beobachtung (Brinsko *et al.* 2005, Castellano *et al.* 2010b). Nach Sikka *et al.* (1995) kann eine Lipidperoxidation neben negativen Membraneffekten auch Schäden an intrazellulären Strukturen wie der DNA auslösen. Dabei kommen den Vitaminen C und E schützende Wirkungen gegen die endogene Oxidation des DNA-Moleküls und verschiedener Membrankomponenten zu (Sikka *et al.* 1995). In der aktuellen und in allen weiteren in diesem Zusammenhang erwähnten Studien haben die Versuchstiere Vitamin E-Supplemente erhalten. Dies könnte die konstanten DFI%-Werte erklären. Der unveränderte Oxidationsstatus der Spermienmembran aller Gruppen während des Versuchszeitraums verstärkt die These der stabilisierenden Wirkungen von Vitamin E auf die Spermaqualität.

Die Untersuchung der kryokonservierten Proben mit Bodipy sollte erwartungsgemäss eine Zunahme der LPO in der UFSG-Gruppe aufweisen. Da bei den Bullen der GFSG und KG von keinem verstärkten Einbau von DHA in die Spermien auszugehen ist, waren weniger starke oxidative Effekte bei den beiden letztgenannten Gruppen zu erwarten. In der vorliegenden Studie könnten die Relationen der Konzentrationen der FS und der Antioxidantien von den ausreichend verabreichten Antioxidantien (täglich 40 g eines Vitamin-E-Selen-Konzentrats) bei allen Gruppen dominiert worden sein, was zu den nicht zwischen verschiedenen Fütterungsgruppen differierenden Bodipy-Werten geführt haben könnte. Auch die fehlenden Unterschiede in der Totalen Antioxidativen Kapazität des Blutserums der Bullen der Gruppen UFSG und GFSG weisen darauf hin.

7.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass bis heute zahlreiche Fütterungsversuche mit Fettsupplementen zur Verbesserung der Spermaqualität durchgeführt wurden. Bis auf wenige Ausnahmen haben die Studien an verschiedenen Spezies entweder positive oder neutrale Ergebnisse erzielt: In der vorliegenden Arbeit an Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh führte die Fettsupplementierung zu keinen Veränderungen in der Spermaquantität und -qualität. Es ist dabei jedoch zu beachten, dass alle Versuchstiere bereits vor Beginn der Studie eine hohe initiale Spermaqualität aufwiesen. Daher ist denkbar, dass die Fütterung von Fettsupplementen bei Tieren mit schlechter Spermaqualität zu deren Verbesserung führt. In zukünftigen Studien

sollten daher gezielt solche Bullen untersucht werden. In dieser Studie wurde der Fettsäuregehalt der Phospholipide der Spermien nicht bestimmt. Dies wäre jedoch vorteilhaft, um über den Nachweis der fütterungsbedingten Änderung in der Fettsäurezusammensetzung eine eindeutige Interpretation der Versuchsergebnisse zu ermöglichen.

8 Literaturverzeichnis

- Abavisani, A.; Arshami, J.; Naserian, A. A.; Sheikholeslami Kandelousi, M. A.; Azizzadeh, M. (2013) Quality of bovine chilled or frozen-thawed semen after addition of omega-3 Fatty acids Supplementierung to extender. In : International journal of fertility & sterility, vol. 7, n° 3, p. 161–168.
- Adeel, M.; Ijaz, A.; Aleem, M.; Rehman, H.; Yousaf, M. S.; Jabbar, M. A. (2009) Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through Supplementierung of fat. In : Theriogenology, vol. 71, n° 8, p. 1220–1225.
- Aitken, R. J. (1994) A free radical theory of male infertility. In : Reproduction, fertility, and development, vol. 6, n° 1, p. 19-23; discussion 23-4.
- Aitken, R. J.; Clarkson, J. S. (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. In : Journal of reproduction and fertility, vol. 81, n° 2, p. 459–469.
- Aitken, R. J.; Clarkson, J. S.; Fishel, S. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. In : Biology of reproduction, vol. 41, n° 1, p. 183–197.
- Akaike, H. (1973) Akaikes Informationskriterium.
(https://de.wikipedia.org/wiki/Informationskriterium#Akaikes_Informationskriterium [27.06.2015])
- Alvarez, J. G.; Storey, B. T. (1992) Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. In : Journal of andrology, vol. 13, n° 3, p. 232–241.
- Alvarez, J. G.; Touchstone, J. C.; Blasco, L.; Storey, B. T. (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. In : Journal of andrology, vol. 8, n° 5, p. 338–348.
- Amann, R. P.; DeJarnette, J. M. (2012) Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift. In : Theriogenology, vol. 77, n° 5, p. 795–817.
- Am-in, N.; Kirkwood, R. N.; Techakumphu, M.; Tantasuparuk, W. (2011) Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. In : Theriogenology, vol. 75, n° 5, p. 897–903.
- Anzar, M.; Kroetsch, T.; Boswall, L. (2011) Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes. In : Animal Reproduction Science, vol. 126, n° 1-2, p. 23–31.
- Argov-Argaman, N.; Mahgrefthe, K.; Zeron, Y.; Roth, Z. (2013)a Variation in lipid profiles within semen compartments—the bovine model of aging. In : Theriogenology, vol. 80, n° 7, p. 712–721
- Argov-Argaman, N.; Mahgrefthe, K.; Zeron, Y.; Roth, Z. (2013)b Season-induced variation in lipid composition is associated with semen quality in Holstein bulls. In : Reproduction, vol. 145, n° 5, p. 479–489.
- Arzondo, M. M.; Caballero, J. N.; Marín-Briggiler, C. I.; Dalvit, G.; Cetica, P. D.; Vazquez-Levin, M. H. (2012) Glass wool filtration of bull cryopreserved semen: A rapid and effective method to obtain a high percentage of functional sperm. In : Theriogenology, vol. 78, n° 1, p. 201–209.

- Ashes, J. R.; Siebert, B. D.; Gulati, S. K.; Cuthbertson, A. Z.; Scott, T. W. (1992) Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. In : *Lipids*, vol. 27, n° 8, p. 629–631.
- Aveldano, M. I.; Rotstein, N. P.; Vermouth, N. T. (1992) Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. In : *The Biochemical journal*, 283 (Pt 1), p. 235–241.
- Beconi, M. T.; Francia, C. R.; Mora, N. G.; Affranchino, M. A. (1993) Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. In : *Theriogenology*, vol. 40, n° 4, p. 841–851.
- Benson, J. D.; Woods, E. J.; Walters, E. M.; Critser, J. K. (2012) The cryobiology of spermatozoa. In : *Theriogenology*, vol. 78, n° 8, p. 1682–1699.
- Berning, R. (2004) Auswirkungen der alimentären Supplementierung n6- und n3- ungesättigter Lipide auf die pankreatische und periphere Insulinresponse bei Rindern: Untersuchungen mit der hyperglykämischen und der euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamp-Technik. In : Tierärztliche Hochschule Hannover, Vet. Med. Dissertation.
- Bilodeau, J.-F.; Blanchette, S.; Cormier, N.; Sirard, M.-A. (2002) Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. In : *Theriogenology*, vol. 57, n° 3, p. 1105–1122.
- Blesbois, E.; Douard, V.; Germain, M.; Boniface, P.; Pellet, F. (2004) Effects of n-3 polyunsaturated dietary Supplementierung on the reproductive capacity of male turkeys. In : *Theriogenology*, vol. 61, n° 2-3, p. 537–549.
- Blesbois, E.; Grasseau, I.; Seigneurin, F.; Mignon-Grasteau, S.; Saint Jalme, M.; Mialon-Richard, M. M. (2008) Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. In : *Theriogenology*, vol. 69, n° 2, p. 252–261.
- Brinsko, S. P.; Varner, D. D.; Love, C. C.; Blanchard, T. L.; Day, B. C.; Wilson, M. E. (2005) Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. In : *Theriogenology*, vol. 63, n° 5, p. 1519–1527.
- Brito, L. F. C.; Silva, A. E. D. F.; Rodrigues, L. H.; Vieira, F. V.; Deragon, L. A. G.; Kastelic, J. P. (2002) Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. In : *Theriogenology*, vol. 58, n° 6, p. 1175–1186.
- Calisici, O. (2010) Investigation of antioxidative capacity in bovine seminal plasma—Effects of Omega-3 fatty acids. In : Tierärztliche Hochschule Hannover, Vet. Med. Dissertation.
- Castellano, C.-A.; Audet, I.; Bailey, J. L.; Chouinard, P. Y.; Laforest, J.-P.; Matte, J. J. (2010)a Effect of dietary n-3 fatty acids (fish oils) on boar reproduction and semen quality. In : *Journal of Animal Science*, vol. 88, n° 7, p. 2346–2355.
- Castellano, C.-A.; Audet, I.; Bailey, J. L.; Laforest, J.-P.; Matte, J. J. (2010)b Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 °C or cryopreserved. In : *Theriogenology*, vol. 74, n° 8, p. 1482–1490.
- Castellini, C.; Lattaioli, P.; Dal Bosco, A.; Minelli, A.; Mugnai, C. (2003) Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin E, C and n-3 fatty acids. In : *Reproduction, nutrition, development*, vol. 43, n° 1, p. 91–103.
- Cerolini, S.; Kelso, K. A.; Noble, R. C.; Speake, B. K.; Pizzi, F.; Cavalchini, L. G. (1997) Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. In : *Biology of reproduction*, vol. 57, n° 5, p. 976–980.

- Cerolini, S.; Maldjian, A.; Surai, P.; Noble, R. (2000) Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. In : *Animal reproduction science*, vol. 58, n° 1-2, p. 99–111.
- Cerolini, S.; Maldjian, A.; Pizzi, F.; Gliozzi, T. M. (2001) Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. In : *Reproduction* (Cambridge, England), vol. 121, n° 3, p. 395–401.
- Chakrabarty, J.; Banerjee, D.; Pal, D.; De, J.; Ghosh, A.; Majumder, G. C. (2007) Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. In : *Cryobiology*, vol. 54, n° 1, p. 27–35.
- Chatterjee, S.; Gagnon, C. (2001) Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. In : *Molecular reproduction and development*, vol. 59, n° 4, p. 451–458.
- Christensen, P.; Boelling, D.; Pedersen, K. M.; Korsgaard, I. R.; Jensen, J. (2005) Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. In : *Journal of andrology*, vol. 26, n° 1, p. 98–106.
- Connor, W. E.; Lin, D. S.; Wolf, D. P.; Alexander, M. (1998) Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm. In : *Journal of lipid research*, vol. 39, n° 7, p. 1404–1411.
- Conquer, J. A.; Martin, J. B.; Tummon, I.; Watson, L.; Tekpetey, F. (2000) Effect of DHA Supplementierung on DHA status and sperm motility in asthenozoospermic males. In : *Lipids*, vol. 35, n° 2, p. 149–154.
- Coulter, G. H.; Cook, R. B.; Kastelic, J. P. (1997) Effects of dietary energy on scrotal surface temperature, seminal quality, and sperm production in young beef bulls. In : *Journal of animal science*, vol. 75, n° 4, p. 1048–1052.
- Cseh, S.; Faigl, V.; Amiridis, G. S. (2012) Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. In : *Animal Reproduction Science*, vol. 130, n° 3-4, p. 187–192.
- Curry, M. R. (2000) Cryopreservation of semen from domestic livestock. In : *Reviews of reproduction*, vol. 5, n° 1, p. 46–52.
- Dehning, F. (2008) Einfluss der Fütterung von Omega-3-Fettsäure auf die Spermaqualität von Bullen. In : *Tierärztliche Hochschule Hannover, Vet. Med. Dissertation*.
- Dirksen, G. (2006): *Krankheiten der Bewegungsorgane*
- Dirksen, G.; Rosenberger, G.; Baumgartner, W. (2006) *Innere Medizin und Chirurgie des Rindes*. 5. Aufl., unveränd. Nachdr. der 4. Aufl. Stuttgart : Parey. S. 753-1030.
- Drobnis, E. Z.; Crowe, L. M.; Berger, T.; Anchoroguy, T. J.; Overstreet, J. W.; Crowe, J. H. (1993) Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. In : *The Journal of experimental zoology*, vol. 265, n° 4, p. 432–437.
- Drochner, W.; Heller R. (1995) Neue Ergebnisse zum Einsatz geschützter Fette bei Wiederkäuern. In : *Übersicht Tierernährung*, n° 24, p. 52–61.
- Drochner, W.; Yildiz G. (1999) Aktuelles zum Einsatz von Ca-Seifen in der Milchkuhfütterung. In : *Lohmann Information*, n° 99, p. 1–6.
- Esmaeili, V.; Shahverdi, A. H.; Alizadeh, A. R.; Alipour, H.; Chehrazi, M. (2012) Saturated, omega-6 and omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen-thawed semen and blood parameters in rams. In : *Andrologia*, p. n/a.
- Estienne, M. J.; Harper, A. F.; Crawford, R. J. (2008) Dietary Supplementierung with a source of omega-3 fatty acids increases sperm number and the duration of ejaculation in boars. In : *Theriogenology*, vol. 70, n° 1, p. 70–76.

- Evenson, D. P.; Larson, K. L.; Jost, L. K. (2002) Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. In : *Journal of andrology*, vol. 23, n° 1, p. 25–43.
- Fair, S.; Doyle, D. N.; Diskin, M. G.; Hennessy, A. A.; Kenny, D. A. (2014) The effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids Supplementierung of rams on semen quality and subsequent quality of liquid stored semen. In : *Theriogenology*, vol. 81, n° 2, p. 210–219.
- Gao, D.; Critser, J. K. (2000) Mechanisms of cryoinjury in living cells. In : *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, vol. 41, n° 4, p. 187–196.
- García-Ispuerto, I.; López-Gatius, F.; Santolaria, P.; Yániz, J. L.; Nogareda, C.; López-Béjar, M. (2007) Factors affecting the fertility of high producing dairy herds in northeastern Spain. In : *Theriogenology*, vol. 67, n° 3, p. 632–638.
- Gholami, H.; Chamani, M.; Towhidi, A.; Fazeli, M. H. (2010) Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. In : *Theriogenology*, vol. 74, n° 9, p. 1548–1558.
- Giraud, M. N.; Motta, C.; Boucher, D.; Grizard, G. (2000) Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. In : *Human reproduction (Oxford, England)*, vol. 15, n° 10, p. 2160–2164.
- Girotti, A. W. (1985) Mechanisms of lipid peroxidation. In : *Journal of free radicals in biology & medicine*, vol. 1, n° 2, p. 87–95.
- Gliozzi, T. M.; Zaniboni, L.; Maldjian, A.; Luzi, F.; Maertens, L.; Cerolini, S. (2009) Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. In : *Theriogenology*, vol. 71, n° 6, p. 910–919.
- Graaf, S. P. de; Peake, K.; Maxwell, W. M. C.; O'Brien, J. K.; Evans, G. (2007) Influence of supplementing diet with Oleic and Linoleic acid on the freezing ability and sex-sorting parameters of ram semen. In : *Livestock Science*, vol. 110, n° 1-2, p. 166–173.
- Griga, M. C. (2008) Untersuchungen zur Verbesserung der Technologie der Gefrierkonservierung von Bullensperma. In : *Freie Universität Berlin, Vet. Med. Dissertation*.
- Guthrie, H. D.; Welch, G. R.; Long, J. A. (2008) Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. In : *Theriogenology*, vol. 70, n° 8, p. 1209–1215.
- Hall, J. C.; Hadley, J.; Doman, T. (1991) Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. In : *Journal of andrology*, vol. 12, n° 1, p. 76–87.
- Harris, M. A.; Baumgard, L. H.; Arns, M. J.; Webel, S. K. (2005) Stallion spermatozoa membrane phospholipid dynamics following dietary n-3 Supplementierung. In : *Animal Reproduction Science*, vol. 89, n° 1-4, p. 234–237.
- Horn, F.; Moc, I. (2012): Aufbau der Plasmamembran.
- Horn, F.; Moc, I. (2012) Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 5^e édition. Stuttgart : Thieme. S. 436-438.
- Hu, J.-H.; Tian, W.-Q.; Zhao, X.-L.; Zan, L.-S.; Wang, H.; Li, Q.-W.; Xin, Y.-P. (2010) The cryoprotective effects of ascorbic acid Supplementierung on bovine semen quality. In : *Animal Reproduction Science*, vol. 121, n° 1-2, p. 72–77.
- Hu, J.-H.; Tian, W.-Q.; Zhao, X.-L.; Zan, L.-S.; Xin, Y.-P.; Li, Q.-W. (2011) The Cryoprotective Effects of Vitamin B12 Supplementierung on Bovine Semen Quality. In : *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 46, n° 1, p. 66–73.
- Jafaroghli, M.; Abdi-Benemar, H.; Zamiri, M. J.; Khalili, B.; Farshad, A.; Shadparvar, A. A. (2014) Effects of dietary n-3 fatty acids and vitamin C on semen

characteristics, lipid composition of sperm and blood metabolites in fat-tailed Moghani rams. In : *Animal Reproduction Science*, vol. 147, n° 1-2, p. 17–24.

Jain, Y. C.; Anand, S. R. (1976) Fatty acids and fatty aldehydes of buffalo seminal plasma and sperm lipid. In : *Journal of reproduction and fertility*, vol. 47, n° 2, p. 261–267.

Jan, S.; Guillou, H.; D'Andrea, S.; Daval, S.; Bouriel, M.; Rioux, V.; Legrand, P. (2004) Myristic acid increases delta6-desaturase activity in cultured rat hepatocytes. In : *Reproduction, nutrition, development*, vol. 44, n° 2, p. 131–140.

Jilg, T.; Aiple, A. P.; Steingass, M. (1988) Fettstoffwechsel und Wirkungen von Futterfetten beim Wiederkäuer. In : *Übers. Tierern.* 16, 109-152, vol. 1988.

John Morris, G.; Acton, E.; Murray, B. J.; Fonseca, F. (2012) Freezing injury: The special case of the sperm cell. In : *Cryobiology*, vol. 64, n° 2, p. 71–80.

Kadirvel, G.; Kumar, S.; Kumaresan, A. (2009) Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. In : *Animal Reproduction Science*, vol. 114, n° 1-3, p. 125–134.

Kasimanickam, R.; Nebel, R. L.; Peeler, I. D.; Silvia, W. L.; Wolf, K. T.; McAllister, A. J.; Cassell, B. G. (2006) Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. In : *Theriogenology*, vol. 66, n° 5, p. 1307–1315.

Kasimanickam, R.; Kasimanickam, V.; Thatcher, C. D.; Nebel, R. L.; Cassell, B. G. (2007) Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. In : *Theriogenology*, vol. 67, n° 5, p. 1004–1012.

Kastelic, J. P. (2014) Understanding and evaluating bovine testes. In : *Theriogenology*, vol. 81, n° 1, p. 18–23.

Kelso, K. A.; Redpath, A.; Noble, R. C.; Speake, B. K. (1997)a Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. In : *Journal of reproduction and fertility*, vol. 109, n° 1, p. 1–6.

Kelso, K. A.; Cerolini, S.; Speake, B. K.; Cavalchini, L. G.; Noble, R. C. (1997)b Effects of dietary Supplementierung with alpha-linolenic acid on the phospholipid fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 weeks of age. In : *Journal of reproduction and fertility*, vol. 110, n° 1, p. 53–59.

Klinc, P.; Rath, D. (2007) Reduction of Oxidative Stress in Bovine Spermatozoa During Flow Cytometric Sorting. In : *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 42, n° 1, p. 63–67.

Kumaresan, A.; Kadirvel, G.; Bujarbaruah, K. M.; Bardoloi, R. K.; Das, A.; Kumar, S.; Naskar, S. (2009) Preservation of boar semen at 18°C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. In : *Animal Reproduction Science*, vol. 110, n° 1-2, p. 162–171.

Leekumjorn, S.; Wu, Y.; Sum, A. K.; Chan, C. (2008) Experimental and Computational Studies Investigating Trehalose Protection of HepG2 Cells from Palmitate-Induced Toxicity. In : *Biophysical Journal*, vol. 94, n° 7, p. 2869–2883.

Legrand, P.; Rioux, V. (2010) The Complex and Important Cellular and Metabolic Functions of Saturated Fatty Acids. In : *Lipids*, vol. 45, n° 10, p. 941–946.

Legrand, P.; Beauchamp, E.; Catheline, D.; Pédrone, F.; Rioux, V. (2010) Short Chain Saturated Fatty Acids Decrease Circulating Cholesterol and Increase Tissue PUFA Content in the Rat. In : *Lipids*, vol. 45, n° 11, p. 975–986.

Lenzi, A.; Picardo, M.; Gandini, L.; Dondero, F. (1996) Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm

function to possible scavenger therapy. In : Human reproduction update, vol. 2, n° 3, p. 246–256.

Macías García, B.; González Fernández, L.; Ortega Ferrusola, C.; Salazar-Sandoval, C.; Morillo Rodríguez, A.; Rodríguez Martínez, H. (2011)a Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation. In : Reproduction in Domestic Animals, vol. 46, n° 1, p. 141–148.

Macías García, B.; González Fernández, L.; Ortega Ferrusola, C.; Morillo Rodríguez, A.; Gallardo Bolaños, J.M; Rodríguez Martínez, H. (2011)b Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. In : Theriogenology, vol. 75, n° 5, p. 811–818.

Maldjian, A.; Pizzi, F.; Gliozzi, T.; Cerolini, S.; Penny, P.; Noble, R. (2005) Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. In : Theriogenology, vol. 63, n° 2, p. 411–421.

Malmgren, L. (1997) Assessing the quality of raw semen: a review. In : Theriogenology, vol. 48, n° 4, p. 523–530.

Martínez-Soto, J. C.; Landeras, J.; Gadea, J. (2013) Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. In : Andrology, vol. 1, n° 3, p. 365–375.

Melville, D. F.; Johnston, S. D.; Miller, R. R. (2012) Flying-fox (*Pteropus* spp.) sperm membrane fatty acid composition, its relationship to cold shock injury and implications for cryopreservation success. In : Cryobiology, vol. 65, n° 3, p. 224–229.

Miller, R. R.; Cornett, C. L.; Waterhouse, K. E.; Farstad, W. (2005) Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (*Vulpes vulpes*) and blue (*Alopex lagopus*) foxes, and their relationship to cell cryopreservation. In : Cryobiology, vol. 51, n° 1, p. 66–75.

Miller, R. R.; Sheffer, C. J.; Cornett, C. L.; McClean, R.; MacCallum, C.; Johnston, S. D. (2004) Sperm membrane fatty acid composition in the Eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and common wombat (*Vombatus ursinus*) and its relationship to cold shock injury and cryopreservation success. In : Cryobiology, vol. 49, n° 2, p. 137–148.

Mitre, R.; Cheminade, C.; Allaume, P.; Legrand, P.; Legrand, A. B. (2004) Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm. In : Theriogenology, vol. 62, n° 8, p. 1557–1566.

Moallem, U.; Neta, N.; Zeron, Y.; Zachut, M.; Roth, Z. (2015) Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. In : Theriogenology, vol. 83, n° 7, p. 1110–1120.

Mourvaki, E.; Cardinali, R.; Dal Bosco, A.; Corazzi, L.; Castellini, C. (2010) Effects of flaxseed dietary Supplementierung on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. In : Theriogenology, vol. 73, n° 5, p. 629–637.

Mudron, P. (1994) Vitamin E-Status bei Kühen mit linksseitiger Labmagenverlagerung und Fettleber. In : Tierärztliche Hochschule Hannover, Vet. Med. Dissertation.

Nair, S. J.; Brar, A. S.; Ahuja, C. S.; Sangha, S. P. S.; Chaudhary, K. C. (2006) A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. In : Animal Reproduction Science, vol. 96, n° 1-2, p. 21–29.

- Nasiri, A. H.; Towhidi, A.; Zeinoaldini, S. (2012) Combined effect of DHA and α -tocopherol Supplementierung during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. In : *Andrologia*, vol. 44, p. 550–555.
- Neild, D. M.; Brouwers, J. F. H. M.; Colenbrander, B.; Agüero, A.; Gadella, B. M. (2005) Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. In : *Molecular Reproduction and Development*, vol. 72, n° 2, p. 230–238.
- Pace, M. M.; Sullivan, J. J.; Elliott, F. I.; Graham, E. F.; Coulter, G. H. (1981) Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 5-ml french straws. In : *Journal of Animal Science*, vol. 53, n° 3, p. 693–701.
- Parks, J. E.; Lynch, D. V. (1992) Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. In : *Cryobiology*, vol. 29, n° 2, p. 255–266.
- Paulenz, H.; Taugbol, O.; Hofmo, P. O.; Saarem, K. (1995) A preliminary study on the effect of dietary Supplementierung with cod liver oil on the polyunsaturated fatty acid composition of boar semen. In : *Veterinary research communications*, vol. 19, n° 4, p. 273–284.
- Poulos, A.; Voglmayr, J. K.; White, I. G. (1973)a Phospholipid changes in spermatozoa during passage through the genital tract of the bull. In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, vol. 306, n° 2, p. 194–202.
- Poulos, A.; Darin-Bennett, A.; White, I. G. (1973)b The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. In : *Comparative biochemistry and physiology*, vol. 46, n° 3, p. 541–549.
- Rooke, J. A.; Shao, C. C.; Speake, B. K. (2001) Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. In : *Reproduction (Cambridge, England)*, vol. 121, n° 2, p. 315–322.
- Rovan, E. (2001): *Biochemie der Spermatozoa*.
- Busch, W.; Holzmann, A. (2001) *Veterinärmedizinische Andrologie. Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren*. Stuttgart : Schattauer. S. 23-54.
- Samadian, F.; Towhidi, A.; Rezayazdi, K.; Bahreini, M. (2010) Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. In : *animal*, vol. 4, n° 12, p. 2017–2022.
- Sargent, J. R. (1997) Fish oils and human diet. In : *The British journal of nutrition*, 78 Suppl 1, p. S5-13.
- Schmid-Lausigk, Y.; Aurich, C. (2014) Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. In : *Theriogenology*, vol. 81, n° 7, p. 966–973.
- Schröder, A. Pieper, B.; Lickfett, J. (2000) Einsatz von pansengeschütztem Fett bei Hochleistungskühen aus der Sicht der Beratung. : *Handbuch der tierischen Veredlung (Sonderdruck)*, 407-418.
- Selley, M. L.; Lacey, M. J.; Bartlett, M. R.; Copeland, C. M.; Ardlie, N. G. (1991) Content of significant amounts of a cytotoxic end-product of lipid peroxidation in human semen. In : *Journal of reproduction and fertility*, vol. 92, n° 2, p. 291–298.
- Selvaraju, S.; Raju, P.; Rao, S. B. N.; Raghavendra, S.; Nandi, S.; Dineshkumar, D. (2012) Evaluation of maize grain and polyunsaturated fatty acid (PUFA) as energy sources for breeding rams based on hormonal, sperm functional parameters and fertility. In : *Reproduction, fertility, and development*, vol. 24, n° 5, p. 669–678.
- Shannon, P.; Vishwanath, R. (1995) The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a

theoretical model to explain the fertility differences. In : *Animal reproduction science*, vol. 39, n° 1, p. 1–10.

Sikka, S. C.; Rajasekaran, M.; Hellstrom, W. J. (1995) Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. In : *Journal of andrology*, vol. 16, n° 6, p. 464–468.

Sinowatz, F. (2000): *Aufbau der Zellmembran*.

Sinowatz, F.; Hees, H. (2000) *Histologie. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. 3^e édition. Köln : Deutscher Ärzte-Verlag. S. 58-61.

Snoj, T.; Kobal, S.; Majdic, G. (2013) Effects of season, age, and breed on semen characteristics in different *Bos taurus* breeds in a 31-year retrospective study. In : *Theriogenology*, vol. 79, n° 5, p. 847–852.

Soares, M. P.; Brandelli, A.; Celeghini, E. C. C.; Arruda, R. P. de; Rodriguez, S. A. F. (2013) Effect of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 isomers of conjugated linoleic acid on the integrity and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa. In : *Cryobiology*, vol. 67, n° 1, p. 102–105.

Strzezek, J.; Fraser, L.; Kuklinska, M.; Dziekonska, A.; Lecewicz, M. (2004) Effects of dietary Supplementierung with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. In : *Reproductive biology*, vol. 4, n° 3, p. 271–287.

Stubbs, C. D.; Smith, A. D. (1984) The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. In : *Biochimica et biophysica acta*, vol. 779, n° 1, p. 89–137.

Surai, P. F.; Noble, R. C.; Sparks, N. H.; Speake, B. K. (2000)a Effect of long-term Supplementierung with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. In : *Journal of reproduction and fertility*, vol. 120, n° 2, p. 257–264.

Surai, P. F.; Brillard, J.-P.; Speake, B. K.; Blesbois, E.; Seigneurin, F.; Sparks, N. H. C. (2000)b Phospholipid fatty acid composition, vitamin e content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. In : *Theriogenology*, vol. 53, n° 5, p. 1025–1039.

Swain, J. E.; Miller, R. R. (2000) A postcryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa. In : *Zoo Biology*, vol. 19, p. 461–473.

Takahashi, T.; Itoh, R.; Nishinomiya, H.; Katoh, M.; Manabe, N. (2012) Effect of Linoleic Acid Albumin in a Dilution Solution and Long-term Equilibration for Freezing of Bovine Spermatozoa with Poor Freezability. In : *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 47, n° 1, p. 92–97.

Taşdemir, U.; Büyükleblebici, S.; Tuncer, P. B.; Coşkun, E.; Özgürtaş, T.; Aydın, F. N. (2013) Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. In : *Cryobiology*, vol. 66, n° 1, p. 38–42.

Towhidi, A.; Parks, J. E. (2012) Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. In : *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, vol. 29, n° 10, p. 1051–1056.

Vera-Munoz, O.; Amirat-Briand, L.; Diaz, T.; Vásquez, L.; Schmidt, E.; Desherces, S. (2009) Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl® and Bioxcell®. In : *Theriogenology*, vol. 71, n° 6, p. 895–900.

Vishwanath, R.; Shannon, P. (2000) Storage of bovine semen in liquid and frozen state. In : *Animal reproduction science*, vol. 62, n° 1-3, p. 23–53.

Waterhouse, K. E. (2006) Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. In : *Reproduction*, vol. 131, n° 5, p. 887–894.

- White, I. G. (1993) Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. In : *Reproduction, fertility, and development*, vol. 5, n° 6, p. 639–658.
- Whitfield, C. H.; Parkinson, T. J. (1995) Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). In : *Theriogenology*, vol. 44, n° 3, p. 413–422.
- Wishart, G. J. (1984) Effects of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm motility, ATP content and fertilizing ability. In : *Journal of reproduction and fertility*, vol. 71, n° 1, p. 113–118.
- Zaniboni, L.; Rizzi, R.; Cerolini, S. (2006) Combined effect of DHA and α -tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. In : *Theriogenology*, vol. 65, n° 9, p. 1813–1827.

Danksagung

Herrn Professor Dr. Heiner Bollwein danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für die freundliche Betreuung, die immer fortdauernd gewährte Unterstützung und den motivierenden Zuspruch bei der Durchführung der Versuche und beim Verfassen dieser Arbeit. Danke für das Vertrauen in meine Person.

Vielen Dank an den Besamungsverein Neustadt Aisch (BVN), Neustadt a. d. Aisch, für die grosszügige Überlassung der Versuchsbullen und die tatkräftige Unterstützung durch die Mitarbeiter bei der Durchführung des praktischen Teils der Arbeit. Hier gilt mein Dank besonders Frau Göbel, Dr. Matthias Lautner und Dr. Claus Leiding.

Dem IFN Schönow gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Probenuntersuchung und bei fachlichen Fragen, v.a. den beiden lieben Karins sowie Lutz, ebenso wie der UZH und hier insbesondere Matthias Siuda. Der lieben Frau Schneider, die mir schwer zugängliche Literatur fast rund um die Uhr lieferte, sei an dieser Stelle ebenfalls von Herzen gedankt.

Meinem Arbeitgeber dem Landesverband Thüringer Rinderzüchter e.G. (LTR), Erfurt insbesondere Herrn Bialek herzlichen Dank für die Möglichkeit, die Unterstützung und das Verständnis für die Anfertigung der Dissertation neben meiner Anstellung.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Dr. Erhard Gernand für die statistische Auswertung und ihre Geduld mir statische Grundlagen zu erklären bedanken.

Dem lieben Hermann, Erwin und Christoph ein extragrosses DANKE. Ohne Euch wäre ich nicht Landwirt und Tierarzt geworden und der Mensch, der ich heute bin.

Ich möchte mich besonders bei meiner Familie bedanken, wobei ich hier meine Mama und Karl hervorheben will. Liebe Mama, lieber Karl, vielen Dank, dass ihr mich stets unterstützt habt und vor allem dafür, dass ihr mit so viel Liebe meinen Lebensweg begleitet.

Last not least: Danke schön, liebe Birgit, dass Du immer für mich da warst und bist, immer an mich geglaubt hast und mich trotz all meiner Extravaganzen immer unterstützt hast. Grosse Schlappi, ich liebe Dich!

Danke, Papa, ohne Dich wäre ich nicht Markus Gropper. Danke für Dein Vorbild. Dir allein widme ich diese Arbeit. Du fehlst.

9 Anhang

9.1 Futtermittelzusammensetzung

9.1.1 ALIkon® Omega-3

(pansenstabiles, kristallines, pflanzliches Fett mit essentiellen Omega-3-Fettsäuren)
(Erbo Spraytec AG, Bützberg, Schweiz)

Analytische Bestandteile und Gehalte:

Rohfett 100 %

Wasser 0.5 % (maximal)

Zusatzstoffe:

Antioxidantien (Butylhydroxytoluol, Propylgallat)

Zusammensetzung:

Pflanzliche Fette und Öle 100%

Fettsäurezusammensetzung:

C 12:0: 0 – 1 %

C 14:0: 0 – 1 %

C 16:0: 8 – 12 %

C 18:0: 45 – 65 %

C 18:1: 11 – 17 %

C 18:2: 2 – 4 %

C 18:3 (Omega-3): 11–13 %

C 20:0: 0 – 1 %

Die hohe Pansenstabilität (laut Hersteller >95 %) wird durch eine Mikroverkapselung der Omega-3 Fettsäuren in pansenstabilem Fett erreicht. Dazu wird Omega-3-Fettsäure-reiches Leinöl mit einem Fett (gehärtetem Rapsöl) mit hohem Schmelzpunkt (wichtig für Pansenstabilität) vermischt. Durch eine anschliessende Sprühkristallisation des Fettes ("Pulverisierung" des vorher flüssigen Ölgemischs) werden

die Omega-3-Fettsäuren fein verteilt in der nun erstarrten Matrix eingekapselt. Die einzelnen Fettpartikel sind aufgrund ihrer mikrokristallinen Triglyceridform und dem hohen Schmelzpunkt (54-58°C) pansenstabil. Bei der Verdauung der Fettpartikel im Dünndarm durch Lipasen und Gallensäuren werden die Omega-3-Fettsäuren kontinuierlich freigesetzt und können in den Stoffwechsel aufgenommen werden (persönliche Mitteilung Pierrette Meyer, Erbo Spraytec AG).

9.1.2 LactoPlus-FA (pansenstabilisiertes Fettpulver)

(Bewital GmbH & Co. KG, Südlohn-Oeding, Deutschland)

Analytische Bestandteile und Gehalte:

Rohfett 99.0 %

Zusatzstoffe (technologisch):

Kieselsäure (E 551a)

Zusammensetzung:

Palmölfettsäure, gehärtet

Pflanzenfett (Palmöl, gehärtet)

Fettsäurezusammensetzung:

C 12:0:	1 %
C 14:0:	2 %
C 16:0:	51 %
C 18:0:	43 %
C 18:1:	3 %

9.1.3 Milchleistungsfutter II „I AM 163“

(DEWA-Kraftfutterwerk, Emskirchen, Deutschland), zu Grundfutter mit hohem Eiweissüberschuss

Analytische Bestandteile und Gehalte:

Rohprotein:	16 %
Rohfett:	2.5 %
Rohfaser:	8.3 %
Rohasche:	7.0 %
Calcium:	0.90 %
Phosphor:	0.60 %
Natrium:	0.20 %
Magnesium:	0.22 %
NEL/kg:	6.50 MJ

Zusatzstoffe:

Vitamin A aus Vitamin A (E672)	10000 I.E.
Vitamin D aus Vitamin D ₃ (E671)	1000 I.E.

Zusammensetzung:

Malzkeime:	14.1 %
Mais:	25 %
Weizenfuttermehl:	13 %
Gerste:	3.5 %
Weizenkleie:	17 %
Maiskleberfutter:	15 %
Zuckerrübenmelasse:	3.5 %
Calciumcarbonat:	2.9 %
Rapsextraktionsschrot:	5 %
Mineralstoffergänzung:	1 %

9.1.4 Bullenmineral Besamungsstation BVN NEA

(Höveler Spezialfutterwerke GmbH & Co KG, Dormagen)

Analytische Bestandteile und Gehalte:

Calcium:	16.0 %
Phosphor:	9.1 %
Natrium:	6.0 %
Magnesium:	5.9%

Zusatzstoffe je kg:

Vitamin A (E672):	1.000.000 I.E.
Vitamin D (Vitamin D ₃ E671):	100.000 I.E.
Vitamin E (3a700):	5000 mg
Vitamin K ₃ :	80 mg
Vitamin B ₁ :	80 mg
Vitamin B ₂ :	120 mg
Vitamin B ₆ (3a831):	100 mg
Vitamin B ₁₂	1000 µg
Nikotinsäure:	625 mg
Folsäure:	15 mg
Pantothensäure:	270 mg
Biotin:	200000 µg
Jod:	117 mg (als Calciumjodat, wasserfrei E2)
Kupfer:	2042 mg (als Kupfer-(II)-sulfat, Pentahydrat E4)
Mangan:	6500 mg (als Mangan-(II)-oxid E5)
Zink:	16525 mg (als Zinkoxid E6)
Selen:	46 mg (als Natriumselenit E8)

Zusammensetzung:

Monocalciumphosphat:	39.5 %
Calciumcarbonat:	21.5 %
Natriumchlorid:	15.7 %
Magnesiumoxid:	11.7 %
Zuckerrübenmelasse:	3.5 %

9.1.5 Blattisan Vitamin E 65

(Höveler Spezialfutterwerke GmbH & Co KG, Dormagen)

Analytische Bestandteile und Gehalte:

Rohprotein:	13.3 %
Rohfett:	3.5 %
Rohfaser:	2.1 %
Rohasche:	13.9 %
Calcium:	0.3 %
Phosphor:	0.5 %
Natrium:	3.8 %
Magnesium:	0.2 %
Lysin:	0.5 %
Threonin:	0.5 %
Tryptophan:	0.2 %

Zusatzstoffe je kg:

Vitamin E:	65000mg
Selen:	40 mg (als Natriumselenit E8)

Zusammensetzung:

Weizennachmehl:	76.2 %
Natriumchlorid:	10 %

9.2 Geräte und Chemikalien zur Beurteilung der Motilität und Morphologie

- Durchlichtmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung und Kreuztisch
- Phasenkontrastmikroskop mit Heiztisch
- Mikroliterpipette 10 – 100 µl mit entsprechenden Pipettenspitzen
- Mikropipette 0 – 20 µl und entsprechende Pipettenspitzen
- Reaktionsgefäße: 10 ml Reagenzgläser bzw. 1.5 ml Eppendorf-Tubes
- Wasserbad
- Thermoblock

- Wärmeplatte
- Objektträger gemäss ISO 8073, 76 x 26 mm
- Deckgläser gemäss DIN 58884, 18 x 18 mm
- Glasstäbe
- Dispenser
- phosphatgepufferte NaCl-Lösung
- Formalin
- Immersionsöl

9.3 Herstellung der Reagenzien

9.3.1 Phosphatgepufferte NaCl – Lösung pH 7.0 (pNaCl)

- isotoner Phosphatpuffer pH 7.0
- Stammlösungen: A) 0.5 M Na₂HPO₄
B) 0.5 M NaH₂PO₄

16.1 ml Lösung A + 8.9 ml Lösung B mit H₂O ad 100 ml aufgefüllt

- Phosphatgepufferte NaCl – Lösung

Isotoner Phosphatpuffer + 0.9 %-iger NaCl-Lösung (Verdünnung 1:3)

9.3.2 Fixierlösung

- 1 ml Formalin zu 99 ml pNaCl (1 % Formol-pNaCl)

Die Spermaproben werden mit Formol-pNaCl auf eine Konzentration von 50 bis 100 x 10⁶ Spermien/ml verdünnt.

Für konserviertes Sperma kommt für das Rind ein Verdünnungsverhältnis von 1:5 zur Anwendung. Die Verdünnung erfolgt bei Raumtemperatur in 1.5 ml Reaktionsgefässen. Die Reaktionsgefässe werden mittels Dispenser mit 500 µl Formol-pNaCl befüllt. Nach guter Durchmischung der nativen bzw. verdünnten Spermaprobe wird die entsprechende Spermamenge dazu pipettiert.

9.4 Geräte und Chemikalien sowie Definition und Klassifizierung der Spermien und Subpopulationen am „Sperm vision“

- Phasenkontrastmikroskop mit Heiztisch
- Kamera
- Dongel
- Mikroliterpipette 0.1 – 10 µl mit entsprechenden Pipettenspitzen
- Reagenzgläser 10 ml
- Reaktionsgefäße (1.5 ml Eppendorf-Tubes)
- Wasserbad
- Wärmeplatte
- Thermoblock
- Leja-Kammern®

Die Definition und damit die Identifikation einer Spermienzelle geschehen über zwei Flächenparameter (Tab. 9.4), letztlich über die Objektgröße.

Die Software „Sperm vision“ klassifiziert die Spermien in drei Hauptkategorien (Abbildung 9.4). Davon werden nur die non-motilen Zellen und die lokal motilen Zellen explizit definiert (Tab. 9.4.). Alle Zellen, die sich schneller als die lokal motilen bewegen, sind automatisch progressiv motile Spermien. Die Klasse „Motile“

besitzt ebenfalls keine eigene Definition, sondern ist die Summe aus lokal motilen Zellen und progressiv motilen Zellen.

Die 4 Subpopulationen können wahlweise als Untergruppen der motilen Zellen oder progressiven Zellen definiert werden. Als Voreinstellung ist die Zuordnung zu den progressiv motilen Zellen gesetzt.

Der Nutzer hat die Möglichkeit, zusätzlich drei Subpopulationen selbst zu definieren. Bei der vorliegenden Studie wurden nur Spermien mit DSL (distance straight-line)-Werten von mindestens 4.5 µm als progressiv motil bezeichnet.

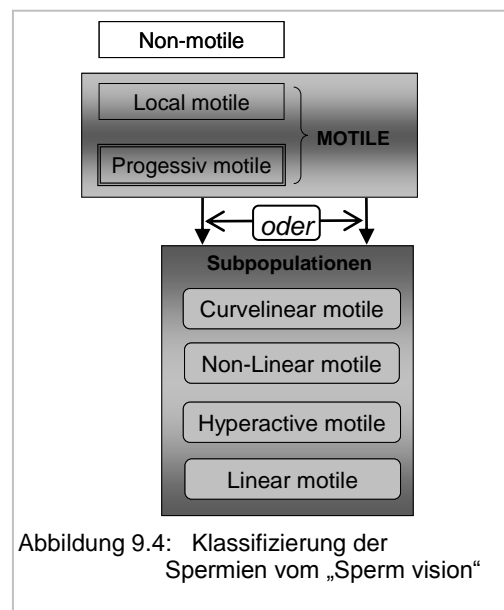


Abbildung 9.4: Klassifizierung der Spermien vom „Sperm vision“

Tab. 9.4: Definition der Spermien und Subpopulationen für die CMA „Sperm vision“ (FA. MINITÜB)

Gattung	Cell Identification		Level 1 Classifikation		Level 2 Classifikation			
	Area	µm ²	Non-motile	Local motile	Hyperactive	Linear	Non-Linear	Curvilinear
Bulle	25	60	AOC<5.0	DSL<4.5	VCL>80 und LIN<0.65 und ALH>6.5	STR>0.5 und LIN>0.35	STR<0.5 und LIN<0.35	DAP/ Radius>=3 und LIN<0.5

DCL – Distance: Curve Line (microns)

DAP – Distance: Average Path (microns)

DSL – Distance: Straight Line (microns)

VCL – Velocity: Curve Line (microns per second)

VAP – Velocity: Average Path (microns per second)

VSL – Velocity: Straight Line (microns per second)

LIN – Linearity = VSL / VCL

STR – Straightness = VSL / VAP

WOB – Wobble = VAP / VCL

BCF – Beat Cross Frequency (Hertz)

ALH – Amplitude of Lateral Head Displacement (microns)

AOC – Average Orientation Change (degrees)

9.5 Medien, Chemikalien und Geräte für die durchflusszytometrischen Versuche

9.5.1 Chemikalien und Fluorochrome

FITC-PNA

- 100 µg/ml Aqua dest. (Sigma-Aldrich, München; Katalog-Nr. L 7381)

Propidiumiodid (PI) 95 – 98 %

- 10 mg/5 ml Aqua dest. (2.99 mM) (Sigma-Aldrich, München; Katalog-Nr. P 4170)

Calcium-Ionophor A23187

- 0.715 mM (Sigma-Aldrich, München; Katalog-Nr. C 7522)
- 1mg in 2.67 ml DMSO gelöst; Aliquot 50µl (=0.715mM)
- Einsatz 3.5 µl / 488.5 µl Probe (= 5 µM)

JC-1

- 0.153 mM
- direkt vor Gebrauch 20 µl Aliquot mit 180 µl DMSO verdünnen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA; Katalog-Nr. T 3168)

Fluorochrome:

C11-Bodipy^{581/591}

- 1000 µM (Morbitec, Göttingen; Katalog-Nr. D 3861)

9.5.2 Tyrode-Medium

(in Anlehnung an ASHWORTH et al. 1995)

- NaCl	5.844 g pro 1000 ml
- KCl	0.231 g pro 1000 ml
- CaCl ₂	0.294 g pro 1000 ml
- MgCl ₂	0.081 g pro 1000 ml
- Na ₂ HPO ₄	0.061 g pro 1000 ml
- Na-Pyruvat	0.110 g pro 1000 ml
- Na-Laktat S	4.04 ml
- HEPES	2.383 g pro 1000 ml
- Penicillin K	0.050 g pro 1000 ml
- PVP	0.500 g pro 1000 ml
- PVA	0.500 g pro 1000 ml
- NaHCO ₃	2.100 g pro 1000 ml

Der pH-Wert war stets auf 7.4 und die Osmolarität auf 320 mOsm eingestellt.

Das Tyrode-Medium wurde bei allen Färbereihen exklusive der Spermachromatinstrukturanalyse (SCSA™) zur Verdünnung des Spermas auf eine Konzentration von $1.2 \times 10^6/\text{ml}$ eingesetzt.

9.5.3 Medien für SCSA™

TNE-Puffer 10 x, pH 7.4

- 0.01 M Tris-HCl 9.48 g (Trizma Base, Sigma-Aldrich, München)
- 0.15 M NaCl 52.60 g
- 1 mM EDTA 2.23 g (Sigma-Aldrich, München)
- Aqua bidest. 600 ml
- mit NaOH auf pH 7.4 einstellen

TNE-Puffer 1x (pH 7.4)

- Aqua bidest. 90 ml
- TNE-Puffer 10x 10 ml

Um die Konzentration des Spermas für die Spermachromatinstrukturanalyse (SCSA™) auf $2 \times 10^6/\text{ml}$ einzustellen, wurde 1x TNE-Puffer verwendet.

Säuredetergenz-Lösung (pH 1.2)

- Aqua bidest 300 ml
- 0.15 M NaCl 4.39 g (Sigma-Aldrich, München)
- 0.1 % Triton-X 0.5 ml (Sigma-Aldrich, München)
- 2.0 N HCl 20 ml
- Aqua bidest. ad 500 ml
- mit 5N HCl auf pH 1.2 einstellen

Lagerung bei 4°C

0.1 M Citric acid Puffer

- Citric acid monohydrate 21.01 g (Sigma-Aldrich, München)
- Aqua bidest. ad 1000 ml

Lagerung bei 4°C

0.2 M Na₂HPO₄-Puffer

- Sodium phosphate dibasic 28.4 g (Sigma-Aldrich, München)
- Aqua bidest. ad 1000 ml

Lagerung bei 4°C

Färbepuffer (pH 6.0)

- 0.1 M Citric acid-Puffer 370 ml
- 0.2 M Na₂HPO₄-Puffer 630 ml
- 1 mM EDTA 372 mg
- 0.15 M NaCl 8.77 g
- mit konzentrierter NaOH auf pH 6.0 einstellen

Lagerung bei 4°C

Akridinorange (AO)-Stammlösung (1 mg/ml)

- Acridine Orange 10 mg (Polysciences, Eppelheim)
- Aqua bidest. 10 ml

Lagerung bei 4°C

Akridinorange-Gebrauchslösung

- Färbepuffer (pH 6) 100 ml
- AO-Stammlösung 600 µl

Lagerung bei 4°C während der Färbung auf Eis

9.5.4 Geräte und Materialien

- stumpfe Pinzette
- Schere
- Eppendorff-Gefäße 1.5 ml (Fa. Sarstedt, Nürmbrecht)
- Wasserbad mit Temperaturregelung (Fa. Lauda, Lauda – Königshofen)
- Thermometer
- Stoppuhr
- Heizblock (Fa. Kleinfeld, Gehrden)
- Eppendorff-Pipetten (1000 µl, 100 µl, 10 µl, 5 µl)

- Pipettenspitzen weiss (10µl) gelb (100 µl) und blau (1000 µl) (Fa. Sarstedt, Nürnbrecht)
- Zentrifuge (Typ Biofuge Fresco, Fa. Heraeus, Hanau)
- Flow-Röhrchen (Fa. Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA)
- Styroporgefäss
- Vortexer (Typ Lab Dancer Orbital Shaker, Fa. IKA®, Staufen)

9.6 Geräte und Chemikalien zur Bestimmung der Totalen Antioxidativen Kapazität

- siehe Beschreibung „Product Manual“
(<http://www.cellbiolabs.com/total-antioxidant-capacity-tac-assay>)