



Praxis

Möglichkeiten der Verbesserung der Beurteilung konservierter Eberspermien - mehr Sicherheit für den Spermakunden

Dr. B. Stähr , Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V.

Die Beurteilung der Spermaqualität in der Besamungseberstation muss gewährleisten, dass den Forderungen der Sauenhalter nach Ebersperma mit uneingeschränkter Befruchtungsfähigkeit in hohem Maße entsprochen wird.

Die komplizierten Vorgänge von der Spermiogenese bis zur Befruchtung nach zwischenzeitlich erfolgter Konservierung des Spermas lassen erkennen, dass eine gesicherte Fertilität-s-prognose sehr schwer erreichbar ist. Das in den Besamungseberstationen angewendete Methodenspektrum, das im wesentlichen die Beurteilung der Spermienmotilität als einen Funktionstest sowie morphologische Merkmale der Spermienzelle benutzt, ist geeignet, mit vertretbarem Aufwand eine entsprechende Sicherheit bei der Selektion der Ejakulate zu geben. Darüber hinaus ist bei konsequenter Anwendung der etablierten Untersuchungsmethoden auch eine Einschätzung des Leistungsvermögens der Besamungseber in begrenztem Umfang erreichbar. Seit geraumer Zeit werden zusätzliche Verfahren zur Bestimmung wichtiger Spermienfunktionen in ihrem Aussagewert für den Befruchtungserfolg geprüft. Solche Spermienfunktionen sind die Kapazitation und Akrosomenreaktion (AR). Sie finden im weiblichen Genitale nach der Insemination statt und spielen für den Befruchtungsvorgang eine wichtige Rolle.

Kapazitation und Akrosomenreaktion (AR) können mit einigem Aufwand auch in vitro ausgelöst werden. Damit ergibt sich die Möglichkeiten den Anteil der Spermien zu ermitteln, die zu einer ungestörten Reaktion fähig sind. Bei einigen landwirtschaftlichen Nutztieren wurden bereits eine Übereinstimmung dieser funktionellen Merkmale zum Befruchtungserfolg nachgewiesen, ein allgemein akzeptierter Standard dieses Tests ist bisher nicht etabliert.

Der erste Schritt zur Untersuchung dieser Funktion an Eberspermien bestand in einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der in vitro kapazitierten und zur Akrosomenreaktion angeregten Spermien. Mit einer Fluoreszenzfärbung mit Hoechst- Farbstoff H 33258 und einer phasenkontrastoptischen Beurteilung des Zustandes des Akrosoms kann man 4 Kategorien Spermien darstellen (Abb. 1).

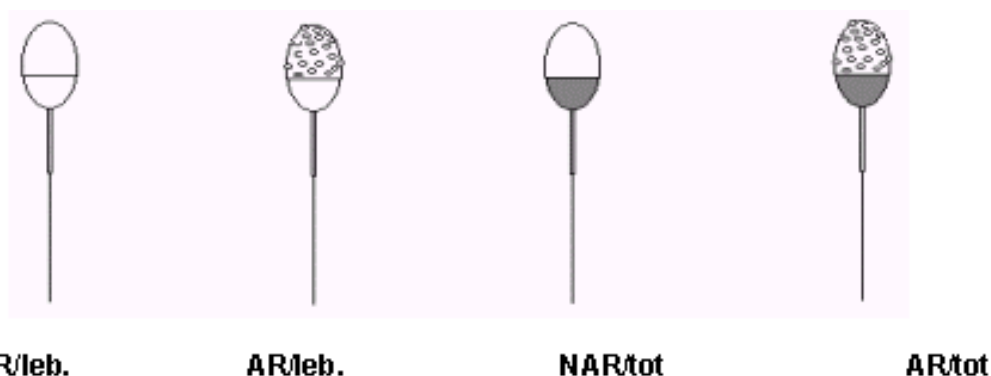


Abbildung 1: Unterscheidung von vier Spermienkategorien mittels Fluoreszenzmikroskopie (Hoechst- Farbstoff H 33258) unter gleichzeitiger Nutzung der Phasenkontrast-Optik

NAR/leb. = ungefärbtes Spermium mit intaktem Akrosom
 ungefärbtes Spermium mit fehlendem akrosomalen Rand
 Spermium mit intaktem Akrosom
 fehlendem akrosomalen Rand

AR/leb. =
 NAR/tot = gefärbtes
 AR/tot = gefärbtes Spermium mit

Eine wiederholte Untersuchung von Ejakulaten der gleichen Eber zeigte eine gute Übereinstimmung der Meßgrößen für den Eber und deutliche Unterschiede zwischen den Ebern (Abb. 2). Als eine sehr wichtige Meßgröße erwies sich dabei die Differenz des Anteils akrosomenreagerter Spermien nach der Kapazitationsbehandlung zum Anteil nach Auslösung der Akrosomenreaktion

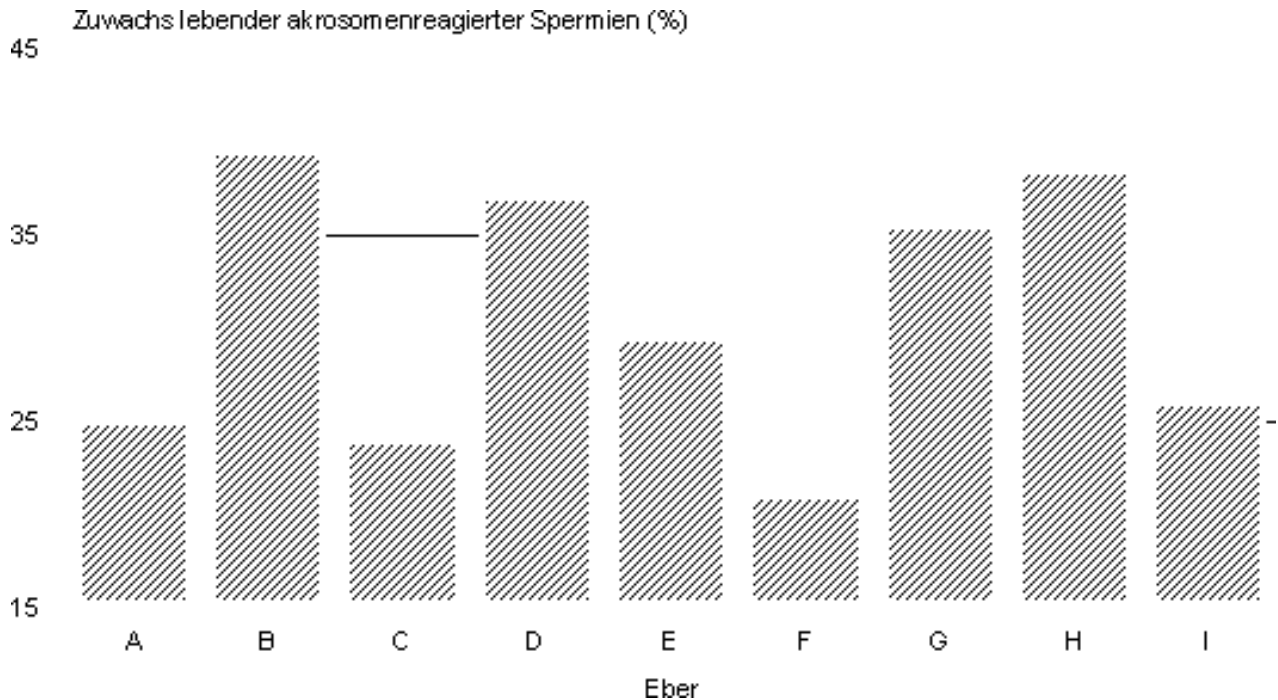


Abbildung 2: In-vitro-Kapazitation und Akrosomenreaktion bei Eberspermien (Medianwerte von 5 Untersuchungen in 14-tägigem Abstand)

Eine Überprüfung des Aussagewertes für diesen Test für den Befruchtungserfolg im Feldversuch brachte sehr interessante Ergebnisse (Tab. 1).

Tabelle 1: Beziehungen zwischen ausgewählten Parametern bei In-vitro-Kapazitation (Medianwerte für Eber) und der Befruchtungsleistung, PEARSON Korrelationskoeffizienten (9 Eber, 30 Ejakulate und 592 Erstbesamungen)

Fruchtbarkeitsparameter	Akrosomenreaktion nach Ionophor		Differenz AR nach Ionophor und nach Heparin	
	nach Ejakulaten	nach Ebern	nach Ejakulaten	nach Ebern
Abferkelrate (%)	0.0663	<u>0.3415</u>	0.0252	<u>0.4883</u>
Insgesamt geborene Ferkel / Wurf	-0.0615	0.1032	0.0174	0.2290
Insgesamt geborene Ferkel / 100 Erstbesamungen	0.0105	<u>0.2912</u>	0.0175	<u>0.4428</u>

In einer weiteren Versuchsreihe konnten mit 1 bis 3 Ejakulaten und 197 Erstbesamungen von 26 Ebern die Ergebnisse

mit signifikanten Korrelationen zwischen der Abferkelrate und der AR nach Ionophor ($r = 0,426$) bestätigt werden.

Alle Untersuchungen konnten mit Erfolg an konserviertem Ebersperma durchgeführt werden, was erst die Möglichkeit eröffnet, diesen Test in einem zentralen Labor zu realisieren. Vergleichsuntersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Konservierung zeigten hohe Beziehungen der konservierten zu den tagesfrischen Spermien.

Eine neue Qualität bei solchen Untersuchungen stellt die Nutzung der Flowzytometrie dar. Im Flowzytometer werden die Spermien in einem Hüllstrom durch eine feine Kapillare gesaugt. Akrosomenzustand und Lebensfähigkeit der Spermienzellen können durch geeignete Fluoreszenzfarbstoffe charakterisiert werden. Nach Anregung durch einen Laser können verschiedenfarbige Fluoreszenzen detektiert werden.

Für die Untersuchung von Ebersperma wurden zwei verschiedene Farbstoffe, von denen einer den Membranzustand und damit die Lebensfähigkeit der Zellen (rot fluoreszierend) und ein weiterer den Akrosomzustand charakterisiert (grün fluoreszierend).

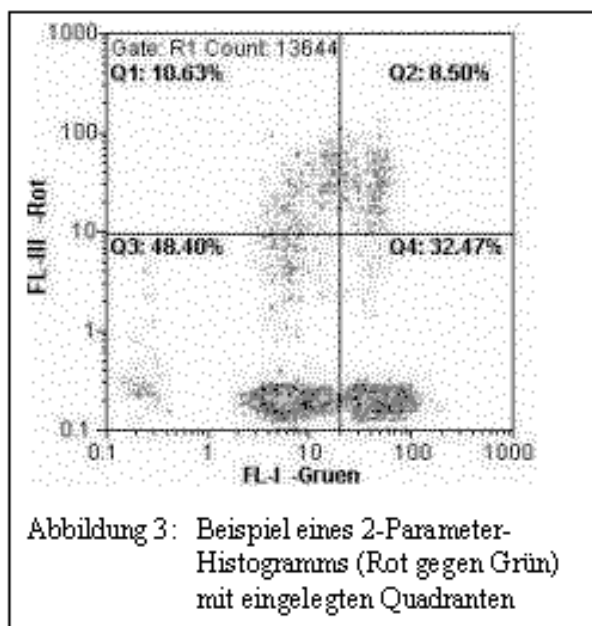
Damit ergeben sich wiederum 4 Kategorien Spermien:

- A: nicht akrosomreagiert/lebend (keine Fluoreszenz)
- B: nicht akrosomreagiert/tot (nur rote Fluoreszenz)
- C: akrosomreagiert/lebend (nur grüne Fluoreszenz)
- D: akrosomreagiert/tot (rote und grüne Fluoreszenz).

Diese unterschiedlich fluoreszierenden Spermien können in einem 2-Parameter-Histogramm (Abb. 3) sichtbar gemacht und in den einzelnen Kategorien gezählt werden. Es werden etwa 15.000 Zellen je Messung ausgewertet.

Mit Unterstützung der Schweinebesamung Weser-Ems e. V. konnten im vergangenen Jahr mit dieser Methode 215 Ejakulate von 23 Ebern untersucht und 1.565 Erstbesamungen aus diesen Ejakulaten ausgewertet werden.

Eine Darstellung der schon erwähnten Maßzahl „Differenz zwischen den Anteilen lebender Spermien mit Akrosomenreaktion nach der Kapazitationsbehandlung und nach der Stimulierung mit Ca-Ionophor (Zuwachs AR/lebend Io.)“ für die untersuchten Eber zeigte signifikante Differenzen zwischen den zwei „besten“ und den zwei „schlechtesten“ Ebern (Abb. 4).



Die Befruchtungsergebnisse aus allen Ejakulaten wiesen ein außerordentlich hohes Niveau bei nur geringer Varianz zwischen den Ebern auf (Abferkelrate: 87,2%, Wurfgröße: 12,6 insgesamt geborene Ferkel). Korrelationsberechnungen führten folgerichtig auch bisher zu keinem Ergebnis. Dabei ist zu berücksichtigen, daß mit Spermienzahlen je Dosis zwischen 2 und 4,5 x 10⁹ Spermien, Voraussetzungen bestanden, in jedem Falle eine ausreichende Anzahl kapazitationsfähiger Spermien zu inseminieren. Damit können Unterschiede, die sich in vitro zeigen, nicht im Befruchtungsergebnis manifest werden.

Selbst die Eber mit den geringeren Werten beim Merkmal „Zuwachs AR/lebend Io.“ zeigten noch gute Befruchtungsleistungen.

Abbildung 3: Beispiel eines 2-Parameter-Histogramms (Rot gegen Grün) mit eingelegten Quadranten

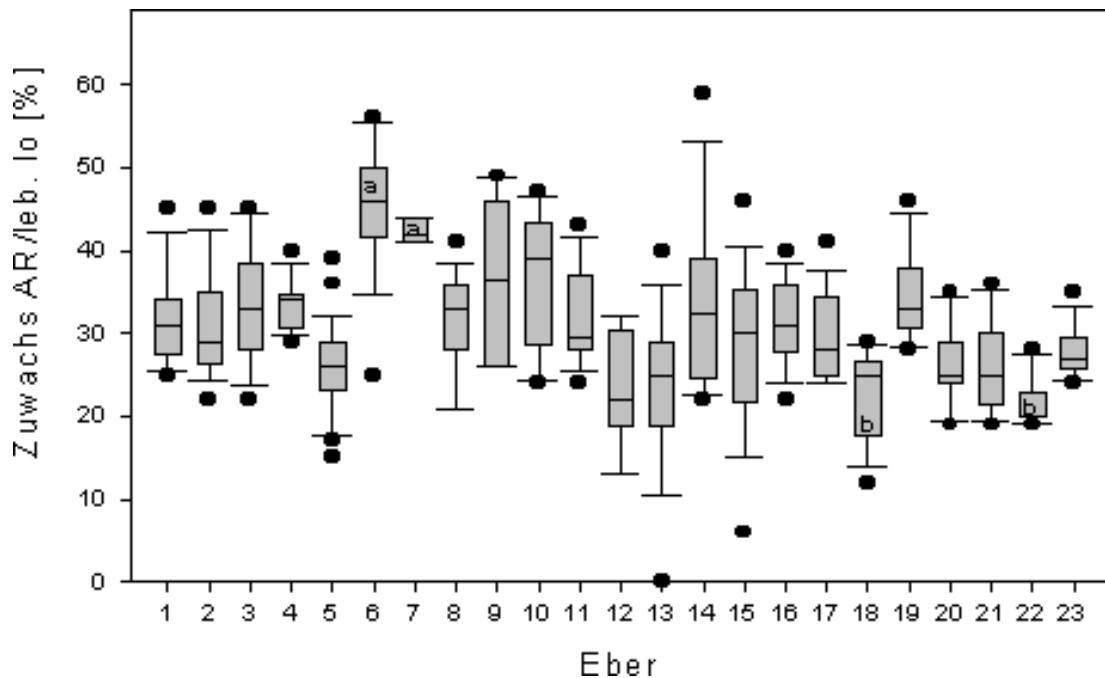


Abbildung 4: Zuwachs der Anteile der lebenden Spermien mit AR nach Ionophor (Medianwerte, Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben = signifikante Unterschiede, $p < 0,05$)

Damit ist zur Zeit der Wert der Untersuchungen zur Stimulierbarkeit der Kapazitation und Akrosomreaktion für eine Fertilitätsprognose mit dem bisher vorliegenden Material noch nicht endgültig zu beantworten. Die Arbeiten werden also mit Besamungsversuchen mit geringeren Spermienzahlen fortgesetzt, um eine klare Aussage zu ermöglichen.

Die Zielstellung der weiteren Arbeiten und damit der Nutzen für die Besamungspraxis lassen sich in folgendem zusammenfassen:

- Möglichkeit der möglichst frühen Prognose von Befruchtungsleistungen der Besamungseber und damit eine wirksame Unterstützung der Selektion der Besamungseber
- Möglichkeit der Qualitätsüberwachung des Eberspermas in allen Situationen in der Spermaproduktion.
- Erfassung einer wesentlichen Funktion der Spermienzelle im Verlaufe der Konservierung und damit ein Beitrag zur sicheren Anwendung konservierten Spermas

Das ist insgesamt ein Schritt zu einer noch höheren Sicherheit beim Anwender. Die Zusammenarbeit zwischen der Besamungseberstation der Schweinebesamung Weser-Ems e.V. und dem Institut für Fortpflanzung landwirtschaftlicher Nutztiere Schönow e.V. stellt eine gute Grundlage für die weitere Bearbeitung dieser Fragestellung dar.