

## Vergleich von eigelhaltigem und eigelfreiem Medium zur Kryokonservierung von Bullensamen:

**Einfluß der unterschiedlichen Konservierungsmedien auf die IVP beim Rind**  
Mahabir, E <sup>1</sup>; Gilles, M <sup>2</sup>; Koll, H <sup>3</sup>; Wimmers, K <sup>2</sup>; Ponsuksili, S <sup>2</sup>; Schellander, K <sup>2</sup>

1. *GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Ingolstädter Landstraße 1, 85764 Neuherberg*
2. *Institut für Tierzuchtwissenschaft, Friedrich-Wilhelm-Universität, Endenicher Allee 15, 53115 Bonn*
3. *RBW Außenstelle Lindenhof, 74547 Untermünkheim*

### **EINLEITUNG**

Sowohl für die Flüssig- als auch für die Gefrierkonservierung ist die Ejakulatverdünnung im unmittelbaren Anschluß an dessen Gewinnung eine unerlässliche Voraussetzung (K.-F. Weitze, 2001). Neben generellen qualitätsbeeinflussenden Faktoren (z.B. pH-Wert, Ionenzusammensetzung, Osmolarität) der verwendeten Verdünnermedien haben, insbesondere im Falle der Spermientiefgefrierung (TG), unspezifische (z.B. Eidotter, Serumalbumin, Milchproteine) bzw. spezifische Schutzsubstanzen (z.B. Glycerin, DMSO) entscheidenden Einfluss auf den Erhalt der Spermienfunktionalität im Anschluß an die Tiefgefrierung. Heutzutage sind verschiedenste Verdünnerbestandteile und Rezepte bekannt, wobei in kommerziellen Verdünnungs- und TG-Medien Zusätze organischer Substanzen tierischer Herkunft routinemäßig Anwendung finden. Hierbei stellt Eigelb als Supplement zum TG-Medium, wegen seiner ausgeprägten unspezifischen Schutzfunktion gegenüber Kühlechock und Gefrierschäden, bis dato den weltweit am häufigsten verwendeten biologischen Zusatzstoff in der Kryokonservierung boviner Ejakulate dar (Weitze K.-F., 1991, 2001; Moussa M. et al., 2001).

Um Problemen, welche mit solchen undefinierten, biologischen Zusatzstoffen verbunden sind (latentes Hygienierisiko, Mangel an Qualitätsstandard, negative Einflüsse biologisch aktiver Inhaltsstoffe) zu begegnen, versuchen moderne Trends in der bovinen Spermien-TG-Konservierung u.a. definierte, eigelfreie Medienformulierungen zu verwirklichen (Hurtado Morales M.P. (1998), Müller-Schlösser et al., 1995, 2000, 2001; Moussa M. et al., 2002).

Sowohl im Feldeinsatz (NRR) als auch die Betrachtung spezifischer In vitro Spermientestverfahren unterschiedlicher eigelfreier und eidotterhaltiger Medien zeigte in den letzten Jahren wiederholt die qualitative und funktionelle Vergleichbarkeit dieser verschiedenen Formulierungen (Hurtado Morales M.P. (1998), Müller-Schlösser et al. (1995, 2000, 2001)).

Hinweise hinsichtlich des vergleichenden Einsatzes der beiden Mediengenerationen in der In vitro Produktion boviner Embryonen (IVP) sind jedoch in der aktuellen Literatur spärlich vertreten und insbesondere im Falle des eigelfreien Komplettmediums AndroMed® (Fa. Minitüb) nicht belegt.

Auf diesem Hintergrund war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob der Einsatz eines kommerziellen eidotterhaltigen Verdünnungs- & Konservierungsmedium (Triladyl® Fa. Minitüb), im Hinblick auf die Funktionalität der Spermien im Einsatz bei der homologen IVP Unterschiede gegenüber der eigelfreien Komplettformulierungen AndroMed® besitzt.

## MATERIAL UND METHODEN

Aus Schlachtovarien gewonnene Kumulus Oozytenkomplexe (COC`s) wurden nach einem Standardprotokoll maturiert (IVM, TCM 199 + 10% ÖCS, 22 h), in vitro befruchtet (IVF, modif. TALP, 18 h) und bis zum d7 kultiviert (IVC, CR1-Medium + 10% ÖCS).

Zur IVF wurden nativ gesplittete und abschließend in den zu untersuchenden Medien TG-kryokonservierte Ejakulate dreier Fleckvieh Bullen (Alter: 15-20 Mon.) von einer Besamungsstation zur Verfügung gestellt. Für beide Verdünnermedien erfolgten sowohl Konfektionierung als auch Auftauregime der Proben einheitlich (Konfektionierung: feine Pailletten, 20 Mio. Spermien / Paillette; Auftauregime: 38°C, 25 sec).

Von jedem Bullen standen demnach zwei Versuchsgruppen (VG1/2) zur Verfügung:  
VG1: Tiefgefrierkonservierung mittels Tris-Eidotter-Verdünner (Triladyl®, Fa. Minitüb)  
VG2: Tiefgefrierkonservierung mittels AndroMed® (Fa. Minitüb).

Im Rahmen der Auswertung wurden sowohl die In Vitro Teilungsrate (geteilte Embryonen 72 h post inseminationem (hpi)) der betreffenden Spermatozoengruppe (VG1 bzw. VG2) sowie die dazugehörige Entwicklung der Embryonen bis zum Blastozystenstadium (d7, Blastozystenrate (%)) erfasst.

## ERGEBNISSE

Im Hinblick auf die gesamte Teilungs- und Blastozystenrate in der bovinen IVP (n = 3842 IVM Oozyten) konnten wir in unserer Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen dem eigelhaltigem Verdünnermedium (Triladyl®, Fa. Minitüb; n = 2036 IVM Oozyten) und eigelbfreien Komplettmedium (AndroMed®, Fa. Minitüb; 1806 IVM Oozyten) aufzeigen (s. Tab.1).

Ein bullenindividueller Effekt hinsichtlich der beiden Parameter lässt sich aus unserem Versuchsgut ebenfalls nicht ableiten.

**Tabelle 1: IVP-Ergebnisse (Teilungs- und Blastozystenrate) nach IVF mit unterschiedlichem TG-N2-Sperma**

Versuchsgruppe	TG-Medium	IVM-Oozyten (n)	Teilungsrate <sub>72 hpi</sub> (%)	Blastozystenrate <sub>d7</sub> (%)
Bulle 1 <sub>(VG1)</sub>	Triladyl®	480	49,0	11,5
Bulle 2 <sub>(VG1)</sub>	Triladyl®	727	56,8	16,9
Bulle 3 <sub>(VG1)</sub>	Triladyl®	829	60,6	9,1
Bulle 1 <sub>(VG2)</sub>	AndroMed®	889	56,1	16,2
Bulle 2 <sub>(VG2)</sub>	AndroMed®	552	55,1	12,2
Bulle 3 <sub>(VG2)</sub>	AndroMed®	365	47,4	7,4
Summe <sub>(VG1)</sub>	Triladyl®	2036	55,5	12,5
Summe <sub>(VG2)</sub>	AndroMed®	1806	52,9	11,9

## SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Da sich die produktspezifischen, unterschiedlichen Eigenschaften und Besonderheiten der beiden Verdünner nicht im o.a. bovinen IVP- Ergebnis (Teilungsrate; Blastozystenrate) niederschlagen, schlussfolgern wir, dass der Einsatz beider Tiefgefriermedien zu qualitativ gleichwertigen Ergebnissen führt.

Biologische Verdünnerbestandteile tierischer Herkunft werden jedoch in zunehmendem Maße hinsichtlich physikalischer und hygienischer Aspekte als anfällig und bedenklich gewertet (Hurtado

Morales M.P., 1998, Müller Schlösser F. et al., 1995, 2001; Moussa M. et al., 2002).

In diesem Zusammenhang sollte man sich auch vor Augen führen, dass AndroMed® im Gegensatz zu undefinierten Medien auf der Basis biologischer Zusätze, den Vorteil der Sterilsterilisierbarkeit besitzt. Zusätzlich bringt AndroMed® vom arbeitstechnischen Aufwand betrachtet für Besamungsstationen und IVP-Labore Vorteile mit sich.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass es ein erklärtes Ziel in der bovinen IVP ist, auf allen Ebenen möglichst standardisierte sowie definierte Milieubedingungen zu etablieren. Gerade vor diesem Hintergrund sollte der Einsatz eines definierten Mediums auf der Prozessebene der IVF befürwortet werden.

## Literatur

- **Hurtado Morales M. P. Kryokonservierung von Rindersamenzellen mit Biociphos-Plus®: Untersuchungen nach Konfektionierung bei 4°C und Raumtemperatur, Dissertation Veterinärmedizinische Univ. Zürich (1998)**
- **Moussa M., Martinet V., Trimeche A., Tainturier D., Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method : cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen, Theriogenology 57 (2002) 1965-1706**
- **Müller-Schlösser F., Aires V., Hinsch E., Schill W.B., Hinsch K.D. Investigation of an egg yolk-free andrological medium for freezing of bovine ejaculates, Reproduction in Domestic Animals – Physiology, Pathology, Biotechnology Vol. 35 (1), (2000) 38**
- **Müller-Schlösser F., Aires V., Hinsch E., Schill W.B., Hinsch K.-D. Evaluation of the quality of a new generation of egg yolk-free semen diluters for cryopreservation of bovine semen, Tagungsband 34. Jahrestagung Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung, Verlag der DVG, Gießen– Gießen 22-23 Feb. 2001**
- **Müller-Schlösser F., Hinsch E., Böhm J., Schill W.-B., Hinsch K.-D. Untersuchungen an einem eidotterfreien Verdünnungsmedium für die Tiefgefrier-Konservierung von Bullensamen, Tierärztl. Prax. 23 (1995), 363-366**
- **Weitze K.-F., Kryobiologische Aspekte des Spermakonservierung, In: Künstliche Besamung bei Nutztieren, 2 überarbeitete Auflage, S.: 237-249, Herausg.: Busch W., Löhle K., Peter W., (1991) Fischer – Jena**
- **Weitze K.-F., Prinzipien der Verdünnung und Konservierung, in: Veterinärmedizinische Andrologie – Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung bei männlichen Tieren, Herg.: Busch & Holzmann, (2001) Schattauer, Stuttgart, New York**