Das Tiefgefrieren von Sperma, eine neue Methode zur Samenkonservierung für die künstliche Besamung

Autor(en): **Ah, J. von**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **97 (1955)**

Heft 8

PDF erstellt am: **29.04.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-592435

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

En conséquence il nous paraît que les *Henneguya* trouvées sur les Perches du Léman peuvent être identifiées à celles décrites par Zandt chez les Perches du lac de Constance. L'examen de gros kystes mesurant de 3 à 6 mm, inclus dans le tissus osseux de l'arc branchial, nous a montré par contre des *Henneguya* morphologiquement différentes des précédentes que nous nous proposons d'étudier en détail dans une note ultérieure.

Zusammenfassung

Die zweite Studie befaßt sich mit den Cnidosporidien vom Typ Henneguya. Die Untersuchung von Köpfen von Perca fluviatilis hat ergeben, daß es sich um eine Henneguya similis handelt, die 1924 von Zandt für den Bodensee festgestellt wurde.

Riassunto

Il secondo studio tratta dei cnidosporidi del tipo Henneguya. Dall'esame di teste della Perca fluviatilis risulta che si tratta di un'Henneguya similis, che Zandt aveva già scoperto nel 1924 per il lago di Costanza.

Summary

The second study deals with Cnidosporidia of the Henneguya type. The examination of heads of Perca fluviatilis demonstrated Henneguya similis, which have been observed 1924 in the lake of Constance by Zandt.

Bibliographie

Cohn L., 1896. Über die Myxosporidien von *Esox lucius* und *Perca fluviatilis*. Zool. Jahrbuch, Anat. u. Ontologie *9*, 263. – H. B. Fantham, A. Porter et L. R. Richardson, 1939. Some *Myxosporidia* found in certain fresh Water Fishes in Quebec Province, Canada. Parasitology *31*, No. 1, 1. – B. Hofer. Handbuch der Fischkrankheiten, Munich 1904. – A. Nemeczek, 1911. Beiträge zur Kenntnis der Myxo- u. Mikrosporidien der Fische. Arch. f. Protistenkunde *22*, 143. – M. Plehn, 1924. Praktikum der Fischkrankheiten, Munich 1924. – F. Zandt, 1924. Fischparasiten des Bodensees. Zentralbl. f. Bakt. Orig. I. *92*, Heft 1/2, 225.

Das Tiefgefrieren von Sperma, eine neue Methode zur Samenkonservierung für die künstliche Besamung

Von J. von Ah, ing. agr.

I.

Schon 1780 stellte sich Spallanzani, der Entdecker der KB die Frage, wie lange die Befruchtungsfähigkeit der männlichen Sekrete anhalte. Er machte Versuche mit Fröschen und sah, daß diese Zeit auf sieben Stunden

nach dem Tode des Männchens festzusetzen sei. Er entdeckte aber auch bereits, daß die Verlängerung dieser Zeit durch Abkühlung möglich ist. Dies war schon zu einer Zeit, als man noch nicht einmal wußte, daß die Spermien die eigentliche Ursache einer Befruchtung sind (zit. Götze [2]).

Lange Jahrzehnte war es dann um die KB in Wissenschaft und Praxis ruhig. Logischerweise sind auch keine Versuche unternommen worden, Samen außerhalb des männlichen Organismus am Leben zu erhalten, weil das Bedürfnis zur Abklärung solcher Fragen gar nicht vorhanden war. Erst mit der Möglichkeit, den Samen auf einige Zeit in vitro befruchtungsfähig zu erhalten, ist dann die KB in der allgemeinen Praxis zu ihrer Ausdehnung gelangt. Es ist auch heute noch gebräuchlich, das Sperma bei Zugabe von Eigelb als Nahrung und Na-Zitrat als Puffer für 2–3 Tage zu konservieren. Der Samen wird in diesem Verdünnungsmittel zwischen + 2 und + 5° C in einem gewöhnlichen Kühlschrank aufbewahrt.

Es war im Jahre 1938, als der Deutsche Jahnel entdeckte [1], daß menschliches Sperma verhältnismäßig lange Zeit ein Gefrieren bei — 79° C (Temperatur des Trockeneises) überlebte und seine Lebensfähigkeit auch noch in flüssigem Stickstoff bei — 196° C und in flüssigem Helium bei — 269,5° C behielt. Spezielle Verdünnungsmittel oder Vorsichtsmaßregeln wandte man bei diesen Experimenten keine an. Ähnliche Versuche wurden in den vierziger Jahren mit mehr oder weniger Erfolg auch für das Tiefgefrieren von Frosch-, Hühner-, Kaninchensperma usw. angestellt, was hier der Vollständigkeit halber ebenfalls angeführt sei.

Es hat sich gezeigt, daß die Samenzellen außerhalb des Organismus gegen höhere Temperaturen wesentlich empfindlicher sind als gegen niedere. Bei + 10 bis + 15° C aufbewahrtes Kaninchensperma befruchtet teilweise noch nach 200 Stunden. Aufbewahrung bei + 37° C führt dagegen schon nach 13 Stunden, bei + 45° C sogar schon nach 15 Minuten zur Befruchtungsunfähigkeit. Die Bewegung hörte allerdings erst bei + 48° bis + 50° C auf. Spermien in saurem Milieu sind etwas widerstandsfähiger. Nach Götze [2] gilt bei großen Haussäugetieren ungefähr das gleiche. Als Gründe für ein solches Verhalten werden angegeben:

1. Rascher Verbrauch der Vorratsstoffe durch erhöhte Aktivität bei höherer Temperatur.
2. Rasche Zunahme des Keimwachstums und der dadurch auftretenden spermafeindlichen Stoffe. (Dieser Nachteil fällt allerdings bei Zusatz von Antibiotika dahin. In England ist es heute allgemein üblich, dem verdünnten Samen Penicillin und Streptomycin beizugeben.)
3. Veränderungen der Eiweißkörper durch Koagulation und Unterbrechung der Stoffwechselvorgänge bei Temperaturen von über + 45° C.

Bei niederen Temperaturen (also bei + 2 bis + 5° C) tritt der Kälteschlaf oder die Kälteanabiose auf, ein Zustand, der auf Herabsetzung aller biochemischen Vorgänge beruht und die vollständige Einstellung aller Bewegungen mit sich bringen kann. Die Kälteträgheit ist die Vorstufe dieses Zustandes.

Aber sogar eine Abkühlung auf + 2 bis + 5° C ist für ein Sperma nicht ungefährlich, weil sie zum Temperaturschock und damit zum schnellen Tod oder zu erheblicher Verkürzung der Lebensdauer und damit auch zu einer verminderten Befruchtungsfähigkeit führen kann. Bei Abkühlung bis herunter auf + 20° C kommt der Kälteschock nicht zustande. Die Gefahr beginnt erst unterhalb der 20°-Grenze. Dieses Verhalten bedingt für die Samengewinnung und -behandlung spezielle Maßregeln, auf die aber hier nicht näher eingetreten werden kann.

Halten wir also bis dahin fest: 1. Es ist möglich, Sperma bei bedeutend tieferen als den Körpertemperaturen über mehrere Tage lebend und befruchtungsfähig zu erhalten. 2. Es ist möglich – artverschiedenes Verhalten mitberücksichtigt – Sperma unter der 0°-Grenze mit Erfolg aufzubewahren, und 3. unter mehreren wichtigen Faktoren zur erfolgreichen Aufbewahrung von Sperma nimmt die Temperatur eine zentrale Stellung ein.

Was uns hier vor allem interessieren wird, ist die Frage, wie sich Bullensperma einer speziellen Kältebehandlung gegenüber verhalten wird.

Im Jahre 1952 wurde von den beiden englischen Forschern Polge und Rowson am Tierzuchtkongreß in Kopenhagen [3] eine Gemeinschaftsarbeit publiziert über das Tiefgefrieren von Bullensperma und eine Aufbewahrung desselben bei —79° C über eine längere Zeitdauer. Seit dieser Publikation hat die Methode bereits in die kommerzielle Praxis international Eingang gefunden.

Was wurde unternommen, daß auf einmal die früheren vergeblichen Versuche mit dem Tiefgefrieren von Bullensperma von Erfolg gekrönt worden sind? – Die Engländer Polge, Smith und Rowson [3] kamen bei ihren Versuchen auf die Idee, dem Verdünnungsmittel Glyzerin beizugeben und so den Gefrierprozeß derart zu beeinflussen, daß die empfindlichen Spermien keinen Schaden leiden. Es wurde versucht – und der Versuch führte zu einem Erfolg. Wir wollen hier aber dem Thema der eigentlichen Tiefgefriertechnik nicht vorgreifen und im zweiten Teil nochmals auf die Behandlung des Spermas mit Glyzerin zurückkommen.

Es ist selbstverständlich, daß mit den drei Daten 1780, 1938 und 1952 und den vier Namen Spallanzani, Jahnel und Polge/Rowson die Forschungsgeschichte des Tiefgefrierens von Sperma sich nicht erschöpft. Experimente und Berichte sind mit deutschen, französischen, italienischen, amerikanischen, russischen und vor allem englischen Namen verknüpft. Es schienen mir dies aber die wichtigsten Marksteine in der ganzen Entwicklung zu sein, weshalb sie eine besondere Erwähnung fanden.

II.

Die erste Aufgabe einer Besamungsstation, die Bullensperma tiefgefrieren will, ist die *Auswahl der richtigen Stiere*, für die sich das Anlegen einer Gefrierkonserve überhaupt lohnt. In Little Horwood, einer Station des Milk Marketing Board in England, wo ich mit der Methode bekannt geworden bin, wurden nur solche Stiere verwendet, die sich als Zuchttiere bereits bewährt hatten, also ältere Tiere. Bis heute ist aber noch kein Test bekannt, nach dem man ein Sperma beurteilen könnte, ob es sich für das Tiefgefrieren eignet. Man ist hier auf den Versuch angewiesen, und es hat sich gezeigt, daß im Durchschnitt das Sperma von 80 % der Bullen geeignet ist.

Die *Samengewinnung* unterscheidet sich in keiner Art und Weise von der üblichen Methode für die KB. Man nimmt das Ejakulat von 2–3 aufeinanderfolgenden Sprüngen und untersucht eine Probe unter dem Mikroskop rein optisch auf Aussehen, Dichte und Beweglichkeit der Spermien. Weitere Untersuchungen werden normalerweise nicht gemacht.

Nach der Gewinnung des Samens und dem Untersuch, beginnt die Vorbereitung und die Behandlung für den Gefrierprozeß. Als *Verdünnungsmittel* wird wie bei der täglichen Praxis für die KB eine Mischung von Na-Zitratlösung und Eigelb im Mischverhältnis 1:1 verwendet. Die Na-Zitratlösung wird vom Milk Marketing Board als Standard hergestellt, der durch alle Besamungsstationen von einem zentralen Labor bezogen wird. Das Rezept ist folgendes: Es werden 3,5 g des dreibasischen Na-Salzes der Zitronensäure mit 2 H_2O Kristallwasser in 100 ccm dreimal destilliertem Wasser gelöst und mit Zitronensäure auf pH 6,7 eingestellt.

Das Eigelb stammt von Frischeiern, die kurz vor dem Gebrauch aufgeschlagen werden. Dem ganzen Verdünnungsmittel werden als Antibiotika an Penicillin und Streptomycin soviel zugesetzt, daß die gebrauchsfertige Samenflüssigkeit 500 Einheiten pro ccm enthält.

Vor dem Mischen mit dem Sperma wird das Verdünnungsmittel im Wasserbad auf eine Temperatur von + 27 bis + 30° C erwärmt, um den bereits erwähnten Temperaturschock zu vermeiden, der eine starke Schädigung der Spermien zur Folge haben würde. Je nach der subjektiv beurteilten Dichte wird nun das Ejakulatgemisch aller Sprünge (also von mindestens zwei) bis zu einem Verdünnungsverhältnis von 1:10 mit dem erwärmten Eigelb-Na-Zitratgemisch vermengt. Diese Mischung kommt nun in den Kühlschrank und wird auf + 5° C abgekühlt.

Zugleich wird eine Mischung von reinem Glyzerin und Na-Zitrat im Volumenverhältnis 1:4 ebenfalls auf + 5° C abgekühlt, die nach dem Erreichen der + 5° C-Grenze der verdünnten Samenflüssigkeit im Verhältnis 1:1 zugesetzt wird. Das ursprüngliche Ejakulat ist also im Maximum 1:20 verdünnt worden und enthält 10% Glyzerin. Diese Mischung ist nun endgültig und muß zur sogenannten Äquilibrierung für 12 bis 20 Stunden im Kühlschrank bei + 5° C aufbewahrt werden.

Nach dieser Zeit ist die Samenflüssigkeit als Mischung von Sperma, Eigelb, Na-Zitrat, Antibiotica und Glyzerin bereit zum Tiefgefrieren. Man hat unterdessen auch die 2-ccm-Ampullen vorbereitet, in denen das Sperma 1-ccm-weise tiefgefroren werden soll. Die Ampullen wurden mit einer speziellen Glasfarbe beschriftet und sind in einer Wanne mit eisgekühltem Wasser ebenfalls in den Kühlschrank gestellt worden. Die Korkzapfen für den Verschluß wurden mit heißem, dann destilliertem Wasser und mit Na-Zitratlösung gewaschen und stehen ebenfalls zur Abkühlung dort.

Sobald die Samenflüssigkeit, die Ampullen, die Korkzapfen und die Abfüllpipette die gleiche Temperatur (mindestens + 5° C und höchstens + 8° C) erreicht haben, kann mit der Abfüllarbeit begonnen werden. Diese muß sehr rasch erfolgen, damit sich das ganze System nicht über + 8° C erwärmt. Die Temperatur im Wasserbad, in dem die Ampullen stehen, wird ständig überwacht und bei Erreichen der kritischen + 8°-Grenze muß die Arbeit unterbrochen werden, damit man alles im Kühlschrank erneut kühlen kann. Um diesen Arbeitsunterbruch zu vermeiden, werden dem Wasserbad vorteilhaft kleine Eisstückchen beigegeben.

Wenn die Ampullen mit je 1 ccm abgefüllt sind, werden sie mit den Korkzapfen verschlossen und mit einer rasch trocknenden Plastikmasse in der gleichen Farbe wie die Beschriftung versehen. Die so vorbereiteten Gläschen kommen nun je 10 und 10 in kleine Metallgitterchen, was die spätere Handhabung beim eigentlichen Gefrieren erheblich erleichtert.

Man bringt nun diese Zehnerpackungen erneut in den Kühlschrank und kühlt sie auf mindestens + 4° C ab. In dieser Zeit wird die Tiefkühlboxe (Abb. 1) bereitgestellt.

Diese enthält Methylalkohol, der mit Trockeneis auf die Kühlschranktemperatur gebracht wird. Der Methylalkohol dient lediglich dazu, als Medium einen regelmäßigen Gefrierverlauf zu gewährleisten. Er wird erst bei sehr tiefen Temperaturen fest und ist deshalb besonders geeignet. Es ist wichtig, daß die Samenampullen und der Alkohol in der Boxe die gleiche Temperatur haben. Ist dies der Fall, so werden die Gläschen in die Boxe gebracht und der eigentliche *Gefrierprozeß* kann beginnen.

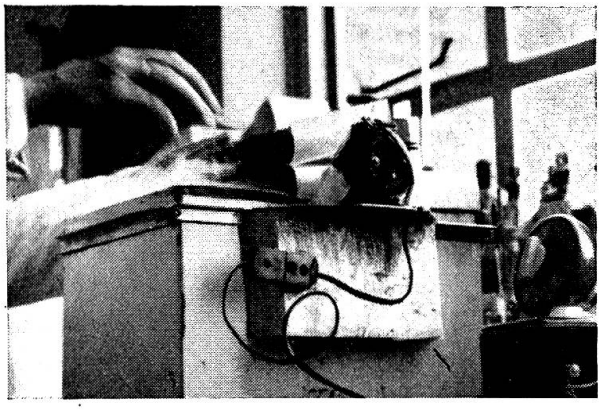

Abb. 1. *Tiefkühlboxe* wie sie in Little Horwood, England, verwendet wird. Die Samenampullen werden darin in Methylalkohol mit Trockeneis gefroren. Bis auf — 11° C kühlt man alle zwei Minuten um ein Grad. Bei dieser Temperatur wird möglichst rasch auf — 60 bis 65° abgekühlt, worauf der Samen im Lagerkabinet versorgt wird. Die Boxe ist gut isoliert. Der kleine Motor treibt einen Propeller, der die Aufgabe hat, während des Gefrierprozesses den Alkohol in ständiger Bewegung zu halten, was eine regelmäßige Abkühlung gewährleistet.

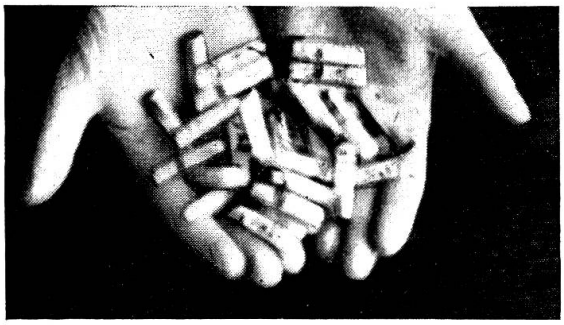

Abb. 2. 30 bis 50 Ampullen gibt jede Absamung von zwei Sprüngen. Das Ejakulat wird mit Eigelb und Natrium-Zitrat verdünnt, und man gibt Penicillin und Streptomycin als Antibiotica dazu. Erst die Zugabe von 10 Volumenprozent Glyzerin ermöglicht ein für das Sperma gefahrloses Gefrieren.

Wie schon erwähnt, wird zur Abkühlung Trockeneis verwendet, das in kleinen Brocken bis zu Schnee zerschlagen, zugegeben wird. Je kleinere Brocken man beigibt, desto besser läßt sich die Abkühlung regulieren.

Durch den Zusatz des festen CO_2 wird nun das ganze System alle zwei Minuten um 1° C abgekühlt. Man kühlt auf diese Weise bis auf — 10° bis — 11° C ab. Dies ist eine kritische Temperatur im Kristallisationsprozeß und man hat nun durch Zusatz von viel Trockeneis so rasch als möglich auf — 60° C abzukühlen. Ist diese Temperatur erreicht, wird der Samen ins Lagerkabinett gebracht, wo eine Temperatur von wenig-

stens — 65° C sein muß. Wird der Samen auf über — 65° C erwärmt, so geht er rasch zugrunde. Man wählt eine Temperatur von — 79° C nur deshalb, weil sie bequem mit festem CO_2 zu erreichen ist.

Natürlich stellt sich nun hier die Frage, wie lange solch gefrorenes Sperma in diesem Zustand aufbewahrt werden könne. Rowson gibt eine Zeit von drei Jahren als bis heute nachgewiesen an. Man sieht nicht ein, warum gefrorenes Sperma nicht praktisch unbeschränkt haltbar sein sollte. Doch werden erst jahrelange Versuche eine endgültige Antwort geben können.

Soll eine solche Samenampulle für eine *Insemination* in Gebrauch kommen, so wird sie in einem Wasserbad von etwa + 37° C rasch aufgetaut und

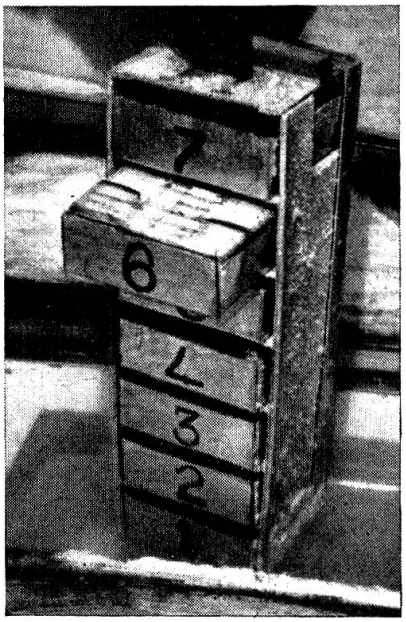

Abb. 3. Die Ampullen werden in einem Lagerkabinett in numerierten Laden gelagert. Die Temperatur darf nie — 65° C übersteigen, sonst geht das Sperma zugrunde. Die Temperatur wird mit Hilfe von Alkohol und Trockeneis so tief gehalten.

(Aufnahmen vom Verfasser.)

steht dann für 36 bis 48 Stunden unter gewöhnlichen Lagerungsbedingungen für die KB zur Verfügung.

Anschließend an die Gefriertechnik sollen noch einige Fragen einer *Glyzerinbeimengung* zu Sperma etwas näher untersucht werden.

Erste Versuche sind mit Sperma von Hühnern gemacht worden. Unverdünntes Sperma oder solches in Ringer's Lösung ergab keine Bewegung der Spermien mehr nach einem Gefrierprozeß in kleinen Ampullen (Polge/Rowson [3]). Hingegen, wenn die Samenampullen 15 % Glyzerin enthielten und in einer Mischung von Trockeneis und Alkohol mit — 79° C gefroren wurden, zeigten die Spermien nach dem Auftauen eine vollständige Beweglichkeit

und diese war von unbehandeltem Sperma gar nicht zu unterscheiden. Auch nach Auftauen erst nach einem Jahr Lagerung bei — 79° C, zeigte die Samenprobe einen hohen Prozentsatz beweglicher Spermien.

Später wurden die Versuche auch auf Säugetiersperma ausgedehnt. Bei Anwendung der gleichen Gefriermethode wie bei Hühnersperma, zeigte sich kein Erfolg. Das beste Resultat erhielt man mit ungefähr 80 % überlebender Spermien, wenn die Samenflüssigkeit 15 % Glyzerin enthielt und über den Zeitraum von 45 Minuten von 0° C auf — 79° C abgekühlt und in einem Wasserbad bei + 40° C aufgetaut wurde.

Zwei wichtige Fragen gilt es nun abzuklären: 1. Welche Funktion hat das Glyzerin überhaupt beim Gefrierprozeß von Sperma? und 2. Wie sind die Befruchtungsverhältnisse einer Besamungsflüssigkeit, die Glyzerin enthält?

Wird das Glyzerin dem Samen rasch bei einer Temperatur von + 30° C bis zu einer Konzentration von 15 % zugesetzt, so stellt man einen augenblicklichen Rückgang der Beweglichkeit der Spermien fest. Es scheint, daß damit eine Empfindlichkeit gegen den osmotischen Schock zum Ausdruck kommt, den das rasche Zugießen von Glyzerin bei dieser Temperatur verursacht.

Man hat dann entdeckt, daß ein Mischen mit Glyzerin bei ungefähr + 5° C und ein Äquilibrieren über 12 bis 20 Stunden bei dieser Temperatur, nicht nur einen hohen Grad der Beweglichkeit vor dem Gefrieren, sondern auch einen hohen Prozentsatz lebender Spermien nach dem Gefrierprozeß und Wiederauftauen ergibt. Weitere Versuche zeigten auch, daß eine Konzentration von 10 % Glyzerin günstiger ist als eine solche von 15 %. Genau nach diesen Erkenntnissen wurde die Methode des Tiefgefrierens beschrieben.

Diese Experimente erlauben bis zu einem gewissen Grade die Beantwortung der Frage nach den *Funktionen*, die das Glyzerin beim Gefrierprozeß ausübt. Es scheint nämlich, als ob Glyzerin imstande wäre, Zellen gegen tiefe Temperaturen zu schützen. Man neigte ursprünglich zur Ansicht, daß Glyzerin seinen Effekt lediglich dadurch zustande bringe, daß es den Charakter der Kristallisation im Medium oder in der Zelle verändere oder gar verhindere. Glyzerin ist aber bei den verwendeten Konzentrationen ein stark dehydratisierender Stoff und hat den gleichen Effekt auf lebende Zellen wie eine Zuckerlösung. Es sei hier erwähnt, daß die 10 % Glyzerin pro ccm einem Gewicht von 0,126 g entsprechen und 0,1544 g Traubenzucker isoosmotisch sind, was als stark dehydratisierend bezeichnet werden muß. Man pflegte verhältnismäßig große Volumina zu gefrieren. Das hat nach einer Publikation des Engländers Parkes [4] zwei mögliche Folgen: «Erstens einmal wird beim langsamen Gefrieren und dem dadurch schrittweisen Entziehen des Wassers das übrigbleibende Medium mehr und mehr hypertonisch, was durch sich allein schon eine Dehydratation der Zelle zur Folge hat. Es ist daher möglich, daß beim verwendeten Material eine Dehydratation durch die Verbindung verschiedener Umstände erfolgt und dies einen wirksamern Faktor zum Schutz der Zellen gegen tiefe Temperaturen darstellt.»

Als zweite Schlußfolgerung beim Verwenden großer Volumina gibt Par-

kes an, daß zerstörende Veränderungen im Medium und in der Zelle selbst unterschieden werden müßten. Die Konzentration von 10% Glyzerin verhindert die Bildung von Kristallen im Medium bei einem verhältnismäßig langsamen Gefrierprozeß nicht, aber es verändert ihre Form und vergrößert die interstitiellen Räume, in denen sich einzelne Zellen ansammeln können. Es besteht auch kein Zweifel, daß Steigerung des inneren Druckes und mechanische Schädigung der Zellen verhindert werden.

Über die Formen der Kristalle in den Zellen selbst weiß man wenig Bescheid. Die Spermien haben eine zu dichte Hülle, um solche Beobachtungen zuzulassen. In Versuchen, bei denen Amöben unter dem Mikroskop gefroren wurden, hat man bei einer Zugabe von 5% Glyzerin, die als Hochkonzentration zulässig war, gesehen, daß eine deutliche Kristallbildung in den Zellen beim Gefrieren nicht verhindert werden konnte, und solche Zellen erwiesen sich nach dem Auftauen als tot.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß man eigentlich über die Funktionen des Glyzerins noch wenig weiß und daß man weitgehend auf die Erkenntnis angewiesen ist, daß der Gefrierprozeß bei Zugabe die Samenzellen nicht schädigt.

Leichter ist die Beantwortung der Frage nach den *Befruchtungsverhältnissen* einer Besamungsflüssigkeit, die Glyzerin enthält, weil die Versuchsanordnung lediglich in der Weise zu erfolgen hat, daß man eine möglichst große Zahl von Kühen in einer Gruppe mit dem üblich verdünnten Sperma inseminiert und die zweite Gruppe mit Sperma, das mit Glyzerin behandelt wurde.

Der Engländer Holt [5] hat im Herbst des Jahres 1952 und im Frühling des folgenden Jahres diesen Versuch auf breiter Basis durchgeführt. Die Resultate waren die folgenden in den beiden Versuchsperioden zusammen: Bei den 5702 besamten Kühen der Kontrollgruppe ergab sich als Konzeptionsrate für die erste erfolgreiche Besamung ohne Rückruf innert drei Monaten 62,5%. Bei der Gruppe von 5787 Tieren, die mit Glyzerin behandeltem Sperma besamt wurden, ein Prozentsatz der Konzeption von 66,8%. Die Differenz von 4,3% zugunsten des mit Glyzerin behandelten Samens wird als statistisch gesichert angegeben. Der Same stammte von neun verschiedenen Stieren.

Schon bei diesem ersten Versuch hat Holt einen Unterschied im Verhalten des Spermas einzelner Stiere festgestellt. Er hat auch hier die Versuchsresultate statistisch ausgewertet und ist bei vier Stieren mit 2994 Kühen in der Kontrollgruppe und 3020 Kühen in der Versuchsgruppe auf eine Differenz in der Konzeptionsrate von 7,3% als statistisch gesicherten Unterschied gekommen. Bei fünf Stieren, die in der Kontrollgruppe für 2708 Besamungen verwendet wurden, ergab sich der nicht gesicherte Unterschied von 0,7%. Mit andern Worten, das Sperma von Stieren mit einer nicht befriedigenden Fertilität ist durch die Behandlung mit Glyzerin auf eine befriedigende Höhe der Konzeptionsrate gebracht worden.

Damit stehen wir erneut vor dem Problem, welche Wirkungen das Glyzerin auf ein Sperma auszuüben vermag. Es sei hier noch angeführt, daß die Ejakulate nicht, wie sonst allgemein üblich, mit Antibiotika behandelt wur-

den. Der Effekt ist nach Holt in gleicher Richtung weisend, wie er sich beim Zusatz von Antibiotika zu Sperma gewisser Stiere erwiesen hat. Auf die Frage der Antibiotika sei aber hier in diesem Zusammenhang nur ganz am Rande hingewiesen.

III.

Welche Bedeutung man in der Praxis der künstlichen Besamung einem Verfahren zu längerer Aufbewahrung von Sperma beimißt, ist schon daraus ersichtlich, mit welchem Aufwand die Entwicklung einer brauchbaren Gefriermethode vor sich gegangen ist. Heute, zweieinhalb Jahre nach Publikation der beschriebenen Methode, die in weitern Kreisen beachtet wurde, liegen schon Berichte aus Amerika, Holland, Schweden, Deutschland und natürlich auch England vor, worin von Tausenden von Besamungen mit tiefgefrorenem Sperma die Rede ist.

In fast allen Publikationen über das Tiefgefrieren steht gewöhnlich nach dem Besprechen der Technik, der lapidare Satz: «Die Vorteile des Verfahrens sind offensichtlich.» Weil aber in der breiten tierzüchterischen Praxis in der Schweiz die KB ohne große Bedeutung ist, liegen wohl die möglichen Vorteile einer Gefriertechnik von Sperma nicht sogleich auf der Hand und es sollen im folgenden einzelne wesentliche Punkte angeführt werden [6].

An jeder Besamungsstation zeigt sich nach der bisherigen Konservierungsmethode ein relativ großer Verschleiß an Sperma besonders in deckarmen Zeiten des Sommers, während zur Winterzeit die Vatertiere oft bis an die Grenze ihrer Leistungsfähigkeit ausgenützt werden müssen. Hier vermag nun die Gefrierkonserve von Sperma einen Ausgleich zu schaffen. Man hat die Möglichkeit, die Bullen über das ganze Jahr regelmäßig zur Absamung zuzuziehen: im Sommer wird das restliche Sperma gefroren und steht für den Mehranspruch im Winter zur beliebigen Verfügung. Das Verfahren ermöglicht den Bullenstationen auch, die Stiere nach ihrer individuellen Leistungsfähigkeit zu nutzen, ohne daß wegen älterer Tiere oder wegen Tieren mit einer kleinern individuellen Potenz mehr Stiere eingestellt werden müßten.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß mit der Kaltkonservierung dem Züchter die Möglichkeit gegeben werden kann, in den Stall der Besamungsstation zu gehen und sich einen Stier, der ihm aus irgend einem Grunde für seinen Stall als besonders geeignet erscheint, auszusuchen. Die Station ihrerseits wird ihm den Samen des Bullen auch dann garantieren können, wenn das ausgesuchte Vatertier aus irgend einem Grunde ausscheiden sollte. Diese Garantie wird allerdings durch den betreffenden Samenvorrat und die mögliche Lagerungszeit beschränkt sein. In England kennt man den sogenannten «Nominated Service», durch den ein Züchter auf Abruf den Samen eines bestimmten Stieres erhalten kann. Dieser Kundendienst wird durch das Tiefgefrieren überhaupt erst richtig ermöglicht. Wir kommen also mit dem Tiefgefrieren dazu, daß wir aus der Massenvermehrungsmethode der KB eine Präzisionsmethode der Vermehrung schaffen können.

Den gleichen Vorteil zeigt die Möglichkeit, Jungstiere buchstäblich aufs Eis legen zu können, bis man ihren Erbwert auf Grund der Nachzucht mit einem Maximum an Sicherheit wird beurteilen können. Man nimmt den Samen von regelmäßigen Sprüngen und friert ihn ein. Weil die Kosten für eine Samenkonservierung in tiefer Kälte für kleine und große Dosen ungefähr gleich groß sind, wird das Anlegen einer eigentlichen Samenbank in dieser Hinsicht keine Schwierigkeiten bereiten. Vererbt ein Spender schlecht, dann ist der Verlust, wenn die Dosen vernichtet werden, klein, vererbt er aber gut, so stehen dem Züchter sofort Tausende von Dosen zur Verfügung, ohne daß der Spender mehr als gewöhnlich beansprucht werden müßte. Dieses Verfahren ist auch dann möglich, wenn das Vatertier wegen frühzeitigen Todes bereits ausgeschieden sein sollte. Es sei hier daran erinnert, daß man bis heute tiefgefrorenen Samen drei Jahre erfolgreich gelagert hat.

Ein anderer Vorteil ist mehr wirtschaftlicher Art für die Organisation der KB in einem bestimmten Gebiet. Die größten Kosten der KB sind die Reisespesen des Inseminators und die Expreßsendungen von Samen. Gerade in unwegsamen Gebieten kann mit der Tiefkühllagerung die Stierenhaltung weiter zentralisiert werden. Der Tierarzt oder der Inseminator hat lediglich eine Samenbank zu unterhalten und muß über die Kenntnisse verfügen, die für Wartung und Pflege des Lagers erforderlich sind. Eine erst kürzlich in Holland entwickelte neue Kühlmaschine macht diese Unterzentren auch vom Nachschub des festen CO_2 unabhängig. Die Anwendungsmöglichkeiten besonders in Berggebieten scheinen verlockend, da man ja besonders an der Wirtschaftlichkeit der KB durch die hohen Reisespesen zweifelt.

Gerade in diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß mit der Methode des Tiefgefrierens eine Samensendung von Kontinent zu Kontinent, auch wenn die Reise mehrere Tage dauert, möglich wird. Eine erste derartige Sendung in größerem Umfang hat am 7. Januar 1954 von Kanada nach England stattgefunden. Wichtig ist bei solchen Transporten, daß genügend Trockeneis beigegeben wird, damit die tödlichen Temperaturschwankungen für das Sperma verhindert werden können. Damit eröffnet sich für die Tierzüchter der ganzen Welt eine verhältnismäßig einfache und praktische Methode, Samen aus andern Ländern zur Blutauffrischung zu erhalten, wann immer er eine solche für nötig findet. Es zeigen sich damit auch ganz neue Aspekte für einen Viehhandel auf internationaler Basis.

Eine der wichtigsten Fragen in der Anwendung von tiefgefrorenem Sperma ist die, wie die *Befruchtungsverhältnisse* solchen Samens sind. Wir müssen das Sperma nicht nur lebend erhalten, sondern was noch viel wichtiger ist, wir müssen es befruchtungsfähig nach dem Wiederauftauen verwenden können. Obwohl aus allen Ländern mit einer entwickelten KB Berichte über die Anwendung gefrorenen Samens vorliegen, so sind zahlenmäßige Unterlagen über diese Zentralfrage in der Literatur vorläufig noch spärlich zu finden. Ein Resultat auf breiter Basis gibt eine private Samenstation in Hampshire, England, bekannt, wo vom Juni 1953 bis Juni 1954

12 000 Kühe mit tiefgefrorenem Sperma inseminiert worden sind. Die Konzeptionsrate betrug 60,6 % und war im Vergleich mit der gewöhnlichen Besamungsflüssigkeit um 3–7 % tiefer. Also ein Resultat, das durchaus annehmbar ist [7].

Bis jetzt war meistens von der Praxis und vor allem der kommerziellen Praxis der beschriebenen Konservierungsmethode von Sperma die Rede. In dieser kommerziellen Praxis liegen die Vorteile des Verfahrens, aber in der erfolgreichen Entwicklung einer rein empirischen Methode liegen auch die *Probleme* begründet. Die Tiefgefriertechnik ist rein empirisch entstanden und die heutige Technik kann von Verfeinerungen abgesehen als abgeschlossen betrachtet werden.

In einer kürzlich erschienenen Publikation führte der Holländer van Dieten [8] aus, daß die Untersuchungen mehr in die Breite als in die Tiefe gingen, das heißt der praktisch-technischen Seite werde viel mehr Aufmerksamkeit geschenkt als der physiologischen und der physiologisch-chemischen Seite. Ganz allgemein kann man sagen, daß dies den einen großen Problemkreis um das Tiefgefrieren darstellt, innerhalb dessen wir im Verlaufe der Ausführungen öfters auf einzelne Probleme gestoßen sind.

Der Holländer de Groot [8] hat die Frage der Konservierung und Gefrierung von Sperma von dieser Seite her in Angriff genommen. Untersuchungen von de Groot zeigen zum Beispiel, daß es für jeden Stier eine optimale Glyzerinkonzentration gibt und dabei auch jeweils eine optimale Kühlgeschwindigkeit vor dem Kristallisationspunkt besteht. Die Bullen reagieren manchmal sehr spezifisch. Die Optima liegen zwischen 7–10 Vol.-% Glyzerin und 1–3° C Kühlgeschwindigkeit pro Minute.

Die Arbeiten von de Groot mit der Schlußfolgerung, daß sich jedes einzelne Sperma gegenüber einer Kälte- und Glyzerinbehandlung individuell verhält, gibt auch den Schlüssel zur Erscheinung, daß verschiedene Autoren eine etwas anders modifizierte Gefriertechnik als optimal angeben. Die Fragen der physiologischen Wirkung auf das Sperma stehen aber immer noch offen.

Weitere Probleme bieten die *genetischen Fragen*. Die Vorteile, züchterisch gute Bullen durch das Tiefgefrierverfahren besser auszunützen, wurde bereits erwähnt. Was ist aber über mögliche auftretende Mutationen oder erhöhte Letalität bekannt? Eine Antwort auf diese Fragen kann nur eine möglichst umfangreiche Besamung mit gefrorenem Sperma geben, die sich mit Tiermaterial aus der gleichen Gegend, das durch die übliche KB entstanden ist, vergleichen läßt. Bis heute fehlen aber leider noch solche zuverlässige Unterlagen.

Jedenfalls steht bis heute fest, daß auf der ganzen Welt Zehntausende von Kälbern geboren wurden, die ihre Zeugung gefrorenem Sperma verdanken, ohne daß ein stärkeres Auftreten von Abnormitäten beobachtet worden wäre. Allein schon diese Tatsache rechtfertigt eine Anwendung der Tiefgefriertechnik ohne allzu große Bedenken.

Résumé

On savait dès 1938 que le sperme soumis à de basses températures est encore utilisable. L'emploi tout récent de glycérine comme agent de dilution a constitué un énorme progrès dans ce domaine. Un traitement approprié du sperme permet aujourd'hui de lui conserver pendant des années ses qualités fécondatrices en le refroidissant rapidement et en le maintenant à —65° C. Pour l'instant, cette durée de conservation est de 3 ans et ouvre toute une série de possibilités à la fécondation artificielle. L'auteur décrit la méthode et mentionne les avantages et désavantages éventuels de l'emploi de ces spermes surcongelés.

Riassunto

Poichè già dal 1938 si sa che lo sperma conservato a basse temperature rimane per lungo tempo vitale, recentemente l'uso di glicerina come diluente ha conseguito un grande progresso. Con trattamento adatto oggi si può mantenere per anni lo sperma capace di fecondare, raffreddandolo rapidamente e conservandolo a —65° C. Al momento 3 anni sono assicurati. Questa conservabilità apre una serie di nuove possibilità per la fecondazione artificiale. L'autore ne descrive il metodo ed illustra i vantaggi ed eventuali svantaggi circa lo sfruttamento dello sperma profondamente refrigerato.

Summary

Since 1938 we know that spermatozoa remain alive for a long time. The use of glycerine for dilution is a further important step forward. By suitable treatment and quick cooling down and keeping at a temperature of —65° C sperm may fertilize even after years, certainly after 3 years. This preservation offers new possibilities with regard to artificial insemination. The author describes this method and discusses advantages and eventual disadvantages in the use of deeply cooled sperma.

Literaturverzeichnis

[1] Jahnel: Kl. Wschr. 17, 1273, 1938. – [2] Götze: Besamung und Unfruchtbarkeit bei Haussäugetieren, Hannover 1949. – [3] Polge, Rowson: II Int. Congr. of Physiology and Pathology of Animal Repr. Copenhagen 1952. – [4] Parkes: Br. Agr. Bull. Nov. 51, S. 228 f. – [5] Holt: Vet. Rec. 65, 624, Sept. 53, ibidem 679, Oct. 53. – [6] Lüps: Wiener Tierärztl. Mschr. 10, 41, 1954, S. 650 ff. – [7] Veterinary Record, 1954, 66/376. Anim. Breed. Abstr. Vol.22, Nr. 4, 1954. – [8] Van Dieten: Zeitschr. f. Fortpflanzung, Zuchthygiene und Haustierbesamung, Heft 12, Dez. 54.

BUCHBESPRECHUNGEN

Veterinärhygiene. Von E. Roots, H. Haupt und H. Hartwigk. Ein Lehrbuch der Gesundheitspflege für Studierende, Tierärzte und Landwirte. Verlag P. Parey, 1955, 229 Seiten; DM 23.80.

Da das Buch an einen weiten Leserkreis gerichtet wird, ist es in leichtverständlicher Art gehalten. Trotzdem ist darin eine Fülle von genauen Angaben enthalten, die den Tierarzt speziell interessieren. Handeln im Prinzip alle andern veterinärhygienischen Bücher über bakteriologische Probleme, so ist diesem Werk zugute zu halten, daß zahlreiche andere, wichtige Gebiete der allgemeinen Hygiene in der Haustier-