

Ist die Spermientrennung beim Rind praxisreif?

Detlef Rath, Primoz Klinc, Hinrich Osmers, Dettmar Frese, Henning Wendt, Holm Zerbe, Hans- Joachim Schuberth, Hans-Wilhelm Michelmann, Peter Schwartz, Birgit Sieg, Christina Struckmann, Antje Frenzel¹

Für moderne Tierzuchtprogramme wäre eine Beeinflussung des Nachkommengeschlechtes aus verschiedenen Perspektiven wünschenswert. Dies gilt insbesondere für die Tierarten, die ein geschlechtsabhängiges Produkt liefern wie beispielsweise Milch. Natürlicherweise wird das Geschlecht bei Säugerspezies durch die Heterosomen der Samenzellen bestimmt, d.h. Spermien besitzen neben den Autosomen entweder ein X- oder ein Y- Chromosom. Die Chromosomen liegen dicht durch Protamine gebunden als Chromatingeflecht vor; einzelne Chromosomen sind zum Zeitpunkt der Ejakulation nicht zu erkennen. Erst wenn die Spermien in die Eizelle eindringen, dekondensiert das Chromatin und die Chromosomen formieren sich kurz vor der Vorkernbildung.

Die für die Geschlechtsdifferenzierung wichtige Information befindet sich auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms (SRY). Diese induziert primär die Ausbildung der Hodenanlage. Die weiteren Entwicklungsschritte zum männlichen Organismus erfolgen vorwiegend hormonell und führen u.a. zur Unterdrückung der Ausbildung des weiblichen Genitalsystems (z.B. Anti-Müller-Hormon).

Ejakulate enthalten normalerweise gleichviele X- und Y- Chromosom tragende Spermien. Äußerlich scheinen sie sich nicht zu unterscheiden. Bislang wurden zumindest keine Oberflächenstrukturen nachgewiesen, die zur Unterscheidung geschlechtsspezifischer Merkmale technisch genutzt werden könnten. Dies wäre die Voraussetzung einer Trennung durch physikalische und/oder immunologische Verfahren. Vorteil wäre bei einem solchen Vorgehen die hohe Ausbeute selektierter Spermien, indem man die ungewünschte Population ausfällt und alle anderen Spermien zur Samenübertragung oder Konservierung nutzt.

Bisher konnte nur durch Selektion individueller Spermien eine hohe Trenngenaugigkeit und Wiederholbarkeit gewährleistet werden. Grundlage für ein individuelles Trennverfahren ist der DNA-Unterschied zwischen X- und Y- Chromosom tragenden Spermien, der speziesspezifisch ist und beim Rind 3,8% beträgt. Zur technischen Nutzung dieses Unterschiedes werden die frisch gewonnenen Ejakulate mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst 33342) angefärbt und in einem modifizierten Flowzytometer (z.B. MoFlo®; Dakocytomation) die Spermienpopulationen voneinander getrennt. Unmittelbar nach dem Trennvorgang kann durch Reanalyse eines Aliquots der gesexten Spermien die Reinheit der Spermienfraktion bestimmt und damit das voraussichtliche Geschlecht der Nachkommen garantiert werden. Üblich sind heute Reinheitsgrade über 90%.

Bis Mitte der 90iger Jahre wurden Flowzytometer für die Spermientrennung eingesetzt, die noch nicht auf die spezielle paddelförmige Gestalt der Spermien eingerichtet waren. Pro Stunde wurden damals ca. 350.000 Spermien je Geschlecht sortiert. Diese geringe Spermienmenge konnte nur über den Umweg der In-vitro-Befruchtung zur Nachkommenerstellung genutzt werden. Entsprechend wurden die ersten Kälber 1992 in vitro erzeugt.

Mit Einführung der Hochgeschwindigkeits-Flowzytometrie waren ab 1996 deutlich höhere Sortieraten realisierbar und nach Anpassung des Düsensystems gelangen Sortieraten von 5 Mio. Spermien pro Stunde und Geschlechtsmerkmal. Mittlerweile können durch weitere Modifikationen bis zu 15 Millionen Samenzellen pro Stunde getrennt werden. Dies reicht für die Besamung von 5 bis 7 Färsen, um Kälber unter Verwendung der üblichen Besamungstechnik mit gesextem Tiefgefriersperma zu produzieren. Hierbei wird aber nur etwa ein Zehntel der üblicherweise bei der Besamung verwendeten Spermienmenge eingesetzt. Diese geringe Spermienmenge bleibt z.Zt. ein Kompromiss, der einzugehen ist, um die Besamung mit gesextem Sperma rentabel zu machen. Üblicherweise werden für die Besamung mit tiefgefrorenem Bullensperma 15 bis 20 Millionen Samenzellen verwendet. Dabei ist eine relativ große Sicherheitsreserve eingeplant, die u.a. Qualitätsschwankungen zwischen Ejakulaten und Bullen kompensiert. Frühere Untersuchungen hatten aber bereits gezeigt, dass der maximal mögliche Verdünnungsgrad bullenabhängig ist.

¹ Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institut für Tierzucht, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig, tz@fal.de

Je weniger Spermien zur Verfügung stehen und damit Kompensationsmöglichkeiten innerhalb der Spermienpopulation reduziert werden, umso mehr treten Mängel fertilitätsbeeinflussender Faktoren wie Samenqualität, allgemeine Fruchtbarkeitslage und Herdenmanagement, Zyklusdiagnostik, Wahl des Besamungszeitpunktes, Ort der Spermienablage im Genitaltrakt sowie die Handhabung des Spermas nach dem Auftauen zu Tage. Für das Spektrum der zur Spermiesortierung geeigneten Bullen ist also weniger die Belastung durch die Trennung entscheidend sondern das Kompensationspotential der Spermien innerhalb eines hoch verdünnten Ejakulates. Dies führt dazu, dass nur ausgewählte Bullen zum Einsatz kommen, eine Limitierung, die aller Voraussicht nach solange bestehen bleibt, bis die Sortiergeschwindigkeit, die bei den z.Zt. verwendeten Verfahren einer individuellen Samenzellerkennung und -sortierung kaum mehr zu steigern ist.

Der eigentliche Sortierprozess stellt zusätzlich eine Belastung der Spermien dar und sensibilisiert diese gegenüber weiteren biotechnischen Behandlungen wie den Einfrierprozess. Empfehlungen zur Verwendung von gesextem Bullensperma hatten daher bislang deren reduzierte Lebensdauer nach dem Auftauen zu berücksichtigen und waren auf genaue Informationen des zu erwartenden Ovulationszeitpunktes angewiesen. Nichtbeachtung bei spontan brünstigen Färsen und Kühen führten zum Teil zu erheblich reduzierten Fruchtbarkeitsraten. Untersuchungen in Mariensee zeigten, dass die Anfangsmotilität sortierter aufgetauter Spermien sich zunächst nicht von den unsortierten unterscheidet. Wurden die Spermien aber einem Thermobelastungstext unterzogen, der die Verhältnisse in der Gebärmutter nachbildet, so sank die Bewegungsaktivität innerhalb von drei Stunden extrem ab und führte zu unbefriedigenden Besamungsergebnissen, wenn die Besamung nicht ovulationsnah erfolgte.

Als wesentliche Quelle der reduzierten Spermienbeweglichkeit vermuten wir die Exposition im elektrischen Feld, das die Spermien voneinander trennt. Durch Zusatz von Schutzsubstanzen (Sexcess®) zum Sortierverdünner und Anpassung von Sortiervorgang und Tiefgefrierprozess, ist es uns gelungen, die Bewegungsaktivität der Spermien nach dem Auftauen deutlich zu verlängern und fast die gleiche Lebensdauer wie bei ungesextem Tiefgefriersperma zu erreichen. Hierdurch kann die Besamung nun zumindest bei Färsen zum üblichen Zeitpunkt erfolgen und das Sperma mit dem gewohnten Besamungsinstrumentarium in den weiblichen Genitaltrakt verbracht werden. Trächtigkeitsraten und Abkalbergebnisse unterschieden sich in entsprechenden Feldversuchen nicht mehr.

Unklar bleibt, warum bei der Besamung von Kühen mit hochverdünntem Sperma wesentlich schlechtere Befruchtungsergebnisse zu registrieren sind. Sicherlich ist die Fertilitätsrate insgesamt bei Kühen in Abhängigkeit von ihrer Milchleistung geringer, aber es müssen weitere Umstände hinzukommen, die die Besamung mit gesextem Tiefgefriersperma reduzieren. Denkbar wäre ein gegenüber Färsen veränderter Spermientransport durch den weiblichen Genitaltrakt sowie eine differenziertere Immunantwort auf Spermien.

In einem Versuch wurde kürzlich dieser Fragestellung nachgegangen. Kühe und Färsen wurden nach spontaner sowie induzierter Brunst mit verschiedenen Spermapräparationen belegt und der Einstrom von Abwehrzellen in die Gebärmutter überprüft. Frühere Untersuchungen bei Pferd und Schwein hatten gezeigt, dass unmittelbar nach der Besamung massiv neutrophile Leukozyten in das Uteruslumen einwandern. Beim Rind konnte dies nicht bestätigt werden. Weder mit unbehandeltem Sperma noch mit gesextem oder mechanisch belastetem Sperma konnte ein Reiz gesetzt werden, der den Einstrom der Abwehrzellen provozierte. Auch unterschiedliche Verdünnungszusätze hatten keine Wirkung. Lediglich uteruswandständige Granulozyten, die sich im In-vitro-Experiment enzymatisch mit Accutase ablösen ließen, waren in der Rückspülflüssigkeit zu finden; dies war aber von der Spermienpräparation unabhängig und auch gesexzte Spermien führten zu keiner Gewebsreaktion. In der elektronenmikroskopischen und histologischen Analyse von Bioptaten, die nach der Belegung gewonnen wurden, zeigten sich keine Reaktionen auf Inseminate. Die physiologischen Bedingungen im Rinderuterus sind also gänzlich anders als bei Schwein und Pferd, was evtl. mit der natürlichen Samendeponierung bei der Bedeckung in Zusammenhang steht. Schwein und Pferd sind „Uterusbesamer“, die Spermien Selektion findet vorwiegend an der utero-tubalen Verbindung statt, das Rind ist „Scheidenbesamer“ eine Auswahl der Samenzellen erfolgt bereits bei der Passage durch den Gebärmutterhalskanal. Eine Klärung der beobachteten Unterschiede zwischen Färsen und Kühen können aus den Untersuchungen aber nicht abgeleitet werden und bleiben weiterhin Gegenstand intensiver Versuche.

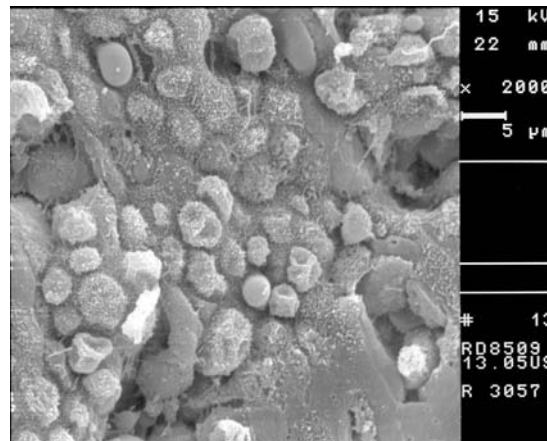


Abbildung 1: Nach Besamung mit verschiedenen Spermienpräparation erfolgte kein Einstrom von Abwehrzellen in den Uterus des Rindes. Im elektronenmikroskopischen Bild fanden sich offensichtlich festsitzende, gewebeständige Abwehrzellen. Nach Herauslösen in einem Ex vivo-Versuch mit dem Enzym Accutase und flowzytometrischer Auswertung stellte sich heraus, dass es sich um spezielle Lymphozyten, nicht aber um Fresszellen (wie z.B. beim Schwein) handelt.

Ist der Einsatz von gesextem Sperma also bereits praxistauglich? Dies kann positiv beantwortet werden, sofern eine Reihe von Einschränkungen befolgt werden. Für den rentablen Einsatz von gesextem Bullensperma muss zur Zeit empfohlen werden, nur Sperma von ausgewählten Bullen einzusetzen, das auf seine Tauglichkeit für den Sortierprozess getestet wurde. Es sollten zurzeit nur Färsen belegt werden, wobei die Spermienkonzentration 2 Millionen lebende, (motile und akrosomintakte) Samenzellen nicht unterschreiten darf. Die Verwendung von Sexcess® scheint eine gute Voraussetzung für Fruchtbarkeitsraten zu bieten, die denen der normalen Besamung entsprechen. Um sicherzustellen, dass im Routinebetrieb nur genau kontrolliertes gesextes Sperma zum Einsatz kommt, sollte der Spermaanbieter sich verpflichten, über die Trenngenauigkeit der Einzelejakulate Protokoll zu führen und die Spermaqualität im Belastungstest zu überwachen.

Um für die Besamungsstation rentabel zu sein, bedarf es weiterer Optimierungen der Sortiertechnik. Zurzeit müssen Produktionskosten von mindestens 30 € pro Besamungsportion kalkuliert werden, die vor allem durch hohe Lizenzabgaben zur Nutzung der Technik und Personalkosten für den Betrieb der Anlage entstehen. Die Entwicklung von Optimierungsschritten und Alternativen sind Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten und werden in absehbarer Zeit zur Einführung der Spermientrennung in der Rinderzucht führen.

