

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Swim-up-Verfahren für equine Spermien entwickelt und hinsichtlich seiner Eignung als diagnostische Methode für Hengstsperma überprüft werden. In orientierenden Vorversuchen wurden verschiedene methodische Einzelaspekte bearbeitet. In den sich anschließenden Hauptversuchen erfolgte eine systematische Überprüfung methodischer Einflußgrößen wie Inkubationstemperatur und -dauer, Spermiodosierung in der Ausgangsprobe und die Anwendung unterschiedlicher Kulturmedien. In einer gesonderten Versuchsserie fand der Swim-up-Test Anwendung bei konserviertem Sperma.

In den Untersuchungen der Vorversuche kam Sperma von drei klinikeigenen Hengsten sowie von sechs Klinikpatienten zum Einsatz. Für die Hauptversuche stand Sperma von jeweils acht Stationshengsten, die in der Frischsamenübertragung eingesetzt wurden, zur Verfügung. Die von diesen Hengsten ermittelten Befruchtungsraten sind in die Korrelationsberechnungen der Hauptversuche eingegangen. Beurteilungskriterien waren die Swim-up-Rate, der Anteil motiler, der Anteil lebender sowie der Prozentsatz morphologisch intakter Spermienformen, wobei die Ergebnisse mit den Befunden der Ausgangsprobe verglichen wurden.

Die Ergebnisse der Arbeit können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

1. Für die Durchführung des Swim-up-Tests ist es notwendig, die zu prüfende Spermprobe zu verdünnen, zu zentrifugieren und danach mit dem Swim-up-Medium zu überschichten. Als Inkubationsröhrchen eignen sich vornehmlich Zentrifugationsröhrchen mit rundem Boden, die während der Inkubation in eine schräge Position (45°-Winkel) gebracht werden, so daß eine größere Kontaktfläche zwischen dem Sperma und dem Kulturmedium erzielt wird.

2. Bei der vergleichenden Prüfung verschiedener Inkubationstemperaturen konnten bei 30°C signifikant höhere Swim-up-Raten erzielt werden als bei 20 und 39°C. Nach unterschiedlich langer Inkubation (1, 2, 3 Stunden) ergaben sich keine unterschiedlichen Swim-up-Raten. In bezug auf die Vorwärts- und Gesamtmotilität sowie den Anteil lebender Spermien in der Swim-up-Fraktion wurden nach Inkubation bei 20 und 30°C höhere Werte (teilweise signifikant) als bei 39°C ermittelt. Mit zunehmender Inkubationsdauer zeigten diese Parameter abnehmende Tendenz und nach dreistündiger Inkubation bestanden signifikante Unterschiede ($p < 0,05$).

3. Um zu prüfen, ob die Spermienzahl in der Ausgangsprobe das Swim-up-Resultat beeinflusst, kamen drei unterschiedliche Spermiodosierungen (15, 25, bzw. 50 x10⁶ Spermien pro 0,5 ml) zur Anwendung. Die Swim-up-Rate verringerte sich tendenziell (zwischen 15 x 10⁶ und 25 bzw. 50 x 10⁶ Spermien) und signifikant (zwischen 25 und 50 x 10⁶ Spermien) mit zunehmender Spermiodosierung in der Ausgangsprobe ($p < 0,05$).

4. Die vergleichende Prüfung der drei Kulturmedien (TALP mit 0,6 % BSA, HAM'S F-10 mit 7,5 bzw. 12,5 % FCS) ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Swim-up-Rate, Motilität sowie dem Anteil lebender Spermien).

5. Der Swim-up-Test mit konserviertem Hengstsperma zeigte mit zunehmender Konservierungsdauer (0, 6, 9 bzw. 24 Stunden) zwischen null- und sechsständiger sowie zwischen sechs bzw. neun- und 24ständiger Samenkonservierung eine signifikante Abnahme in den Swim-up-Raten ($p < 0,05$). Nach 24ständiger Samenkonservierung konnte ein quantitativ auswertbares Swim-up-Ergebnis nur bei der Durchführung des Tests bei 30 und 39⁰C, nicht aber bei 20⁰C erzielt werden. Im Unterschied zur Swim-up-Rate blieben die Anteile motiler, lebender und morphologisch veränderter Spermien in der Swim-up-Fraktion bei dem bis zu neun Stunden konservierten Sperma weitgehend konstant, signifikante Unterschiede bestanden erst nach 24ständiger Samenkonservierung. Die Motilität, der Anteil lebender sowie morphologisch intakter Spermien waren bei einer Inkubationstemperatur von 20 bzw. 30⁰C signifikant höher als bei 39⁰C ($p < 0,05$). Nach 24ständiger Konservierung stiegen die genannten Parameter bei der Inkubationstemperaturen von 39⁰C signifikant an ($p < 0,05$).

6. Zwischen der Motilität der Samenausgangsproben und der Swim-up-Rate konnte eine signifikante Korrelation ermittelt werden ($r = 0,99$; $p < 0,01$). Zwischen dem Anteil morphologisch veränderter Spermien der Ausgangsprobe und der Swim-up-Rate bestand eine hohe negative aber nicht statistisch abzusichernde Beziehung ($r = -0,91$; $p > 0,05$).

Zwischen den Motilitätsbefunden der Ausgangsproben sowie den Swim-up-Raten der in der Versuchsserie 4 des Hauptversuches eingesetzten Hengste konnten zwar keine signifikanten Korrelationen zur Befruchtungsrate ermittelt werden, infolge ihrer numerischen Höhe ($r = 0,96$ bzw. $r = 0,93$) sind diese Korrelationen dennoch von praktischer Bedeutung für die Bewertung von Hengstsamen.

The Swim-Up Test as a Criterium for the Judgement of Stallion Semen

6 SUMMARY

In the present study a swim-up test was to be developed for use with equine spermatozoa, and its suitability as a diagnostic method for stallion semen was to be tested. Various methodical aspects were worked out in informative preliminary tests. In the following main tests, methodical parameters, such as temperature and length of incubation, sperm doses in extended samples, and the use of various culture media, were systematically tested. In a separate series of tests the swim-up test was used with conserved semen.

Semen from three clinic-owned stallions and from six clinic patients was used in the investigations of the preliminary tests. Semen from eight insemination station stallions, which were used for insemination with fresh semen, was available for the main experiments. The fertilization rates obtained with these stallions were used in the correlation calculations of the main experiments. Criteria for judgement were the swim-up rate and the percentages of motile spermatozoa, live spermatozoa, and morphologically intact spermatozoa, whereby these results were compared with the results obtained with extended semen.

The results of these studies can be summarized as follows:

1. In carrying out the swim-up test it is necessary that the semen sample to be tested is extended, centrifuged, and then covered with swim-up medium. Centrifugation tubes with round bottoms, which can be slanted at 45° during incubation to increase the area of contact between the semen and the culture medium, are especially suited as incubation tubes.

2. The comparative testing of various incubation temperatures showed that significantly higher swim-up rates could be obtained at 30°C than at 20 or at 39°C. Differences in swim-up rates were not seen after various times of incubation (1, 2, or 3h). In regards to progressive motility and total motility, as well as the percentage of live spermatozoa, higher values were obtained after incubation at 20 and 30°C (in part

significant) than at 39°C. These parameters tended to decrease as the times of incubation increased, and significant differences ($p < 0.05$) were seen after incubation for 3h.

3. In order to test whether or not the sperm count in the extended samples influenced the swim-up results, three different sperm doses were used: 15, 25, and 50 x 10⁶ spermatozoa/0.5 ml. The swim-up rate tended to drop with increasing numbers of spermatozoa in the extended samples (between 15, 25, and 50 x 10⁶ spermatozoa). This reduction was significant between 25 and 50 x 10⁶ spermatozoa.

4. Comparative testing of three culture media (TALP with 0.6 % BSA, HAM'S F-10 with 7.5 or 12.5 % FCS) showed no significant differences in terms of the swim-up rate, motility, or proportion of live sperm.

5. With increasing times of conservation (0, 6, 9, and 24h) the swim-up test with conserved stallion semen showed a significant reduction in swim-up rates between zero and six hours and between six, nine and 24 hours. After conservation for 24h, results suitable for quantitative calculations could be obtained with tests carried out at 30 and 39°C, but not with tests carried out at 20°C. In contrast to the swim-up rate, the proportions of motile, of live, and of morphologically intact spermatozoa in the swim-up fraction remained largely constant. Significant differences were first seen after conservation for 24h. The motility and the proportions of live as well as of morphologically intact spermatozoa were significantly higher at incubation temperatures of 20 and 30°C than at 39°C ($p < 0.05$). After conservation for 24h, these parameters rose significantly, when samples were incubated at 39°C ($p < 0.05$).

6. A significant correlation was shown between the motility of the extended semen and the swim-up rate ($r = 0.99$, $p < 0.01$). A highly negative, but statistically non-verifiable relationship existed between the proportion of morphologically altered spermatozoa of the extended semen and the swim-up rate ($r = -0.91$, $p > 0.05$).

Although the correlations shown between the motility of the extended semen and the swim-up-rates with the fertilization rates of the stallions used in test series four of the main experiment ($r = 0.96$ and $r = 0.93$) were not significant, they are never the less of practical importance in the evaluation of stallion semen, due to their numerical magnitude.