

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Beeinflussung des bovinen Serumalbumins auf die Motilität und Morphologie von frischkonserviertem Hengstsperma zu überprüfen. Des Weiteren wurden unterschiedliche Aufbereitungs- und Lagerungsverfahren untersucht.

Im Rahmen von Vorversuchen wurde der BSA-Handelstyp 11930 "Albumin aus Rinderserum, Fraktion V, Standard Qualität" in einer Konzentration von 0,5% als erfolgreichste Komponente hinsichtlich der Motilitätserhaltung ermittelt.

Im Hauptversuch wurden 18 Ejakulate von 6 Hengsten in die Studie einbezogen. Es wurden die Standardverdünnungsverfahren (Magermilchverdünner nicht zentrifugiert bzw. Eidotter-Glycinverdünner zentrifugiert und nicht zentrifugiert) mit und ohne BSA-Zusatz untersucht. Die Samenproben mit den jeweiligen Verdünnungsmedien wurden bei + 5°C mit und ohne Rollbank gelagert. Als Prüfparameter dienten Spermienmotilität und Akrosomintegrität.

An den im split-sample Verfahren verdünnten Samenproben wurde unmittelbar nach der Verdünnung sowie nach 12, 24, 36 und 48 Stunden eine Motilitätsschätzung durchgeführt. Zusätzlich wurden nach 8 und 24 Stunden Ausstriche angefertigt. Diese wurden nach der Spermac<sup>R</sup>-Färbemethode sowie einem modifizierten Dual-Stain-Verfahren nach Didion et al (1989) hinsichtlich der spermalen Akrosomintegrität überprüft.

Abschließend wurde mit dem BSA-haltigen Magermilchverdünner ein orientierender Besamungsversuch vorgenommen.

Es wurden folgende Einzelergebnisse erzielt:

#### 1. BSA-Zusatz

Die Verdünner mit dem Zusatz von 0,5% BSA zeichneten sich durch eine längere Aufrechterhaltung der Spermienmotilität aus, der 48-Stundenwert mit dem Eidotter-Glycinverdünner ohne Zentrifugation beträgt ohne BSA 11,7% vorwärtsmotile Spermien, mit BSA dagegen 16,4%. Der Anteil motiler Spermien stieg im Anschluß an die Verdünnung (Magermilchverdünner ohne BSA: 54,3%; Magermilchverdünner mit BSA: 64,4%).

Hierbei stieg sowohl der Anteil ortsbeweglicher als auch, in geringerem Grad die die Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien. Diese Tendenz wurde besonders deutlich bei dem Magermilchverdünner mit BSA-Zusatz.

Das beste Resultat erzielte das Zentrifugationsverfahren mit dem BSA-haltigen Eidotter-Glycinverdünner bei Lagerung auf der Rollbank. Es wurde ein Prozentsatz von 34,5% vorwärtsmotilen Spermien erreicht, ohne BSA-Zusatz 29,9%.

## 2. Verdünner

Das Zentrifugationsverfahren mit dem Eidotter-Glycinverdünner (48-Stundenwert ohne BSA: 29,9%) zeigte sich den Verdünnungsverfahren mit dem Magermilchverdünner (48-Stundenwert ohne BSA: 3,9%) sowie dem Eidotter-Glycinverdünner ohne Zentrifugation (48-Stundenwert ohne BSA: 7,1%) hinsichtlich der Motilitätserhaltung und Akrosomintegrität deutlich überlegen. Der Magermilchverdünner, auch mit BSA-Zusatz, unterschritt nach 36 Stunden die 20% Motilitätsrate.

Der Eidotter-Glycinverdünner, ohne Zentrifugation, nimmt eine Mittelstellung zwischen den beiden anderen Verdünnungsverfahren ein.

## 3. Akrosomstatus

Die Ergebnisse lassen generell einen günstigen Effekt einer BSA-Zumischung erkennen, ohne eine Beeinflussung der lichtmikroskopisch erfaßbaren Konfiguration der Akrosommembran erkennen zu lassen.

Das Zentrifugationsverfahren mit dem Eidotter-Glycinverdünner, mit und ohne BSA-Zusatz, zeichnet sich durch eine statistisch auffällig geringe Anzahl von Kopfkappenschäden aus. Ohne BSA-Zusatz zeigen 89,3% der Spermien einen normalen apikalen Rand (mit BSA-Zusatz:  $\bar{x}$  = 88,6%).

Der Magermilchverdünner ohne BSA-Zusatz zeigte hinsichtlich der Akrosomintegrität die schlechtesten Resultate. Nach 24 Stunden besitzen lediglich 81,9% der Spermien einen normalen apikalen Rand, mit dem Zusatz von BSA zu diesem Verdünnungsverfahren wurde mit 82,8% ein geringgradig besseres Ergebniss erzielt

## 4. Rollbank

Die Rollbank zeigte bei den Samenproben, die mit dem Eidotter-Glycinverdünner (ohne Zentrifugation) aufbereitet worden waren, einen erheblichen motilitätserhaltenden Effekt. Nach 48 Stunden wurde mit dem Eidotter-Glycinverdünner ohne BSA-Zusatz 7,1% vorwärtsbewegliche Spermien, bei Lagerung auf der Rollbank 11,7% erzielt.

Mit dem BSA-haltigen Eidotter-Glycinverdünner wurden 9,8% vorwärtsbewegliche Spermien erreicht, mit der Rollbank dagegen 16,4%. Bei den magermilchverdünnten Proben zeigte sich lediglich ein tendenzieller Anstieg der Anzahl ortsbeweglicher Spermien. Die Zahl der vorwärtsbeweglichen Spermien erfuhr keine statistisch auffällige Verbesserung durch die Rollbank.

#### 5. Hengstindividueller Einfluß

Es besteht eine hengstindividuelle Beeinflußung der hinsichtlich der verschiedenen Aufbereitungsverfahren sowie auch der BSA-Wirkung. Ein Hengst reagierte auf den BSA-Zusatz grundsätzlich mit einer 20%igen Erhöhung der ortsbeweglichen Spermien, um diese Prozentzahl sank die Anzahl vorwärtsbeweglicher Spermien.

#### 6. Besamungsversuch

Da saisonale Einflüsse nicht berücksichtigt wurden sowie sehr ungünstige Fruchtbarkeitsaussichten der besamten Stutengruppe bestanden (31% roßten zum dritten- oder viertenmal um), besitzt dieser Versuchsabschnitt zu wenig Aussagekraft.

#### 7. Färbemethoden

Das modifizierte Dual-Stain Verfahren ermöglicht eine gleichzeitige Beurteilung der Lebensfähigkeit sowie des akrosomalen Status der Spermien. Diese Färbemethode erscheint gleichermaßen geeignet für die Anfärbung von magermilchverdünnten als auch eidotter-glycinverdünnten Samenproben.

Bei der Spermac<sup>R</sup>-Färbemethode wiesen die Ausstriche, die von den eidotter-glycinverdünnten Proben stammten, eine geringere Affinität zu dem grünen Farbstoff auf als die Ausstriche der magermilchverdünnten Proben. Daher erwies sich die Beurteilung des apikalen Randes des Spermiums als schwieriger.

Influence of Bovine Serum Albumin (BSA) on motility and morphology of liquid stored stallion semen under the consideration of two different storage forms.

The objective of this study was to investigate the influence of bovine serum albumin on the motility and morphology of liquid stored stallion semen. Additionally, different preparation and storage methods were examined.

Preliminary studies showed, that the commercially used BSA-type 11930 "albumin of bovine serum, fraction V, standard quality" in a concentration of 0.5% was the most successful component with regard to motility preservation.

18 ejaculates of 6 stallions were included in the main study. The standard dilution methods (non-centrifuged skim milk extender respectively non-centrifuged and centrifuged egg yolk-glycine extender) were tested with or without BSA additives. The semen samples with the respective extender were stored at +5°C with and without rotation device. Sperm motility and acrosome integrity served as testing parameters.

The motility of the semen samples, which were diluted using split-sample method, was estimated immediately after dilution as well as after 12, 24, 36 and 48 hours.

In addition, smears were made after 8 and 24 hours. These were examined regarding the spermal acrosome integrity using a Spermac<sup>h</sup>-staining method as well as a modified Dual-Stain according DIDION et al. (1989).

Finally, an orientated insemination trial using the skim milk extender containing BSA was carried out.

The following singular results were obtained:

1. BSA additives

Extender with additions of 0.5% BSA displayed a longer preservation of sperm motility, after 48 hours the centrifugation method with the egg

yolk-glycine extender without BSA showed 11.7% sperms with forward movement, with BSA additives 16.4%.

The percentage of motile sperms increased following dilution (skim milk extender without BSA: 54.3%; skim milk extender with BSA: 64.4%), including both the rate of local movement and, to a lesser degree, the rate of forward movement. This tendency was especially distinct using the skim milk extender with BSA.

The best result was obtained using the centrifugation method with the egg yolk-glycine extender, BSA additives and rotation storage, 34.5 % sperms showing forward movement after 48 hours (without BSA 29.9%).

## 2. extenders

The centrifugation method with the egg yolk-glycine extender (48 hours without BSA: 29,9%) was superior to the dilution method using a 1:1 mixture of skim milk extender (48 hours without BSA: 3.9%) and semen and the egg yolk-glycine extender without centrifugation (48 hours without BSA: 7.1%) regarding the motility preservation and acrosome integrity.

Semen diluted with the skim milk extender, even with additives of BSA, fell below a motility rate of 20% after 36 hours. The egg yolk-glycine extender without centrifugation occupies a mid position between the two dilution method mentioned above.

## 3. acrosome status

The results generally showed a positive effect of BSA additives without having an influence on the configuration of the acrosome membrane examined by light microscopy. The centrifugation method, with or without BSA-additives, is distinguished by a statistically significantly low number of acrosomal damage.

Without BSA additives 89.3% of the sperms showed a normal apical ridge after 24 hours (with BSA:  $\bar{x} = 88,6$ ).

The skim milk extender without BSA showed the worst results regarding the acrosome integrity. After 24 hours merely 81.9% of the sperms showed a normal apical ridge; additives of BSA to this dilution method led to slightly better results.

#### 4. rotation storage

The rotation storage showed a significant effect on the motility preservation of semen samples diluted with egg yolk-glycine extender. After 48 hours the egg yolk-glycine extender without BSA additives resulted in 7.1% of sperms with forward movement, increasing to 11.7% after rotation storage.

9.8% of sperms with forward movement were obtained with the egg yolk-glycine extender, whereas the rotation method led to 16.4%. Samples diluted with skim milk showed merely an increasing tendency of the rate of local movement spermatozoa. The number of sperms with forward movement showed no statistically significant increase by using the rotation method.

#### 5. individual influence of stallions

An individual influence of the stallion can be observed concerning the semen treatment as well as the effect of BSA.

One of the stallions reacted to BSA additives principally with a 20% increase in sperms with local movement, related to a decrease in sperms with forward movement by the same percentage.

#### 6. insemination trial

The results of this part of the study are not confirmed since the fertility prospects of the insemination group of mares were unfavourable (31% of the mares returned to oestrus three or four times) and seasonal influences were not considered in the experiment.

#### 7. staining methods

The modified Dual-Stain allows a simultaneous evaluation of viability and acrosome status of spermatozoa. The staining method seems suitable for staining semen samples diluted with skim milk or egg yolk-glycine extender. Smears of samples diluted with the egg yolk-glycine extender that were stained using the Spermac<sup>R</sup> method showed a lower affinity to the green dye than smears of samples diluted with skim milk. An evaluation of the apical ridge of the spermatozoa is, therefore more difficult.