

Anhand von 36 Ejakulaten von sechs Warmbluthengsten wurde die Einsatzfähigkeit eines Swim-up-Verfahrens, der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation mit einem kontinuierlichen Gradienten und der Filtration durch eine Glaswoll- und eine Glaswoll-Sephadex-Säule zur Selektion motiler und morphologisch intakter Spermien vergleichend geprüft. Anschließend wurden die Methoden bezüglich ihrer diagnostischen Bedeutung bewertet.

Zur Verdünnung der Ejakulate wurden zwei kommerzielle Verdüner, die Magermilch bzw. Glycin enthielten, eingesetzt.

Bewertet wurden Motilität, Morphologie und Vitalität des unverdünnten und verdünnten Samens vor und nach den Behandlungen, die Samenzellkonzentration der verdünnten Ausgangsprobe und die Rückgewinnungsraten bezüglich der Spermiengesamtzahl und der Anteile gesamt- und progressiv motiler Samenzellen.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Vorwärts- und die Gesamtmotilität von Frischsamen stieg bei Verwendung des Glycinverdünners von 50,4% bzw. 75,7% auf 65,8% bzw. 84,0% an. Bei Verwendung des Magermilchverdünners lagen die entsprechenden Werte bei 51,3% bzw. 76,4%. Der Glycinverdünner war schonender für die Spermienmorphologie.
2. Durch alle Selektionsverfahren wurden Zelldetritus, nichtspemale Zellen und nichtzelluläre Partikel vom übrigen Ejakulat abgetrennt.
3. Durch den Swim-up wurden Vorwärts- und Gesamtmotilität von 57,7% bzw. 79,6% auf 74,0% bzw. 87,9% verbessert und die Bewegungsgeschwindigkeit erhöht. Auffällig war die Verringerung morphologisch abweichender Formen im Kopf- und vor allem im Schwanzbereich. Die Vitalität blieb unbeeinflusst. Das deutet auf einen von der aktiven Eigenbewegung der Spermien abhängigen Selektionsmechanismus hin, der nur die motilsten Zellen selektiert, da die Schwimmbewegung entgegen der Schwerkraft gerichtet ist.

Daher liegt die Spermienausbeute zumeist unter 10%, was einen über diagnostische Gesichtspunkte hinausgehenden Einsatz bei Hengstsperma ausschließt.

4. Bei der Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation verringerte sich der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien auf 32,4%. Die Gesamtmotilität stieg auf 86,3% an. Der Anteil an Kopfkappen mit geschwollenen oder vesikulären apikalen Rändern stieg an, und die Spermien neigten zur Agglutination. Der Prozentsatz lebender Spermien erhöhte sich signifikant von 92,1% auf 94,7%. Die Trennung erfolgt auf der Basis der Samenzelleigendichte unter Einfluß der Spermieigenbewegung. Die Rückgewinnungsraten waren mit 50%-63% für die Ausbeute gesamtmotiler Samenzellen am höchsten.

5. Bei der Glaswollfiltration stieg der Anteil vorwärts- bzw. gesamtbeweglicher Samenzellen statistisch auffällig auf 73,2% bzw. 87,8% an. Die Bewegungsgeschwindigkeit konnte erhöht und die morphologische Erscheinung, vor allem bezüglich der Kopfkappen, verbessert werden. Die Rückgewinnungsrate war für vorwärtsbewegliche Spermien mit durchschnittlich 42%-52% am größten. An der Membran beschädigte Spermien bleiben an den Glaswollfasern haften, tote und immotile Zellen passieren den Filter schlechter als motile. Zusätzlich spielen Schwerkraft und Spüleffekte eine Rolle.

6. Durch die Glaswoll-Sephadex-Filtration wurde die Vorwärtsmotilität auf 78,5% und die Gesamtbeweglichkeit auf 89,9% signifikant erhöht. Ebenfalls verbessert wurde der Anteil an lebenden Samenzellen mit normalen Köpfen. Im Vergleich zur Glaswollfiltration waren Geschwindigkeitserhöhung und Rückgewinnungsraten mit im Durchschnitt 47%-61% für progressiv motile Spermien höher. Der Selektionseffekt des Sephadex-Gels konnte nicht eindeutig geklärt werden, scheint aber von Interaktionen zwischen der Spermienplasmamembran und den Gelpartikeln abzuhängen.

7. Beim Vergleich der Verfahren untereinander unter zusätzlicher Berücksichtigung praktischer Gesichtspunkte (schnelle und unkomplizierte Durchführbarkeit, Kostenfaktor) erwies sich die Glaswoll-Sephadexsäulen-Filtration zur Selektion motiler, vitaler und morphologisch intakter Samenzellen als am

geeignetsten, wobei gleichzeitig der Einsatz eines glycinhaltigen Verdünners empfohlen wird.

8. Diagnostisch verwertbare signifikante Korrelationen mit Korrelationskoeffizienten von jeweils  $r=0,83$  ergaben sich zwischen der Vorwärtsmotilität der Swim-up-Fraktion und der Ausbeute bezüglich Gesamt- und motiler Spermienzahl. Bei der Glaswoll-Sephadex-Filtration waren die Progressivmotilität und die Gesamtausbeute mit einem Koeffizienten von  $r=0,81$  positiv korreliert. Negative Korrelationen zur Dichte bestanden für die Gesamtausbeute beim Swim-up und bei der Glaswoll-Filtration und für die Ausbeute motiler Spermien beim Swim-up. Die Korrelationskoeffizienten betrugen hierbei jeweils  $r=-0,89$ .

Mit der Befruchtungsrate ergaben sich keine sinnvollen korrelativen Beziehungen. Dies lag weniger am biologischen Zusammenhang zwischen Befruchtungsrate und Versuchsergebnissen als an den durch die stark unterschiedliche Frequentierung der Hengste teilweise sehr unterschiedlichen Besamungsvoraussetzungen.

**Influence of different spermatozoa collection methods on the motility, viability and morphology of equine sperm cells and their diagnostic significance**

**6 SUMMARY**

---

Using 36 ejaculates of six warm-blooded stallions, a swim-up technique, the Percoll density gradient centrifugation with a continuous gradient and the filtration through a glass wool- and a glass wool-sephadex column were examined comparatively considering the selection of motile and morphologically intact spermatozoa. Subsequently the methods were judged in regard to their diagnostic significance.

Two commercial extenders containing skim milk respectively glycine were used to dilute the ejaculates. The motility, morphology and viability of the undiluted and diluted semen before and after the treatments were determined. Additionally, the sperm cell concentration of the initially diluted sample was examined, as well as the recovery rate regarding the total number of spermatozoa and the percentage of total motility and progressive motility of spermatozoa.

The studies led to the following results:

1. The progressive and the total motility increased from 50,4% respectively 75,7% to 65,8% respectively 84,0% by utilization of the glycine extender. Employing the skim milk extender, the corresponding values were 51,3% respectively 76,4%. The glycine extender was less damaging to the sperm morphology.
2. By all selection techniques cell detritus, non-spermal cells and non-cellular particles were separated from the remaining ejaculate.

3. Employing the swim-up technique, forward and total motility were improved from 57,7% respectively 79,6% to 74,0% respectively 87,9%, and the velocity was increased. The decrease in morphologically deviating head and especially tail shapes was noticeable. The viability remained unimpaired. This indicates the presence of a selection mechanism that is dependant on the active movement of spermatozoa, since this movement is directed against gravity. The recovery rate of spermatozoa lies, therefore, mostly under 10%, so that a utilization of this method other than for diagnostic aspects can be excluded for stallion semen.

4. Through the Percoll density gradient centrifugation the percentage of progressively motile spermatozoa decreased to 32,4%. The total motility increased to 86,3%. Acrosomes with swollen or vesicular apical ridges increased, and the sperm cells showed a tendency to agglutinate. The percentage of viable spermatozoa increased significantly from 92,1% to 94,7%. The separation is a result of the sperm density influenced by the spermatozoa's own motility. The average sperm recovery rate was highest for total motility (50-63%).

5. Employing the glass wool filtration, the percentage of progressively respectively total motile sperm cells ascended statistically significant to 73,2% respectively 87,8%. The velocity increased, and the morphological appearance, especially concerning the acrosome, was improved. The recovery rate was highest for progressively motile spermatozoa at an average of 42-52%. Sperm cells with damaged membranes clung to the glass fibres, and dead and immotile cells did not pass the filter as well as motile sperms. Gravity and washing effects played an additional role.

6. The glass wool-sephadex filtration led to a significant increase of the progressive motility to 78,5% and of the total motility to 98,9%. The percentage of viable sperm cells with normal heads was also improved. The increase in velocity and the recovery rates (at an average of 47-61% for progressively motile sperms) were higher compared to the glass wool filtration. The selection effect due to the sephadex gel cannot be explained clearly, but it seems to be dependant on the interaction between the spermatozoa's plasma membrane and the gel particles.

7. A comparison of the methods with regard to practical points of view (fast and uncomplicated practicability, financial aspects) revealed a superiority of the glass wool-sephadex filtration in combination with the glycine extender concerning the selection of motile, viable and morphologically intact spermatozoa.

8. For diagnostic purposes significant correlations with correlation coefficients of  $r=0,83$  were found between the progressive motility of the swim-up fraction and the returns in total and motile sperm cells. Regarding the glass wool-sephadex filtration there was a positive correlation between the progressive motility and the total recovery rate with a coefficient of  $r=0,81$ . Negative correlations were evaluated between the cell density on the one hand and the total recovery rate of the swim-up and glass wool filtration technique and the recovery of motile sperms after swim-up on the other hand. The correlation coefficients were  $r=0,89$  each.

No meaningful correlations were found to the fertility rates. This was not so much due to the biological relationship between the fertility rates and the results of the study but due to great differences in insemination conditions caused by the strongly varying ejaculation frequencies of the stallions.