

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Anwendbarkeit humanmedizinischer Verfahren für die Selektion motiler und morphologisch intakter Hengstspermien sowie die Lagerungsfähigkeit dieser Samenzellpopulationen überprüft werden.

Für die Untersuchungen wurden 27 Ejakulate von neun, in der Frischsamenübertragung eingesetzten Warmbluthengsten herangezogen. Nach der Verdünnung der Ejakulate mit zwei üblichen Frischsamenverdünnern (Magermilchverdünner nach KENNEY et al. 1975, Glycinverdünner nach VAN DER HOLST 1984) im Verhältnis 1:1 wurden die drei folgenden Selektionsverfahren durchgeführt:

1. Glaswoll-Säulen-Filtration
2. Glaswoll-Sephadex-Säulen-Filtration
3. Swim-up-Methode

Bei Lagerung bei 5°C im Kühlschrank erfolgte die Untersuchung der einzelnen Proben nach 12, 24 und 36 Stunden.

Zur Bewertung wurden die Motilität, die Morphologie (Spermac^R-Färbung) und der Vitalitätsstatus (Dual-Stain-Methode) der jeweiligen Samenzellpopulationen (unverdünnt, verdünnt und selektiert) herangezogen.

Es stellten sich folgende Ergebnisse heraus:

1. Alle drei Selektionsmethoden steigerten im Vergleich zum Ausgangsmaterial die Anteile der vorwärts- sowie der vorwärts- und ortsbeweglichen Samenzellen.
2. Die drei angewandten Verfahren bewirkten eine Abtrennung des Zelldetritus und der nichtzellulären Bestandteile von den Samenzellen der Ausgangsejakulate.
3. Bei der Glaswoll-Säulen-Filtration konnte neben der Steigerung des Anteils der motilen Samenzellen eine leichte Erhöhung des Anteils der Samenzellen mit intakter Kopfkappe gegenüber der Nativprobe ermittelt werden. Im Filtrat wurden tote Spermien mit intaktem und abgelöstem Akrosom gefunden, was sowohl durch den Effekt der Schwerkraft als auch durch die Wirkung des Spülmediums erklärt werden kann. Im Verlauf der Lagerung stieg der Anteil der Samenzellen mit geschwollenem und vesikulärem apikalem Rand.

Es wurden nach 36 Stunden signifikant weniger lebende Spermien mit intaktem Akrosom sowie eine gestiegene Anzahl der toten Samenzellen mit intaktem Akrosom gefunden.

Die Vorwärts- und Gesamtmotilität der Samenzellen fiel schneller ab als ihre Vitalität.

4. Neben dem gesteigerten Anteil der motilen Spermien nach Glaswoll-Sephadex-Säulen-Filtration konnte eine höhere Anzahl der lebenden Samenzellen im Filtrat festgestellt werden.

Im Verlauf der Lagerung bei 5°C ergab sich eine Verschlechterung bezüglich der Motilität, der Morphologie und der Lebensfähigkeit. Die Vitalität, ermittelt durch die Verringerung des Anteils der lebenden Samenzellen mit intaktem Akrosom, sank im Verhältnis zur Motilität verlangsamt ab.

Bei den Veränderungen der Kopfkappe überwogen der geschwollene und der vesikuläre apikale Rand sowie die Ablösung des Akrosoms.

5. Nach dem anfangs gesteigerten Anteil der motilen Samenzellen durch die Swim-up-Methode nahm dieser bei der sich anschließenden Lagerung innerhalb von 24 Stunden rapide ab. Nach 36 Stunden konnte bei beiden Verdünnern keine Vorwärtsmotilität beobachtet werden.

Bezüglich der Morphologie kam es zu einer Zunahme der Spermien mit geschwollenem und vesikulärem apikalem Rand.

Der Vitalitätsstatus dieser Samenzellpopulationen sank während der Lagerung, jedoch langsamer als die Motilität.

Nach einer 24-stündigen Lagerung stellten sich in diesen Samenzellpopulationen Kopf-zu-Kopf-Agglutinationen ein, die bei der 36-Stunden-Kontrolle wieder etwas abgenommen hatten.

6. Der Umgang mit den beiden Filtrationsmethoden war bezüglich der Handhabung, Praktikabilität sowie der Anwendbarkeit leichter und schneller verglichen mit der Swim-up-Methode. Die glycinhaltigen, durch Glaswoll-Säulen-Filtration gewonnenen Proben wiesen im Hinblick auf die Motilität und Morphologie die besseren Werte auf.

7. Bei beiden hier angewandten Verdünnern kam es im Verlauf der Lagerung zur Motilitätsverringerng und zu Veränderungen der Kopfkappenmorphologie. Im Vergleich war der Glycinverdünner in der Anwendung günstiger für die Spermien als der Magermilchverdünner.

Ute Henric-Petri

The influence of three methods of sperm selection on motility and morphology of stallion sperms at different times of storage.

6 SUMMARY

In this study methods for selecting motile and morphologically intact sperms which are used in human medicine were tested in regard to their applicability on stallion sperms and to the influence of storage.

The study is based on 27 ejaculates of 9 crossbreed stallions, used in fresh semen insemination. The ejaculates were collected and diluted with two common fresh semen diluents (skim milk- and glycine extender) in a ratio of 1:1. Then three methods of selection were carried out:

1. Glaswool-column-filtration
2. Glaswool-sephadex-column-filtration
3. swim-up technique

After these selections the samples were stored at 5 °C in a refrigerator and examined after 12, 24 and 36 hours. The motility, morphology (Spermac^P-staining) and viability (dual-stain) of the sperms were evaluated in undiluted, diluted and selected state.

The following results were obtained:

1. All the tested methods of selection resulted in increased proportions of progressive as well as progressively and locally motile sperms.
2. With all the tested methods, cell detritus, non-spermal cells and non-cellular components were separated from the spermatozoa of the native ejaculates.
3. Compared with the native sample the glass-wool-filtration revealed a little higher proportion of spermatozoa with an intact acrosome in addition to a rise in motility. Dead sperms with intact and detached acrosomes could be found in the filtrate, which is believed to be an effect of gravity as well as an effect of the washing medium.

During storage the proportion of sperms with swollen and vesicular apical ridges increased.

After 36 hours significantly less living cells with intact acrosomes and a higher number of dead sperms with intact acrosomes could be seen.

Progressive and total motility of the sperms decreased more rapidly than their viability.

4. Using glasswool-sephadex-column-filtration, a higher proportion of motile and living sperms could be found in the filtrate.

During storage at 5 °C, the motility, morphology and viability of the sperms deteriorated. The viability, measured as the reduction of living sperms with intact acrosome, decreased more slowly than their motility.

Swollen and vesikular apical ridges and detached acrosomes were the most frequent acrosome defects.

5. By using the swim-up technique the proportion of motile sperms raised initially, but decreased rapidly within 24 hours. After 36 hours no progressive motility could be seen in both diluted samples.

The number of sperms with swollen and vesikular apical ridges increased. The viability of this sperm population decreased more slowly than the motility during storage.

After 24 hours of storage head-to-head-agglutinations were observed, which decreased slightly after 36 hours.

6. Handling with both filtration methods was easier and more practicable, compared to the swim-up technique. The glycine diluted samples, selected with glasswool-column-filtration, were more favourable in regard to motility and morphology.

7. With both extenders the motility decreased and the morphology of the acrosomes changed during storage. The glycine extender was superior to the skim-milk extender in regard to the viability of the spermatozoa.