

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der osmotischen Resistenz von HengstspERMien mittels hypoosmotischen Schwellungstests (HOST). Dieser wurde in 5 Stufen (300, 200, 150, 100 und 50 mOsmol/kg) im Seminalplasma und im Magermilchverdünner geprüft, wobei die osmotischen Effekte auf die HengstspERMien mittels Spermatokrit und Färbungen (Eosin und Dual Staining) erfaßt wurden. Insbesondere wurde Wert auf die Erkennung von Zusammenhängen zwischen osmotischer Resistenz von HengstspERMien und deren Konservierungseigenschaften gelegt.

In den vorliegenden Untersuchungen waren 156 Ejakulate von 13 Warmbluthengsten im Untersuchungszeitraum von März bis Juli der Zuchtsaison 1993 einbezogen.

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

- Mit den verwendeten Spermatokritmessungen konnte die Volumenreaktion von HengstspERMien unter verschiedenen osmotischen Bedingungen im Routinelabor bestimmt werden.

- Hohe Spermatokritwerte, die durch eine große Volumenreaktion der Samenzellen erklärt werden können, sowie ein hoher Anteil eosinungefärbter (lebender) SpERMien sind nach hypoosmotischer Belastung ein Hinweis für hohe osmotische Resistenz der Samenzellen. Die Samenzellen zeigen jedoch eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber dem hypoosmotischen Streiß abhängig vom Verdünnungsmedium und von der Zuchtsaison. Die höchste osmotische Resistenz der HengstspERMien wurde von März bis Juni im Magermilchverdünner und im Juli im Seminalplasma beobachtet. Diese lag im Durchschnitt bei einem Verdünnungsgrad von 100 mOsmol/kg.

- Die hypoosmotischen Bedingungen beeinflussen den Anteil an veränderten Haupt- und Endstücken der Samenzellen erheblich, wobei Bläschen am Schwanzbereich auftraten und am häufigsten bei 150 und 100 mOsmol/kg vorzufinden waren.

- Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hengsten hinsichtlich der Osmolalität und des pH-Wertes des Seminalplasma ermittelt.

- Während der hypoosmotischen Belastung der Samenzellen konnte kein signifikanter Einfluß auf das Akrosom der HengstspERMien mittels Dual-Stain-Methode beobachtet werden.

- Die Spermatokritmessungen und Vitalfärbung (Eosin) erwiesen sich als eine brauchbare Methode zur Untersuchung der Integrität der SpERMienmembran nach hypoosmotischer Belastung. Der Spermatokrit unterschied sich dabei von der

Eosinfärbung durch die Erfassung der funktionellen volumenregulatorischen Membranintegrität. Die Spermakritmessung sowie die Eosinfärbung nach dem hypoosmotischen Schwellungstest sind als zusätzliche Kriterien zur Samenqualitätsbeurteilung bei Hengsten geeignet.

-Es konnte ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der Befruchtungsrate aller Hengste und Motilität nachgewiesen werden. Eine signifikant positive Korrelation wurde auch zwischen der Befruchtungsrate und den Spermakritwerten (bei 100 mOsmol/kg) sowie dem Anteil eosinungefärbter (lebender) Spermien (bei 100 und 200 mOsmol/kg) nachgewiesen. Ferner wurde ein positiver Zusammenhang zwischen den Spermakritwerten und dem Anteil eosinungefärbter (lebender) Spermien bei 150 und 100 mOsmol/kg ermittelt. Auffallend war die starke Abnahme lebender Samenzellen und der Spermakritwerte zwischen 100 und 50 mOsmol/kg. Diese Abnahme zeigt die Verdünnungsstufen an, zwischen denen die höchste osmotische Belastbarkeit von Hengstspermien lag.

-Sowohl die Volumenreaktion der Samenzellen auf den osmotischen Stress als auch die Ergebnisse der Vitalfärbung zeigen ein tierspezifisches Verhalten, das mit der empirisch bestimmten Gefriertauglichkeit des Ejakulats der untersuchten Hengste korrespondiert.

Monique de Albuquerque Lagares

## **The Determination of the Osmotic Resistance of Stallion Spermatozoa**

### **6 SUMMARY**

The present study was designed to determine the osmotic resistance of stallion spermatozoa using the hypoosmotic swelling test (HOST). The osmotic resistance of spermatozoa in seminal plasma and in skim milk extender was tested under five different osmotic conditions (300, 200, 150, 100, and 50 mOsmol/kg), whereby the osmotic effect on the spermatozoa was measured with the spermatocrit technique and by staining (eosin and dual staining). Great importance was placed on discerning the relationship between the osmotic resistance of stallion spermatozoa and its preservation properties.

A total of 156 ejaculates obtained between March and July from 13 stallions during the 1993 breeding season were included in this study.

The results can be summarized as follows:

-The volume reaction of stallion spermatozoa under different osmotic conditions could be measured in the laboratory using the spermatocrit technique.

-High spermatocrit values, which could be explained by a large volume reaction of the spermatozoa, as well as a high percentage of unstained (live) spermatozoa with eosin stain after osmotic challenging are indicators of the high osmotic resistance of the spermatozoa. Nevertheless, the spermatozoa showed different sensitivities to the osmotic stress, depending on the extender used and the month the ejaculates were obtained. The highest osmotic resistance was seen between May and June for spermatozoa extended with skim milk extender, and in July for spermatozoa extended with seminal plasma. This was seen with an average extension level of 100 mOsmol/kg.

-The hypoosmotic conditions influence the proportion of altered sperm tails considerably, whereby vesicles were seen on the tail, and these most commonly between 150 and 100 mOsmol/kg.

-No significant differences were seen between the stallions with regard to the osmolality and the pH of the seminal plasma.

-No significant influence on the acrosome of stallion spermatozoa was seen during hypoosmotic challenging using the dual stain method.

-The spermatocrit measurements and the vital staining (eosin) proved to be a useful method to examining the integrity of the sperm plasma membrane under hypoosmotic conditions. In this respect the spermatocrit differs from eosin staining in that it measures the functional volume-regulatory plasma membrane integrity. Spermatocrit measurement and eosin staining after HOST are suited as additional criteria for evaluating the semen of stallions.

-A significant positive correlation was seen between the fertilization rate and sperm motility. A significant positive correlation was also seen between the fertilization rate and spermatocrit values (at 100 mOsmol/kg) and the number of cells unstained (live) by eosin (at 100 and 200 mOsmol/kg). Furthermore, a significant positive correlation was seen between the spermatocrit values and the percentage of cells unstained (live) by eosin at 150 and 100 mOsmol/kg. There was a remarkably large decrease in the number of live cells and the spermatocrit between 100 and 50 mOsmol/kg. This decrease shows the dilution levels where the highest osmotic stress of stallion spermatozoa occurs.

-The volume reaction of stallion spermatozoa to osmotic conditions as well as the vital stain results shows an animal-specific behaviour, which corresponds to the freezing suitability of the stallion ejaculates examined.