

Die Beschaffenheit von Hengstejakulaten außerhalb der Paarungssaison und deren Einfluß auf die TG-Konservierung

J. Braun¹, E. Wolpert² und W. Leidl¹

Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik der Universität München, Lehrstuhl Prof. Dr. W. Leidl¹ und Bayerisches Haupt- und Landgestüt Schwaiganger²

Einleitung

Die KB beim Pferd wird zunehmend von den verantwortlichen Zuchtverbänden als Instrument der Zuchtplanung anerkannt. Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Verwendung von Tiefgefrier-Sperma (TG-Sperma) zu. Gegenüber der Verwendung von Frischsamen bietet die KB mit TG-Samen den entscheidenden Vorteil, den Samen eines bestimmten Hengstes jederzeit und überall in der Zucht einsetzen zu können. Dies schließt auch die Anlage von Samenreserven ein, die das genetische Potential von Beschälern sichern helfen. Darüber hinaus ist durch den Einsatz der TG-Konservierung und KB eine effektive Nutzung der Kapazität eines Hengstes möglich (Haring, 1985). Die heute übliche Art der TG-Konservierung basiert auf der von Martin et al. (1979) entwickelten Methode der Konfektionierung in Makropailletten. Dabei wird der Nativsamen zuerst mit einem Glukose-EDTA-Verdüner gemischt und zentrifugiert. Danach erfolgt erst die Zugabe eines glycerinhaltigen Laktose-Eidotter-Verdüners sowie die Konfektionierung. Inzwischen wird auf der Basis dieses Verfahrens versucht, durch Modifizierungen z. B. der Zentrifugationsstärke, der Art des vor der Zentrifugation zugesetzten Verdüners sowie der Konfektionierungsgröße eine Verbesserung des Befruchtungsvermögens von TG-Spermaproben zu erreichen (Loomis et al., 1983; Cochran et al., 1984; Cristanelli et al., 1984).

Angesichts des in jedem Fall beträchtlichen Aufwandes für die Samenkonservierung beim Hengst ist es von Interesse, mehr über die Ausnutzungsquote von Ejakulaten zu wissen. Entscheidend ist die Zahl lebender, d. h. motiler Spermien, die nach dem Auftauen für die KB zur Verfügung steht. Diese Zahl wird primär bestimmt von den Ausgangswerten im Frischsamen sowie von der Art und Qualität des Einfriervorganges. Letztendlich bestimmt dann die gewählte Besamungsdosis, wieviel Besamungen pro konfektionier-

Zusammenfassung:

In der Zeit von Oktober bis Januar wurden 26 Ejakulate von 5 Warmblut-Hengsten und 17 Ejakulate eines Araberhengstes für die TG-Konservierung gewonnen. Bei den WB-Hengsten betrug das durchschnittliche Volumen 61 ml (ohne Schleim 44 ml), die Spermiedichte $504 \times 10^6/\text{ml}$ und die daraus errechnete Gesamtspermienzahl pro Ejakulat $19,7 \times 10^9$. 68 Prozent der Spermien waren vorwärtsbeweglich, der Anteil von Spermien mit morphologischen Anomalien betrug 11 Prozent. Ejakulate ohne Samenblasensekret ($n = 10$) wiesen eine höhere Gesamtspermienzahl auf ($24,2 \times 10^9$) als Ejakulate mit Schleimanteilen ($n = 16$; $16,8 \times 10^9$). In Ejakulaten, die nach längeren Deckpausen (> 60 Tage) gewonnen worden waren, wurden signifikant mehr Spermien ausgeschieden als nach kürzeren Deckpausen (1–2 Tage oder 3–8 Tage). Das Vorkommen von Samenblasensekret sowie die Länge der vorhergehenden Deckruhe beeinflusste nicht die Motilität und den Anteil von Spermien mit morphologischen Anomalien. In den 17 Ejakulaten des Araberhengstes, die alle schleimige Anteile enthielten, wurden folgende Samenparameter ermittelt: Volumen 38 ml, Volumen ohne Schleim 27 ml, Spermiedichte 215×10^6 Spermien/ml, Spermiengesamtzahl $5,3 \times 10^9$, Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien 63 Prozent und 11 Prozent Spermienanomalien.

Alle Ejakulate wurden entsprechend der Methode von Martin et al. (1979) in Makropailletten eingefroren. Nach der dazu notwendigen Zentrifugation des verdünnten Samens (650 g, 10 Minuten) waren bei den WB-Hengsten nur noch 52 Prozent der ursprünglichen Spermienzahl im resuspendierten Sediment nachzuweisen. In Ejakulaten ohne Schleimanteil betrug dieser Anteil 59 Prozent gegenüber 48 Prozent in Ejakulaten mit Samenblasensekret. Bei dem Araberhengst reduzierte sich die Spermienzahl durch die Zentrifugation auf 53 Prozent des Ausgangswertes.

Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien in aufgetauten Spermaproben betrug bei den WB-Hengsten 54 Prozent (Bereich 44 bis 62 Prozent), bei dem Araberhengst dagegen nur 33 Prozent. Aus der Spermienzahl vor dem Einfrieren und der Motilität in aufgetauten Samenproben errechnete sich eine durchschnittliche Zahl motiler Spermien pro Ejakulat von $4,8 \times 10^9$ bei den WB-Hengsten (Bereich $3,3$ – $6,7 \times 10^9$). Bei einer Inseminationsdosis von 300×10^6 motiler Spermien könnten damit zwischen 11 und 22 Samenportionen pro Ejakulat hergestellt werden.

Die Untersuchungen zeigen, daß außerhalb der Decksaison gewonnene Hengstejakulate für die TG-Konservierung geeignet sind. Das Vorkommen von Samenblasensekret sowie der Abstand der einzelnen Samengewinnungen üben dabei keinen entscheidenden Einfluß auf die Qualität der Ejakulate und ihre Eignung zur TG-Konservierung aus. Angesichts des erheblichen Aufwandes, der für die Gewinnung, Verarbeitung und TG-Konservierung von Hengstejakulaten nötig ist, wäre eine höhere Zahl von Samenportionen pro verarbeitetem Ejakulat wünschenswert. Die Vermeidung von Spermienverlusten durch eine verbesserte Zentrifugationstechnik könnte dazu einen Beitrag leisten.

Deep-freezing of stallion semen, collected during the non-breeding season

From October to January, 26 ejaculates of 5 standardbred-stallions (SB) and 17 ejaculates of one Arab-stallion were collected and processed for deep-freezing. In the SB-stallions, the average volume was 61 ml (gel-free volume 44 ml), sperm concentration was $504 \times 10^6/\text{ml}$ and total number of spermatozoa per ejaculate was 19.7×10^9 . Progressive motility could be observed in 68 percent of spermatozoa, 11 percent were classified as morphological abnormal. Spermatozoal output in gel-free ejaculates ($n = 10$) was higher compared to ejaculates with gel ($n = 16$; 24.2×10^9 vs. 16.8×10^9). Longer periods of sexual rest (> 60 days) increased spermatozoal output but did not influence other semen parameters. Semen parameters in 17 ejaculates of the Arab-stallion (all with gel) were as follows: volume 38 ml, gel-free volume 27 ml, sperm concentration $215 \times 10^6/\text{ml}$, total number of spermatozoa 5326×10^6 , percentage of progressively

motile spermatozoa 63 percent, spermatozoa with morphological abnormalities 11 percent.

All ejaculates were frozen according to the method of *Martin et al.* (1979). Centrifugation of extended semen (650 g, 10 minutes) led to a substantial loss of spermatozoa. In the SB-stallions, only 52 percent of the original sperm number were found after resuspension of the sediment (gel-free ejaculates 59 percent vs. 48 percent with gel). In the Arab-stallion, sperm number determined after centrifugation represented 53 percent of the original sperm number.

The percentage of progressively motile spermatozoa in frozen-thaw samples was 54 percent (range 44 percent — 62 percent) and 33 percent in SB-stallions and the Arab-stallion, respectively. Based on the number of sperm cells filled in makro-straws and post-thaw motility, an average of 4.8×10^9 motile spermatozoa per ejaculate (range $3.3-6.7 \times 10^9$) would have been available for AI in SB-stallions. If 300×10^6 motile spermatozoa were used for insemination, 11 to 22 samples could be produced from one ejaculate. The results of this study demonstrate that stallion semen, collected during the non-breeding season, is suitable for deep-freezing. Impact of gel and semen collection interval on freezability of ejaculates are low. Deep-freezing of stallion semen requires a lot of time and equipment for collecting and processing semen. To make a better use of spermatozoa, improved techniques for centrifugation of stallion semen are necessary.

tem Ejakulat durchgeführt werden können. In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse der TG-Konservierung von insgesamt 43 Hengstejakulaten dargestellt, die alle außerhalb der Paarungssaison gewonnen wurden. 26 davon stammten von 5 Warmbluthengsten, 17 von einem Araberhengst. Die Parameter im Nativsamen während und nach der TG-Konservierung werden dargestellt und ihre Beziehungen untereinander diskutiert. Besonderer Wert wird dabei den Faktoren zugemessen, die die Zahl motiler Spermien nach der TG-Konservierung beeinflussen.

Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden an 6 Warmbluthengsten sowie einem Araberhengst in der Zeit vom 20. Oktober bis 20. Januar des nächsten Jahres durchgeführt. Die Hengste hatten ein Alter zwischen 8 und 22 Jahren. Alle Hengste waren bereits in der Zucht eingesetzt. Das bisher erzielte Befruchtungsergebnis schwankte zwischen 48 und 71 Prozent. Die Hengste waren nach rein züchterischen Gesichtspunkten ausgewählt worden, um ein gewisses Kontingent von TG-Spermaproben als Samenreserve anzulegen.

Für die Samengewinnungen mit Hilfe einer künstlichen Scheide (Modell *Götze*) wurde jeweils eine rossige Stute als Deckpartner verwendet. Die innere Temperatur der künstlichen Scheide wurde auf 42 °C eingestellt. Die Wasserfüllung wurde entsprechend der Größe des Genitales der verschiedenen Hengste variiert.

Die Untersuchung und Konfektionierung der Ejakulate erfolgte bei Raumtemperatur (zirka +22 °C). Nach Aufnahme der makroskopischen Kriterien Volumen, Farbe und Beimengungen wurde durch Filtration über mehrlagige Gaze eventuell vorhandenes Sekret der Samenblasendrüsen so weit wie möglich entfernt. Danach wurde erneut das Volumen der wässrigen Phase des Ejakulates bestimmt und folgende mikroskopische Kriterien ermittelt:

- der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien durch Schätzung
- der Anteil lebender Spermien bzw. morphologisch anomaler Samenzellen in einem Ausstrich mit Bromphenolblau-Nigrosin (jeweils 300 Spermien beurteilt)
- die Spermiedichte in einer Zählkammer nach *Türk*.

Die Tiefgefrier-Konservierung erfolgte nach der von *Martin et al.* (1979) beschriebenen Methode in Makropalotten (Fa. Minitüb, Landshut). Das Ejakulat wurde nach der Entfernung der schleimigen Anteile 1:1 mit dem Glukose-ED-TA-Verdünner gemischt und in 50-ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt. Danach wurde der verdünnte Samen 10 Minuten bei 650 g (zirka +22 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Sediment mit dem glycerinhaltigen Laktose-Eigelb-Verdünner resuspendiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden erneut Volumen, Spermiedichte und Motilität bestimmt. Nach Füllung der Makropalotten wurden diese horizontal über Stickstoffdampf eingefroren. Nach 15 Minuten erfolgte die Sturzkühlung in flüssigem Stickstoff auf -196 °C. Von jedem Ejakulat wurde eine Paillette aus dem Lagerbehälter direkt in ein Wasserbad von +50 °C für 45 Sekunden unter leichtem Rühren verbracht. In der aufgetauten Spermaprobe wurde die Motilität sowie der Prozentsatz lebender Spermien in oben angegebener Weise untersucht.

Ergebnisse

Von den 6 zur Verfügung stehenden WB-Hengsten schied 1 Hengst wegen mangelhafter Samenqualität im Frischsamen (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien maximal 30 Prozent) sowie ungenügenden Ergebnissen in probeweise eingefrorenen Spermaproben (Motilität 10 Prozent) aus. Die Ergebnisse der Spermauntersuchung in insgesamt 26 Ejakulaten von 5 WB-Hengsten sind in Tab. 1 dargestellt. Das Gesamtvolumen betrug im Durchschnitt 61 ml (Hengst C 32 ml — Hengst E 117 ml), das Volumen der wässrigen Phase ohne Schleimanteil 44 ml (Hengst D 25 ml — Hengst B 65 ml). Nur bei Hengst B waren in keinem der untersuchten Ejakulate Schleimanteile zu finden. Aus den großen individuellen Schwankungen bezüglich des Volumens sowie der Spermiedichte bei den einzelnen Heng-

Tab. 1: Spermaparameter von 5 Warmbluthengsten außerhalb der Decksaison (jeweils Mittelwerte der angegebenen n-Zahl)

Parameter	Hengste					Gesamt
	A	B	C	D	E	
Ejakulate n	4	5	6	6	5	26
Volumen ml	61	65	32	42	117	61
Vol. ohne Schleim ml	52	65	27	25	62	44
Spermien/ml $\times 10^6$	805	282	746	466	243	504
Sp./Ejakulat $\times 10^9$	39,3	17,8	19,9	11,8	15,1	19,7
Motilität %*	55	69	75	66	70	68
Leb. Spermien %	62	74	78	71	77	73
Anomalien %	25	12	8	6	9	11

*) Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien

sten errechneten sich ebenso unterschiedliche Gesamtzahlen von Spermien pro Ejakulat (Mittelwert $19,7 \times 10^9$; Bereich $11,8-39,3 \times 10^9$). Bei dem Hengst A war sowohl die höchste Spermiedichte ($805 \times 10^6/\text{ml}$) als auch die höchste Gesamtspermienzahl ($39,3 \times 10^9$) zu beobachten. Bei diesem Hengst wurde die im Vergleich zu den anderen Hengsten niedrigste Motilität (55 Prozent) sowie der höchste Anteil von Spermienanomalien (25 Prozent) beobachtet. Der durchschnittliche Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien in allen 26 Ejakulaten betrug 68 Prozent, der Anteil von Spermien mit morphologischen Anomalien lag bei 11 Prozent.

Von den 26 Ejakulaten der WB-Hengste waren in 16 Samenblasensekret in Form von Schleim nachzuweisen, dessen Volumen im Durchschnitt 27 ml betrug (Tab. 2). In

Tab. 2: Der Einfluß von Samenblasensekret (Schleim) auf Spermaparameter von Hengsten (jeweils Mittelwerte der angegebenen n-Zahl)

Parameter	Ejakulate von WB-Hengsten		Araberhengst
	ohne Schleim	mit Schleim	mit Schleim
Ejakulate n	10	16	17
Volumen ml	54	66	38
Schleim ml	—	27	11
Vol. ohne Schleim ml	54	39	27
Spermien/ml $\times 10^6$	488	515	215
Sp./Ejakulat $\times 10^6$	24 265	16 881	5326
Motilität %*	68	67	63
Leb. Spermien %	73	72	68
Anomalien %	13	10	11

*) Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien

dieser Tabelle sind auch die 17 Ejakulate eines Araberhengstes enthalten, die sämtlich schleimige Anteile aufweisen (durchschnittliches Schleimvolumen 11 ml). Der größte Unterschied bei den Ejakulaten der WB-Hengste ergab sich bei der Gesamtspermienzahl pro Ejakulat. Diese betrug in Ejakulaten ohne Schleim 24265×10^6 gegenüber 16881×10^6 in Ejakulaten mit Schleim (Differenz $P > 0,05$). Bei dem Araberhengst wurden im Durchschnitt nur 5326×10^6 Spermien pro Ejakulat ausgeschieden. In Ejakulaten mit bzw. ohne Samenblasensekret waren Motilität sowie der Anteil von Spermien mit morphologischen Anomalien nicht signifikant verschieden.

Eine unterschiedlich lange Deckruhe vor der jeweiligen Samengewinnung beeinflusste bei den WB-Hengsten in erster Linie die Spermiedichte sowie das schleimfreie Ejakulatvolumen (Tab. 3). Nach sehr langen Deckpausen (> 60 Tage) wurde ein mittleres Volumen (ohne Schleim) von 68 ml und eine Spermiedichte von 628×10^6 ml beobachtet. Daraus errechnete sich eine durchschnittliche Gesamtspermienzahl pro Ejakulat von 33906×10^6 , ungefähr die doppelte Menge wie nach Deckpausen von 1 bis 2 oder 3 bis 8 Tagen (Differenz $P < 0,05$ bzw. $P < 0,01$). Eine unterschiedlich lange Deckpause hatte keine erkennbaren Auswirkungen auf die Motilität sowie den Anteil von Spermien mit morphologischen Anomalien.

Tab. 3: Der Einfluß verschieden langer Deckpausen auf Samenparameter bei WB-Hengsten (jeweils Mittelwerte der angegebenen n-Zahl)

Parameter	Deckruhe vor der Samengewinnung		
	1—2 Tage	3—8 Tage	> 60 Tage
Ejakulate n	9	12	5
Ejak. mit Schleim n	6	8	2
Volumen ml	55	81	79
Vol. ohne Schleim ml	39	39	68
Spermien/ml $\times 10^6$	460	486	628
Sp./Ejakulat $\times 10^6$	15901 ^A	16675 ^B	33906 ^C
Motilität %*	68	66	69
Anomalien %	12,9	9,1	13,3
Motilität % nach TG*	56	56	49

*) Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien
A—C: $p < 0,05$; B—C: $p < 0,01$

Die Zentrifugation des verdünnten Samens als erster Schritt zur Konservierung war bei allen Hengsten mit erheblichen Spermienverlusten verbunden (Tab. 4 und 5). Die ursprünglich in den Ejakulaten vorhandene Gesamtspermienzahl reduzierte sich dadurch auf durchschnittlich 52 Prozent bei den WB-Hengsten bzw. 53 Prozent bei dem Araberhengst. Bei Hengst B, der in keinem der verwendeten Ejakulate Schleimanteile aufwies, war der geringste Verlust (64 Prozent) festzustellen. Generell war der Spermienverlust durch die Zentrifugation in Ejakulaten ohne Schleimanteile geringer (Tab. 5). Die Motilität, d. h. der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien, war nach Zentrifu-

Tab. 4: Verschiedene Spermaparameter vor und nach der Samenkonservierung bei 5 Warmbluthengsten (jeweils Mittelwerte der angegebenen n-Zahl)

Parameter	Hengste					Gesamt
	A	B	C	D	E	
Ejakulate n	4	5	6	6	5	26
Vor TG-Konservierung						
Sp./Ejakulat $\times 10^9$	39,3	17,8	19,9	11,8	15,1	19,7
Nach Zentr. $\times 10^9$	15,6	10,2	7,9	6,6	6,2	8,6
% vom Ausg.-Wert	46	64	45	62	42	52
Mot. %* nach Zentr.	64	72	74	67	67	69
Nach TG-Konservierung						
Motilität %*	44	58	62	52	53	54
Leb. Spermien %	52	66	70	61	64	63
Motile Sp. $\times 10^9$	6,7	6,0	5,0	3,5	3,3	4,8

*) Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien

gation und Resuspension mit dem glycerinholdigen Laktose-Eidotter-Verdüner gegenüber dem Wert im Frischsamen nicht verändert.

Nach der TG-Konservierung war im Durchschnitt eine Vorwärtsbewegung von 54 Prozent (WB-Hengste; Tab. 4) bzw. 33 Prozent (Araberhengst; Tab. 5) festzustellen. Der Hengst A, der schon vor dem TG-Prozess im Vergleich zu den anderen WB-Hengsten die schlechteste Motilität aufwies, hatte auch in den TG-Spermaproben einen um 8 bis 18 Prozent niedrigeren Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien in den einzelnen Ejakulaten.

Tab. 5: Der Einfluß von Samenblasensekret (Schleim) auf Samenparameter vor und nach der TG-Konservierung (jeweils Mittelwerte der angegebenen n-Zahl)

Parameter	Ejakulate von WB-Hengsten		Araberhengst
	ohne Schleim	mit Schleim	mit Schleim
Ejakulate n	10	16	17
Vor TG-Konservierung			
Spermien $\times 10^6$	24 265	16 881	5326
Nach Zentr. $\times 10^6$	11 259 ^A	7461 ^B	2185
% vom Ausg.-Wert	59	48	53
Mot. % nach Zentr.*	70	68	65
Nach TG-Konservierung			
Motilität %*	57	53	33
Leb. Spermien %	64	62	41
Motile Sp. $\times 10^6$	6187 ^C	3906 ^D	741

*) Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien
A—B: $p < 0,01$; C—D: $p < 0,05$

Der Anteil von Samenblasensekret übte bei den WB-Hengsten keinen meßbaren Einfluß auf die Qualität der TG-Spermaproben aus (Tab. 5). Lange Deckpausen (> 60 Tage) vor der Samengewinnung führten zu etwas niedrigeren Motilitätsraten (49 Prozent) in aufgetauten Spermaproben als Deckpausen von 1 bis 2 Tagen oder 3 bis 8 Tagen (jeweils 56 Prozent; Tab. 3).

Die Zahl motiler Spermien pro Ejakulat wurde rechnerisch aus der in Pailletten abgefüllten Spermienzahl und dem Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen nach dem Auftauen ermittelt. Bei den WB-Hengsten betrug diese durchschnittlich $4,8 \times 10^9$ motile Spermien pro Ejakulat (Schwankung $3,3 \times 10^9$ bei Hengst E bis $6,7 \times 10^9$ bei Hengst A; Tab. 4). In Ejakulaten ohne Schleimanteile waren mehr motile Spermien in den TG-Samenproben eines Ejakulates vorhanden ($6,2 \times 10^9$) als in Ejakulaten mit Samenblasensekret ($3,9 \times 10^9$). Bei dem Araberhengst, der in allen 17 Ejakulaten Samenblasensekret ausschied, waren nur 741×10^6 motile Spermien pro Ejakulat verfügbar (Tab. 5).

Aus der Zahl motiler Spermien pro Ejakulat wurde die Anzahl von Besamungen errechnet, die bei Anwendung verschiedener Inseminationsdosen (100, 300 bzw. 500×10^6) jeweils möglich gewesen wäre (Tab. 6). Bei einer Inseminationsdosis von 100×10^6 motiler Spermien wären bei den WB-Hengsten zwischen 33 und 67 Besamungen pro Ejaku-

Tab. 6: Zahl der möglichen Besamungsportionen aus einem Ejakulat in Abhängigkeit von der Inseminationsdosis

Hengst	Zahl motiler Spermien pro Ejakulat	Anzahl Besamungsportionen bei		
		100×10^6	300×10^6	500×10^6
A*	$6,7 \times 10^9$	67	22	13
B*	$6,0 \times 10^9$	60	20	12
C*	$5,0 \times 10^9$	50	16	10
D*	$3,5 \times 10^9$	35	12	7
E*	$3,3 \times 10^9$	33	11	6
F**	$0,74 \times 10^9$	7	2	1

*A—E: WB-Hengste; **F: Araberhengst

lat möglich gewesen, gegenüber nur 6 bis maximal 13 bei der höchsten Inseminationsdosis (500×10^6). Die von dem Araberhengst gewonnenen Ejakulate hätten im Durchschnitt zwischen 1 und 7 Besamungen ermöglicht.

Diskussion

Solange die KB beim Pferd nur eine Ergänzung traditioneller Zuchtmethoden darstellt, wird die Samengewinnung für die TG-Konservierung außerhalb der Decksaison vorgenommen werden müssen. Dabei müssen die jahreszeitlich bedingten Einflüsse auf die Samenzusammensetzung beim Hengst in Kauf genommen werden. In erster Linie betroffen davon ist das Gesamtvolumen, der Anteil von Samenblasensekret sowie der Gesamtspermienausstoß pro Ejakulat (Nishikawa, 1959; Pickett et al., 1970). Die Abgabe von Samenblasensekret während der Ejakulation ist beim Hengst saisonal beeinflusst. Nach Nishikawa (1959) ist im Zeitraum von Oktober bis Januar mit keinem oder nur wenig Schleim im Ejakulat zu rechnen. In dem eigenen Material kam innerhalb dieses Zeitraums ein starker individueller Einfluß zutage. Während in allen 17 Ejakulaten des Araberhengstes Samenblasensekret enthalten war, war dies bei einem der WB-Hengste in keinem von 5 gewonnenen Ejakulaten der Fall. Das schleimfreie Volumen der Ejakulate, das als Ausgangswert bei der Samenkonservierung von Bedeutung ist, betrug 44 ml bei den WB-Hengsten bzw. 27 ml bei dem Araberhengst. Dieser Unterschied dürfte Ausdruck der Korrelation zum Körpergewicht bzw. der Größe der Gonaden sein. In den Untersuchungen von Pickett et al. (1970) wurde in den Monaten Oktober bis Januar ein schleimfreies Volumen von 25 bis 35 ml beobachtet. In dem von Pickett beschriebenen Material war auch der Gesamtspermienausstoß wesentlich niedriger als bei den WB-Hengsten. Allerdings wurden diese Untersuchungen an 2 bis 5 Jahren alten Hengsten durchgeführt, während die hier untersuchten Hengste zwischen 8 und 22 Jahre alt waren. Die Abgabe von Samenblasensekret beeinflusste in erster Linie die pro Ejakulat abgegebene Gesamtspermienzahl. Ejakulate ohne Schleimanteile enthielten mehr Spermien ($24,2 \times 10^9$) als Ejakulate mit Samenblasensekret ($16,9 \times 10^9$). Bei diesem Unterschied muß berücksichtigt werden, daß mit der Entfernung des Schleimes auch Spermien verloren gingen. Der Verlust von Spermien im Schleim kann bis zu 1×10^9 betragen, außerdem können im Filter selbst bis 2×10^9 Spermien zurückbleiben (Pickett et al., 1974).

Ob dieser Spermienverlust durch die Verwendung einer Methode zur fraktionierten Spermagewinnung gemindert werden kann, ist fraglich. Angesichts des erhöhten Arbeitsaufwandes sowie der dabei gegebenen technischen Fehlermöglichkeiten erscheint der Aufwand nicht gerechtfertigt. Um den Ausstoß von Samenblasensekret so gut wie möglich zu vermeiden, wird von Pickett et al. (1974) vorgeschlagen, eine sehr starke sexuelle Stimulierung der Hengste vor der Spermagewinnung zu vermeiden. Von Klug et al. (1977) wird ein besonderer Samenentnahmerhythmus erwähnt, nach dem Ejakulate mit besonders geeigneten Samenparametern für die TG-Konservierung gewonnen wer-

den können. Nach einer mehrmaligen Samengewinnung am Tag 1 konnten ab Tag 7 in 3- bis 4tägigen Abständen Ejakulate mit guten Konservierungseigenschaften gewonnen werden. Erst an den Tagen 21 und 22 traten erstmals Ejakulate mit Schleimanteilen auf.

In den eigenen Untersuchungen wurde kein besonderes Schema zur Samenentnahme eingehalten. Wie aus Tab. 3 hervorgeht, enthielten auch Ejakulate, die zu Beginn der Untersuchungsperiode gewonnen wurden, Samenblasensekret. Unabhängig von der Länge der Deckruhe (1 bis 2 Tage oder 3 bis 8 Tage) enthielten jeweils zwei Drittel der gewonnenen Ejakulate einen Schleimanteil. Im übrigen beeinflusste der Ausstoß von Samenblasensekret in den betreffenden Ejakulaten weder die Motilität noch die Spermien-dichte oder den Anteil von Spermienanomalien.

Die physiologische Bedeutung des schleimigen Sekretes aus den Samenblasendrüsen ist nicht bekannt. Ein direkter Einfluß auf qualitative Samenparameter wie Motilität oder Spermienmorphologie ist nicht belegt und wurde auch in diesen Untersuchungen nicht gefunden. Die Abgabe bzw. das Fehlen dieser Anteile im Ejakulat könnte aber Indiz für einen bestimmten Funktionszustand der Gll. vesiculosae, vielleicht auch aller akzessorischen Geschlechtsdrüsen sein. Deshalb wäre es wünschenswert, mehr über Zusammenhänge zwischen Vorkommen von Samenblasensekret, chemischer Zusammensetzung des Seminalplasmas und dessen Einfluß auf bestimmte Samenparameter zu erfahren.

Die unterschiedlich langen Deckpausen führten zu keinen erkennbaren Veränderungen qualitativer Merkmale (Motilität, Anomalien) in den gewonnenen Ejakulaten. Aus diesen Ergebnissen wird gefolgert, daß die Gewinnung von geeigneten Ejakulaten für die TG-Konservierung weitgehend unabhängig von den Faktoren Samenblasensekret und Deckruhe ist. Vielmehr dürfte die individuelle Eignung verschiedener Hengste dafür entscheidend sein.

Die bei den WB-Hengsten beobachteten Anteile vorwärtsbeweglicher Spermien in aufgetauten Spermaproben von durchschnittlich 54 Prozent ($n=26$) entsprechen den Ergebnissen von *Martin et al.* (1979), die 53,4 Prozent vorwärtsbewegliche Spermien in aufgetauten Spermaproben beobachteten. Diese Resultate sind besser als die anderer Autoren (38 Prozent: *Cristanelli et al.*, 1984; 35 Prozent: *Cochran et al.*, 1983; 38 Prozent: *Cochran et al.*, 1984). Da alle Ergebnisse jeweils an einer begrenzten Zahl von Hengsten erarbeitet wurden, könnte allein die unterschiedliche Eignung verschiedener Hengste diese Unterschiede erklären.

Die Beurteilung des Anteils vorwärtsbeweglicher Spermien in aufgetauten Spermaproben ermöglicht keine Prognose für deren Befruchtungsvermögen. Für die Selektion von Hengsten zur TG-Konservierung sowie für die Auswahl geeigneter TG-Spermaproben zur KB ist dies jedoch der einzige praktikable Parameter. Deshalb wäre die Entwicklung objektiver Meßmethoden zur Bestimmung der Spermienmotilität von großer Bedeutung.

Die individuellen Unterschiede zwischen den 5 Hengsten bezüglich der Motilität in aufgetauten Spermaproben waren nicht erheblich. Bei dem Hengst A, der schon im Frischsamen die niedrigste Motilität sowie den höchsten

Anteil von Spermienanomalien aufwies, wurde auch der geringste Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen nach dem Auftauen beobachtet (44 Prozent). Unabhängig davon wären die TG-Spermaproben auch dieses Hengstes für den Einsatz in der KB geeignet.

Das Vorkommen von Samenblasensekret im Ejakulat hatte keinen meßbaren Einfluß auf die Motilität in TG-Spermaproben (Tab. 5). Bei dem Araberhengst, der im Frischsamen den WB-Hengsten vergleichbare Samenparameter aufwies und generell Ejakulate mit Schleimanteilen abgab, wurden deutlich schlechtere Ergebnisse erzielt (33 Prozent vorwärtsbewegliche Spermien, Tab. 5). Obwohl aus diesem Einzelfall keine allgemein gültigen Folgerungen gezogen werden können, ist dies ein Hinweis auf die individuelle Eignung von Hengsten zur TG-Konservierung.

Die Zahl motiler Spermien pro Ejakulat nach der TG-Konservierung ist entscheidend dafür, wie viele Stuten mit einem konfektionierten Ejakulat besamt werden können. Diese Werte waren bei allen Hengsten im Vergleich zur Spermienzahl im Frischsamen stark reduziert. Für den Großteil dieser Spermienverluste war die Zentrifugation vor der eigentlichen Konservierung verantwortlich. Weitgehend unabhängig von individuellen Eigenschaften der Hengste (Tab. 4) bzw. der Zumischung von Samenblasensekret (Tab. 5) wurden dabei zirka 50 Prozent der Spermien verloren. Die hier gewählte Zentrifugationskraft von 650 g entspricht den Angaben von *Loomis et al.* (1983). *Martin et al.* (1979) zentrifugierten mit 1000 g, während in einer anderen Untersuchung nur 400 g angewendet wurden (*Cochran et al.*, 1984). Letztere Autoren verwenden jedoch statt des Glukose-IEDTA-Verdünners einen Zitratverdünnern mit geringerer Viskosität. Zur Verbesserung der Motilität wurden die zu zentrifugierenden Proben außerdem mit Glukose-IEDTA-Lösung unterschichtet. In den eigenen Untersuchungen war die Motilität nach der Zentrifugation und Resuspension durchweg genauso gut wie vor der Zentrifugation (Tab. 4 und 5). Dies könnte eine Folge der relativ geringen Zentrifugationsstärke sein. Anzustreben ist deshalb eine Zentrifugationstechnik, die einen möglichst geringen Spermienverlust zur Folge hat und gleichzeitig die Motilität der Spermien nicht beeinträchtigt.

Die theoretisch mögliche Anzahl von Besamungen aus einem konfektionierten Ejakulat ist letztendlich abhängig von der Besamungsdosis, d. h. der Zahl motiler Spermien pro Insemination. Angaben in der Literatur schwanken zwischen 130×10^6 (*Loomis et al.*, 1983), 244×10^6 (*Cristanelli et al.*, 1984), $216-479 \times 10^6$ (*Cochran et al.*, 1983), 200×10^6 (*Martin et al.*, 1979) und 594×10^6 (*Müller*, 1982). Nimmt man als minimale bzw. maximale Inseminationsdosis 100 bzw. 500×10^6 motile Spermien, ergeben sich rechnerisch sehr unterschiedliche Zahlen für die möglichen Besamungsportionen. Bei dem Araberhengst schwankte die Zahl zwischen 1 und 7, bei den WB-Hengsten dagegen zwischen 6 und 67. Realistisch dürften die Zahlen bei einer Inseminationsdosis von 300×10^6 sein (Bereich 11 bis 22 Samenportionen). Eine Verbesserung dieser Zahlen pro Ejakulat ist vor allem durch eine optimierte Zentrifugationstechnik zu erzielen. Eventuell bringt die von *Cochran et al.* (1984) empfohlene Technik Fortschritte. Allerdings erfor-

dert dieses Verfahren große Sorgfalt und einen Aufwand, der im Routinebetrieb nicht einfach aufzubringen sein dürfte. Selbstverständlich kann durch eine erhöhte Ejakula-

tionsfrequenz der Hengste die Produktion von TG-Spermaproben erhöht werden. Der relative Aufwand pro Ejakulat bleibt aber davon unberührt.

Literatur

- Cochran, J. D., R. P. Amann, E. L. Squires and B. W. Pickett (1983): Fertility of frozen-thawed stallion semen extended in lactose-IEDTA-egg yolk extender and packaged in 1.0-ml straws. *Theriogenology* 20, 735-741.
- Cochran, J. D., R. P. Amann, D. P. Froman and B. W. Pickett (1984): Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* 22, 25-38.
- Cristanelli, M. J., E. L. Squires, R. P. Amann and B. W. Pickett (1984): Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology* 22, 39-45.
- Haring, H. J. F. (1985): Besamung beim Pferd. *Der Tierzüchter* 37, 482-483.
- Klug, E., A.-R. Günzel, H. Merkt und D. Krause (1977): Untersuchungen von Hengsten zum Einsatz in der instrumentellen Samenübertragung mit Tiefgefriersperma. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 84, 236-238.
- Loomis, P. R., R. P. Amann, E. L. Squires and B. W. Pickett (1983): Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. *J. Anim. Sci.* 56, 687-693.
- Martin, J. C., E. Klug and A. Günzel (1979): Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 27, 47-51.

- Müller, Z. (1982): Fertility of frozen equine semen. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 32, 47-51.
- Nishikawa, Y. (1959): Studies on reproduction in horses. Japan Racing Association, Shiba Tamuracho, Minatoku, Tokyo, Japan.
- Pickett, B. W., L. C. Faulkner and T. M. Sutherland (1970): Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. *J. Anim. Sci.* 31, 713-728.
- Pickett, B. W., M. R. Gebauer, G. E. Seidel, Jr. and J. L. Voss (1974): Reproductive physiology of the stallion: spermatozoal losses in the collection equipment and gel. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 165, 708-710.

Prof. Dr. W. Leidl
Gynäkologische und Ambulatorische Tierklinik
Universität München
Königinstraße 12
8000 München 22

Die Autoren danken Frau R. Häitchi für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Kurzreferat

Caecumperforation beim Pferd

(Cecal perforation in the horse)

M. W. Ross, B. B. Martin und W. J. Donawick (1985)

JAVMA 187 (3), 249-253

Es wird über 23 Fälle von Caecumperforation bei Pferden berichtet. Die Tiere (9 Hengste, 12 Stuten und 2 Wall.) waren im Durchschnitt 4,5 Jahre alt. Es handelte sich um 12 Standardbreds, 9 Vollblüter sowie 1 Belgier und 1 Morgan Horse. Die Pferde wurden 2 Gruppen zugeordnet: Gruppe I bestand aus 13 stationären Patienten, bei denen die Caecumperforation unerwartet auftrat. Gruppe II beinhaltete 10 Pferde, bei denen der Zustand zur Zeit der Einlieferung schon bestand. Die Tiere litten an Erkrankungen, die nicht in bezug zum Caecum standen. 16 Pferde hatten vor Eintritt der Perforation nichtsteroidale entzündungshemmende Medikamente erhalten. 12 der 13 stationären Patienten der Gruppe I zeigten undeutliche, kaum erkennbare Anzeichen einer gastrointestinalen Störung vor Eintritt der Erkrankung.

Die zutage tretenden klinischen Erscheinungen und die labordiagnostischen Befunde entsprachen denen eines schweren Endotoxinschocks als Folge der Kontamination des Bauchfells mit Ingesta und Bakterien. Alle Pferde starben. Bei der Sektion zeigte sich der Blinddarm groß und mit festem Inhalt gefüllt, das Colon war leer. Bei einer Stute, die zuvor geföhlt hatte, waren Caecum und Colon von normaler Größe und Füllung. Bei allen Pferden bestand eine einzige Perforation, die an unterschiedlichen Lokalisationen auftrat. Am verbreitetsten war eine ventral am Corpus caeci quer verlaufende Perforation. Grobsinnliche und mikroskopische Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf einen pathologischen Zustand in der Umgebung der Perforationsstelle oder in anderen Bereichen der Caecumwand oder des Ostium caecocolicum.

Zwei mögliche Pathogenesen der Caecumperforation werden diskutiert;

1. Ein idiopathisches Auftreten bei Stuten um den Geburtstermin, ohne daß vorher eine Störung der Caecumentleerung bestanden hätte.

2. Ein sekundäres Auftreten infolge einer Funktionsstörung mit Überladung des Caecums.

Bei Pferden mit Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts oder anderen systemischen Erkrankungen, die mit nichtsteroidalen entzündungshemmenden Medikamenten behandelt werden, besteht möglicherweise ein erhöhtes Risiko einer Caecumperforation.

Cornelia Ebreyser