

# Untersuchungen zur Flüssigsamenkonservierung von Hengstsperma

Antje Wöckener, F. O. Papa\*, H. Sieme und H. Bader

Klinik für Andrologie und Besamung der Haustiere  
Tierärztliche Hochschule Hannover

\*Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia  
Botucatu, Brasilien

Die instrumentelle Samenübertragung beim Pferd hat in den letzten Jahren einen deutlichen Aufschwung erfahren. Ein wesentlicher Grund hierfür ist darin zu sehen, daß die Trächtigkeitsergebnisse nach Übertragung von flüssigkonserviertem Samen höher als nach der natürlichen Paarung waren (Klug, 1987). Darüber hinaus konzentrierten sich zahlreiche Arbeiten darauf, die Konservierungsfähigkeit von Hengstsperma durch Verbesserung der Verdüner, der Kühl- und Transporttechnologie sowie Optimierung der Lagerungstemperaturen auf einen möglichst großen Zeitraum auszudehnen (Kenney et al., 1975; Demick et al., 1976; Palmer, 1984; Kreider et al., 1985; Varner et al., 1988). Tatsächlich scheint heute der Einsatz flüssigverdünnten Hengstspermas mehrere Tage nach seiner Gewinnung möglich zu sein. Hauptsächlich werden glycinhaltige oder Magermilchverdünner verwendet (Douglas-Hamilton et al., 1984 und 1987; Heiskanen et al., 1987; de Vries, 1987; Tekin et al., 1989).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Konservierungsfähigkeit eines glycinhaltigen Verdünners „Dimitropoulos 11“ (van der Holst, 1984; Rasbech, 1984) sowie eines Magermilch-Glukose-Verdünners (Kenney et al., 1975) unter verschiedenen Zentrifugations- und Temperaturbedingungen bei Hengstsamen zu beurteilen.

## Material und Methoden

Für die Untersuchungen standen drei im Warmbluttyp stehende, fertile Hengste (4 und 4 sowie 10 Jahre alt) zur Verfügung, von denen während eines Monats wöchentlich zwei Ejakulate mittels künstlicher Scheide an einer rossenden Stute gewonnen wurden. Direkt nach Beurteilung der Bewegungsaktivität wurden die Ejakulate gesplittet und folgendermaßen behandelt (Übersicht 1): Je ein Teil wurde bei +37 °C im Verhältnis 1:1 mit Magermilchverdünner (Kenney et al., 1975) bzw. dem glycinhaltigen Verdünner Dimitropoulos 11 (van der Holst, 1984; Rasbech, 1984; Tekin et al., 1989) vermischt (Übersicht 2). Nach 10minütiger Anpassung bei Raumtemperatur wurden die verdünnten Samenproben wiederum geteilt. Eine Hälfte blieb unbehandelt, die andere wurde 10 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Der Überstand der zentrifugierten Proben wurde

## Zusammenfassung

In Konservierungsversuchen mit Hengstsperma wurden ein glycinhaltiger und ein Magermilchverdünner eingesetzt und der Einfluß von Zentrifugation sowie von Lagerung bei Raum- und Kühlschranktemperatur auf Spermienmotilität und -morphologie überprüft. Bei einer 6stündigen Konservierungsdauer zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtmotilität, wohl aber in der Vorwärtsbeweglichkeit zugunsten der Lagerung bei +5 °C nach vorausgegangener Zentrifugation. Nach 48 und 72 Stunden Lagerungsdauer bestanden bezüglich des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Samenzellen zwischen den verschiedenen Samenbehandlungen keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr. Ab einer 24stündigen Lagerung ergaben sich Unterschiede auch bezüglich der Gesamtmotilität zugunsten der zentrifugierten und bei +5 °C aufbewahrten Proben. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Verdünnern traten im direkten Vergleich der verschiedenen Behandlungsmethoden zu keinem Untersuchungszeitpunkt auf. Auf die Spermienmorphologie nach 0 und 24 Stunden hatten weder Verdüner noch Lagerungstemperatur und Zentrifugation einen Einfluß.

## Influence of storage temperature, centrifugation and extender on stallion semen viability

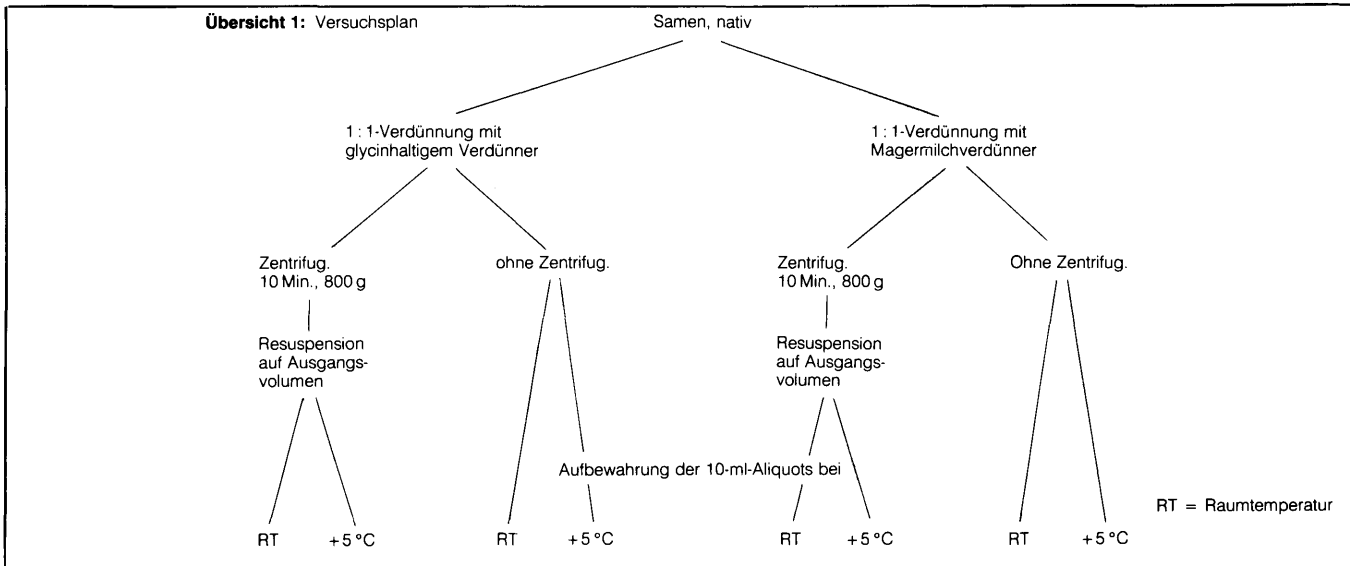
The aim of this study was to value the preserving capacity of a glycin-containing and a skim milk extender under different centrifugation and temperature conditions. Concerning total motility there were statistically significant differences between treatments from a storage time of 24 hours onwards to 72 hours. Samples stored at +5 °C and previously centrifuged were superior to the samples stored at room temperature and having not been submitted to centrifugation. As to the progressive motility there were significant differences already 6 hours after semen collection. Here, too, centrifugation and storage at +5 °C were superior to the other treatments. Up from 48 hours on the differences in this parameter were not significant any more because of the low absolute values. The type of extender did not significantly influence motility parameters within treatment groups. Acrosome morphology after 0 and 24 hours was influenced neither by the type of extender nor storage temperature nor centrifugation.

möglichst vollständig dekantiert und das Sediment mit dem jeweiligen Verdüner auf das Ausgangsvolumen resuspendiert. Von den unterschiedlich behandelten Proben wurden 10-ml-Aliquots in Glasröhrchen bei Kühlschrank (+5 °C) sowie Raumtemperatur aufbewahrt.

Bei der Beurteilung der Bewegungsaktivität (Phasenkontrastmikroskop mit Heitzisch [+38 °C], 128fache Vergrößerung) wurde unterschieden zwischen der Gesamtmotilität (der Anteil aller in irgendeiner Form beweglichen Samenzellen) und dem prozentualen Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien.

Die Bewegungsaktivität wurde beurteilt: 1. im unverdünnten Samen direkt nach der Samenentnahme, 2. in den verdünnten, nicht zentrifugierten Samenproben nach 10minütiger Anpassung, 3. in den zentrifugierten Proben 10 Minuten nach der Resuspension, 4. in allen verdünnten Raumtemperatur- und Kühlschrankproben 6; 24; 48 und 72 Stunden nach der Ejakulatgewinnung.

Objektträgerpräparate für die Spermac®-Färbung (Oettle, 1986) wurden von den verdünnten Samenproben nach 10minütiger Anpassung sowie von allen Raumtemperatur-



und Kühlschrankproben nach 24stündiger Konservierung angefertigt.

Das Zahlenmaterial wurde in einer Zeitreihenanalyse (Programm MZWEIF) auf der Rechenanlage des Institutes für Statistik und Biometrie der Tierärztlichen Hochschule Hannover statistisch ausgewertet.

## Ergebnisse und Diskussion

### Gesamtmotilität

In der Gesamtmotilität bestehen nach 6 Stunden keine Unterschiede zwischen den Verdünnern und den verschiedenen Behandlungen.

Nach 24 Stunden weisen beim Glycinverdünner die ohne Zentrifugation bei Raumtemperatur aufbewahrten Proben die schlechtesten Ergebnisse auf; die übrigen Behandlungen unterscheiden sich nicht signifikant.

Nach 48 und 72 Stunden ergibt sich bei den mit Glycinverdünner konservierten Proben eine Überlegenheit der bei +5 °C gelagerten Proben gegenüber den Raumtemperaturproben; vorherige Zentrifugation verstärkt diesen positiven Effekt.

Beim Magermilchverdünner weisen nach 24 Stunden die bei Raumtemperatur ohne vorherige Zentrifugation aufbe-

wahrten Proben ebenfalls die niedrigsten Gesamtmotilitätsraten auf, wohingegen sich die übrigen Behandlungen nicht signifikant unterscheiden.

Nach 48 und 72 Stunden sind beim Magermilchverdünner die zentrifugierten Kühlschrankproben allen anderen Behandlungsverfahren deutlich überlegen.

Im direkten Vergleich der verschiedenen Behandlungsmethoden unterscheiden sich die beiden Verdüner nicht signifikant.

### Vorwärtsbeweglichkeit

In der Vorwärtsbewegung erweisen sich die mit Glycinverdünner konservierten Proben bereits nach 6 Stunden Lagerung bei +5 °C den bei Raumtemperatur aufbewahrten Proben überlegen; dieser günstige Effekt ist durch vorherige Zentrifugation noch zu verstärken.

Für eine 24stündige Aufbewahrung in Glycinverdünner eignen sich nur die zentrifugierten Kühlschrankproben.

Bei mehr als 48stündiger Lagerung des mit Glycinverdünner konservierten Samens haben weder die Aufbewahrungstemperatur noch die Zentrifugation einen Einfluß auf diesen Parameter.

Bei den mit Magermilch konservierten Proben läßt sich zu den Zeitpunkten 6 und 24 Stunden die beste Erhaltung der Vorwärtsbeweglichkeit durch Zentrifugation und Lagerung bei +5 °C erzielen. Auch beim letztgenannten Verdünner haben nach 48stündiger Lagerung weder Aufbewahrungstemperatur noch Zentrifugation einen Einfluß. Die beiden Verdüner unterscheiden sich im direkten Vergleich der verschiedenen Behandlungsmethoden nicht signifikant.

### Spermienmorphologie

Für den Gesamtprozentsatz morphologisch abweichender Samenzellen (MAS) und die Kopfkappenintegrität bestehen zum Zeitpunkt 0 und nach 24stündiger Konservierung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verdünnern, den Lagerungstemperaturen und den Vorbehandlungen (Zentrifugation).

**Übersicht 2: Zusammensetzung der Verdüner**

Glycinhaltiger Verdünner „Dimitropoulos 11“		Magermilch-Glukose-Verdünner	
Lösung I		Trockenmilch	24 g
Glukose	12 g	Glukose	49 g
Fruktose	12 g	Aqua bidestillata	960 ml
Aqua bidestillata	600 ml	Natriumbikarbonat (8,4%ige Lösung)	16 ml
Lösung II		Gentamycinsulfat	1 g
Natriumcitrat	20,0 g		
Glycin	9,4 g		
Sulfanilamid	3,5 g		
Aqua bidestillata	1000 ml		
Herstellung des Endverdünners			
Lösung I	300 ml		
Lösung II	500 ml		
Hühnereidotter	200 ml		
Penicillin	1 × 10 <sup>6</sup> IE		
Streptomycin	1 g		

**Tab. 1:** Gesamtmotilität ( $\bar{x} \pm s$ ) in Prozent von Hengstejakulaten bei Anwendung verschiedener Verdüner, Konservierungstemperaturen und Zentrifugationsverfahren; n = 30

Zeit (Stunden):			0	6	24	48	72
<b>Glycin-Verdünner</b>	RT	mZ (a)	80,5 ± 1,8	75,0 ± 2,8	56,5 ± 3,9	27,2 ± 10,7	14,5 ± 5,0
		oZ (b)	79,5 ± 2,2	71,5 ± 2,8	34,3 ± 8,8	7,1 ± 3,9	2,4 ± 2,9
	5 °C	mZ (c)	81,3 ± 2,5	79,5 ± 1,8	67,3 ± 5,9	48,5 ± 10,3	37,2 ± 9,7
		oZ (d)	79,5 ± 2,2	72,8 ± 2,9	49,8 ± 5,5	30,6 ± 7,8	21,0 ± 5,4
<b>Magermilch-Verdünner</b>	RT	mZ (e)	81,7 ± 2,0	74,5 ± 3,1	44,8 ± 4,9	21,0 ± 10,1	11,9 ± 7,7
		oZ (f)	80,0 ± 3,8	66,0 ± 0,9	32,9 ± 9,0	11,0 ± 8,5	4,6 ± 4,5
	5 °C	mZ (g)	81,5 ± 2,3	78,3 ± 2,3	63,5 ± 10,9	44,5 ± 10,8	30,6 ± 10,2
		oZ (h)	80,0 ± 2,8	71,5 ± 3,5	45,2 ± 8,0	19,1 ± 3,4	8,7 ± 1,7

Vergleich verschiedener Behandlungsmethoden a bis h jeweils innerhalb eines Untersuchungszeitpunktes; es unterscheiden sich signifikant:  
zum Zeitpunkt 24 Stunden: ab, af, bc, bd, bg, cd, ce, cf, ch, df, dg, fg, gh  
zum Zeitpunkt 48 Stunden: ab, ac, af, ag, bc, bd, bg, cd, ce, cf, ch, df, eg, fg, gh  
zum Zeitpunkt 72 Stunden: ac, ag, bc, bd, bg, cd, ce, cf, ch, df, eg, fg, gh  
mz/oZ = mit/ohne Zentrifugation; RT = Raumtemperatur

## Schlußfolgerungen

Für die Flüssigkonservierung von Hengstesperma empfiehlt sich bereits für eine Konservierungsdauer von 6 Stunden die Zentrifugation des Samens und Lagerung bei Kühl-schranktemperatur.

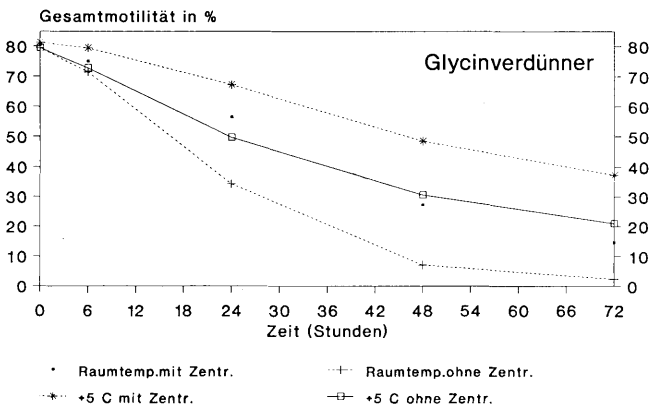
Die Auswahl des Verdüners (Magermilch- oder glycinhaltiger Verdünner) spielt eine untergeordnete Rolle und beeinflusst Spermienbeweglichkeit und -morphologie nicht signifikant.

**Tab. 2:** Vorwärtsbeweglichkeit ( $\bar{x} \pm s$ ) in Prozent von Hengstejakulaten bei Anwendung verschiedener Verdüner, Konservierungstemperaturen und Zentrifugationsverfahren; n = 30

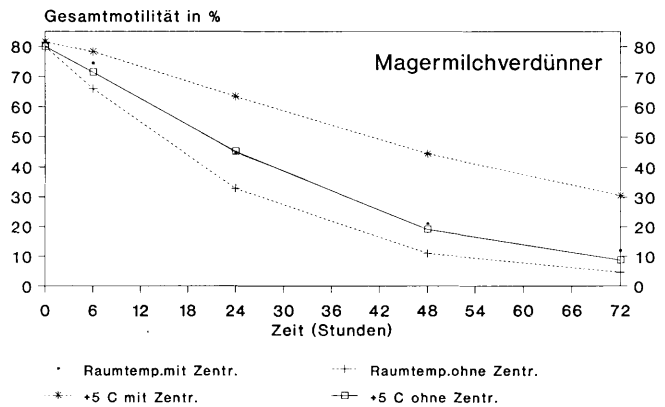
Zeit (Stunden):			0	6	24	48	72
<b>Glycin-Verdünner</b>	RT	mZ (a)	36,9 ± 4,7	22,7 ± 4,1	7,7 ± 3,0	2,5 ± 2,1	0,1 ± 0,2
		oZ (b)	32,5 ± 3,5	18,0 ± 0,5	4,0 ± 1,3	0,1 ± 0,2	0,0 ± 0,0
	5 °C	mZ (c)	37,0 ± 4,0	29,8 ± 3,8	18,8 ± 6,8	6,6 ± 3,8	2,3 ± 1,7
		oZ (d)	32,7 ± 3,8	28,4 ± 15,2	4,9 ± 0,9	1,0 ± 0,9	0,1 ± 0,1
<b>Magermilch-Verdünner</b>	RT	mZ (e)	35,9 ± 3,7	20,8 ± 2,3	5,7 ± 1,7	1,2 ± 0,5	0,1 ± 0,2
		oZ (f)	32,3 ± 2,8	14,1 ± 0,4	2,9 ± 1,3	0,4 ± 0,6	0,0 ± 0,0
	5 °C	mZ (g)	36,2 ± 4,8	28,2 ± 4,0	18,6 ± 5,1	8,8 ± 5,1	2,5 ± 1,7
		oZ (h)	31,7 ± 2,6	19,8 ± 1,6	7,4 ± 2,9	0,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0

Vergleich verschiedener Behandlungsmethoden a bis h jeweils innerhalb eines Untersuchungszeitpunktes; es unterscheiden sich signifikant:  
zum Zeitpunkt 6 Stunden: bc, bd, bg, cf, ch, df, fg  
zum Zeitpunkt 24 Stunden: ac, ag, bc, bg, cd, ce, cf, ch, dg, eg, fg, gh  
mz/oZ = mit/ohne Zentrifugation; RT = Raumtemperatur

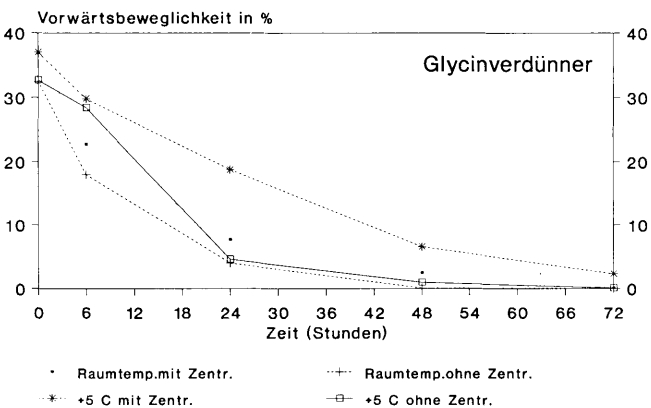
**Abb. 1:** Gesamtmotilitäten ( $\bar{x}$ ) in % von Hengstejakulaten bei Anwendung verschiedener Konservierungstemperaturen und Zentrifugationsverfahren.



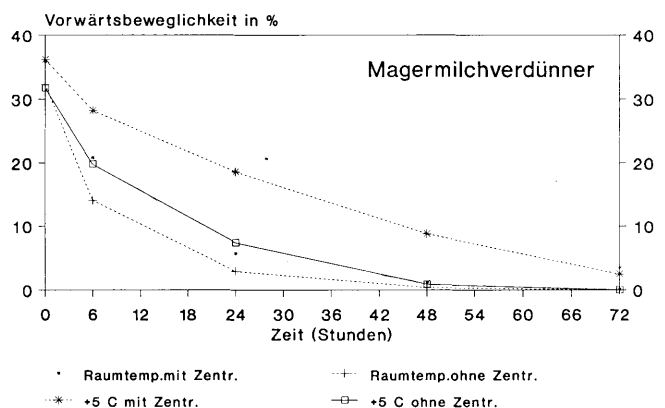
**Abb. 2:** Gesamtmotilitäten ( $\bar{x}$ ) in % von Hengstejakulaten bei Anwendung verschiedener Konservierungstemperaturen und Zentrifugationsverfahren.



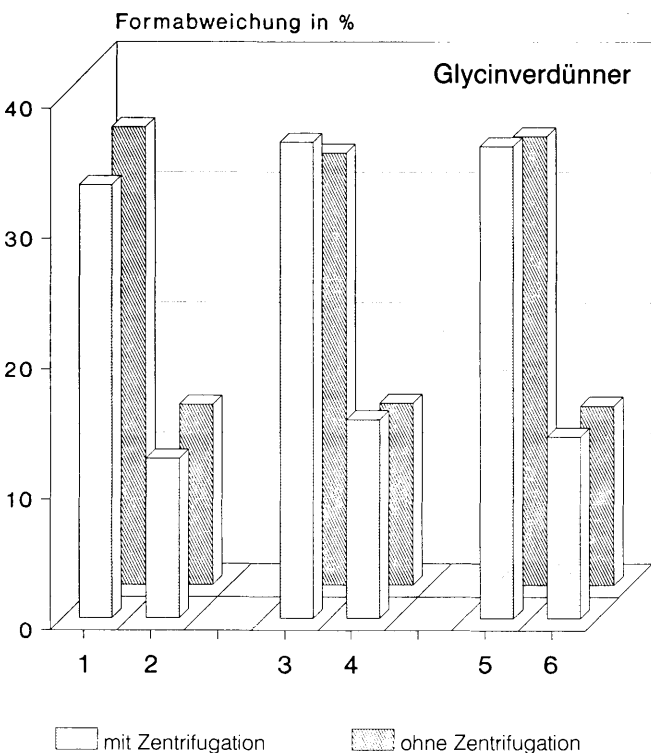
**Abb. 3:** Vorwärtsbeweglichkeit ( $\bar{x}$ ) in % von Hengstejakulaten bei Anwendung verschiedener Konservierungstemperaturen und Zentrifugationsverfahren.



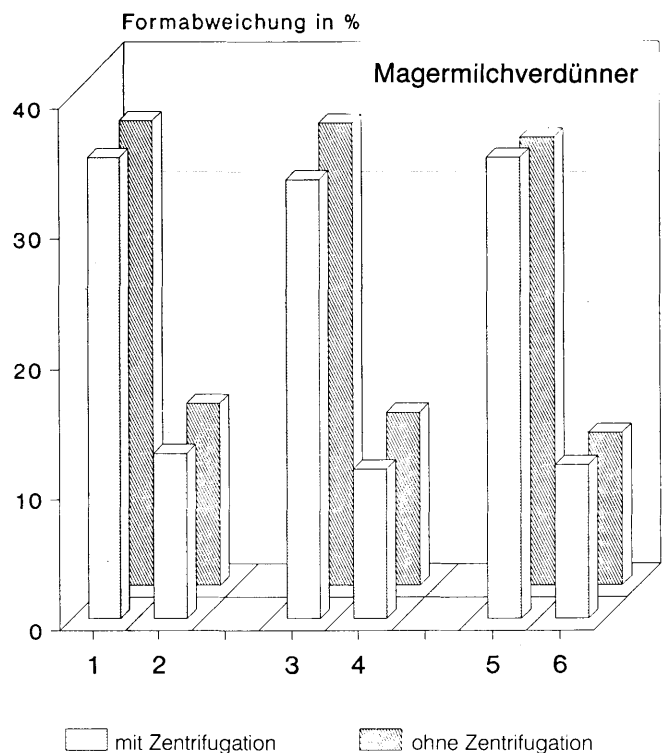
**Abb. 4:** Vorwärtsbeweglichkeit ( $\bar{x}$ ) in % von Hengstejakulaten bei Anwendung verschiedener Konservierungstemperaturen und Zentrifugationsverfahren.



**Abb. 5:** Prozentsätze formveränderter Samenzellen ( $\bar{x}$ ) in Hengstejakulaten bei Anwendung verschiedener Konservierungstemperaturen und Zentrifugationsverfahren.



**Abb. 6:** Prozentsätze formveränderter Samenzellen ( $\bar{x}$ ) in Hengstejakulaten bei Anwendung verschiedener Konservierungstemperaturen und Zentrifugationsverfahren.



## Literatur

- Demick, D. S., Voss, J. L., und Pickett, B. W. (1976): Effect of cooling, storage, glycerolization, and spermatozoal numbers on equine fertility. *J. Anim. Sci.* 43, 633-637.
- Douglas-Hamilton, D. H., Burns, P. J., Driscoll, D. D., und Viale, K. M. (1987): Fertility and characteristics of slow cooled stallion semen. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 35, 649-650.
- Douglas-Hamilton, D. H., Osol, R., Osol, G., Driscoll, D., und Noble, H. (1984): A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology* 22, 291-304.
- Heiskanen, M. L., Pirhonen, A., Koskinen, E., und Menp, P. H. (1987): Motility and ATP content of extended equine spermatozoa in different storage conditions. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 35, 103-107.
- Holst, W. van der, (1984): Stallion semen production in A.I. programs in the Netherlands. In *Courot, M.* (Ed.): *The male in farm animal reproduction*. Martinus Nijhof Publishers, Boston, Dordrecht und Lancaster, 195-201.
- Kenney, R. M., Bergmann, R. V., Cooper, W. L., und Morse, G. W. (1975): Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. *Proc. of the Ann. Conf. Am. Assoc. Equine Pract.* 21, 327-336.
- Kluge, E. (1987): Einrichtung moderner Pferdebesamungsstationen. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 94, 478-480.

- Kreider, J. L., Tindall, W. C., und Potter, G. D. (1985): Inclusion of bovine serum albumin in semen extenders to enhance maintenance of stallion sperm viability. *Theriogenology* 23, 399-408.
- Oettle, E. E. (1986): Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. *Vet. Med.* 81, 263-266.
- Palmer, E. (1984): Factors affecting stallion semen survival and fertility. 10th Intern. Congr. Anim. Reprod. and A. I., Urbana-Champaign, Bd. III, 377 (3-pp).
- Rasbech, N. O. (1984): Instrumental inseminering i hesteavl. *Dansk Vet. Tidsskr.*, 67, 11, 1/6.
- Tekin, N., Wöckener, A., und Klug, E. (1989): Konservierungsfähigkeit von Pferdesamen bei Einsatz zweier Verdüner und Konservierungstemperaturen. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* 96, 258-265.
- Varnier, D. D., Blanchard, T. L., Love, C. L., Garcia, M. C., und Kenney, R. M. (1988): Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology* 29, 5, 1043-1054.
- Vries, P. J. de (1987): Evaluation of the use of fresh, extended, transported stallion semen in the Netherlands. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 35, 641.

Dr. Antje Wöckener  
Klinik für Andrologie und Besamung der Haustiere  
Bischofsholer Damm 15  
D-3000 Hannover 1

Für die Pferdepraxis bieten wir an:

### Hippogrip® K

**Der bewährte Influenza-Impfstoff Hippogrip® für Pferde jetzt mit dem Stamm A equi 2 (Kentucky\*).**

\*Der Stamm des Subtyps A equi 2 (Kentucky) ist serologisch und immunologisch identisch mit dem Stamm Fontainebleau.

**Inaktivierter Impfstoff zur aktiven Immunisierung gesunder Pferde gegen Influenza.**

**Zusammensetzung:**  
1 Impfdosis enthält in 1 ml wässriger Suspension: Mit Betapropiolacton inaktivierte Pferde-Influenza-Virus-Antigene der Stämme A equi 1 (Prag) mind. 15 µg HA\*, A equi 2 (Miami) mind. 15 µg HA\*, A equi 2 (Kentucky) mind. 7,5 µg HA\*, vermehrt auf embryonierten Hühnereiern und maximal 0,1 mg Thiomersal als Konservierungsmittel.

\*ermittelt im SRD (single radial immunodiffusion test)  
Zul.-Nr.: 170a/84

**Auch als Kombinationsimpfstoff gegen Influenza und Tetanus.**

### Hippogrip® KT

**Inaktivierter Impfstoff zur aktiven Immunisierung gesunder Pferde gegen Influenza und Tetanus.**

**Zusammensetzung:**  
1 Impfdosis enthält in 1 ml wässriger Suspension: Mit Betapropiolacton inaktivierte Pferde-Influenza-Virus-Antigene der Stämme A equi 1 (Prag) mind. 15 µg HA\*, A equi 2 (Miami) mind. 15 µg HA\*, A equi 2 (Kentucky) mind. 7,5 µg HA\*, vermehrt auf embryonierten Hühnereiern und maximal 0,1 mg Thiomersal als Konservierungsmittel, sowie mind. 150 IE Tetanustoxoid mit maximal 3,5 mg AlPO<sub>4</sub> als Adsorbat.

\*ermittelt im SRD (single radial immunodiffusion test)  
Zul.-Nr.: 173a/84

**Gegenanzeigen:** (K und KT)  
Kranke Tiere, ferner solche, bei denen der Verdacht einer latenten Erkrankung besteht, oder Tiere, die unter starker Streßwirkung stehen (Training, Transporte)

**Wartezeit:** (K und KT)  
Keine Wartezeit erforderlich.

**Handelsform:** (K und KT)  
2 x 1 Dosis  
5 x 1 Dosis

### My 301®

**Das Muskelrelaxans für alle Tierarten.**

**Besonders bewährt beim sicheren, medikamentösen Niederlegen der Pferde und zur Unterstützung der Tetanusbehandlung.**

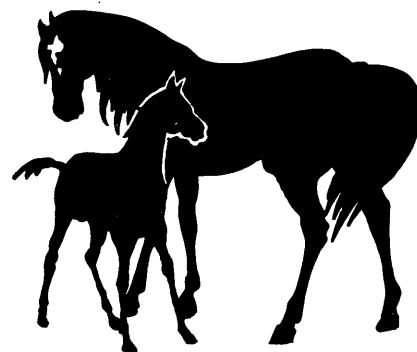
**Zusammensetzung**  
1 g Pulver enthält:  
Guaifenesin 500 mg, Glucose-Monohydrat 500 mg

**Gegenanzeigen:**  
Bei tragenden Tieren nur bei strenger Indikationsstellung anwenden.

**Nebenwirkungen**  
Reversible Leukozytose mit Rechtsverschiebung. Bei Verdacht auf Vorliegen von Knochenmarkserkrankungen nur nach Kontrolle des Differentialblutbildes anwenden.

**Wartezeit**  
Eßbares Gewebe 5 Tage  
Milch 5 Tage

**Handelsform**  
100 g, 1 kg



Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG  
Dreyerstraße 8-12, 3000 Hannover 1, Telefon (0511) 15143

