

# Einfluss der Zentrifugationsmethode auf die Qualität und Kryokonservierung von Hengstsamen\*

S. Weiss<sup>1</sup>, F. Janett<sup>2</sup>, D. Burger<sup>1</sup>, M. Hässig<sup>2</sup>, R. Thun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nationalgestüt, Avenches, <sup>2</sup>Klinik für Fortpflanzungsmedizin der Universität Zürich

## Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss von verschiedenen Zentrifugationsmethoden auf Spermienverlust und Gefriersamenqualität abzuklären. Dazu wurden je drei Ejakulate von 8 gekörnten Warmbluthengsten des Nationalgestüts Avenches gewonnen, und zur Entfernung des Seminalplasmas nach drei verschiedenen Methoden zentrifugiert. Bei Methode I (Referenzmethode) erfolgte die Zentrifugation bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von  $600 \times g$  während 10 Minuten. Bei Methode II wurde bei  $1000 \times g$  während 2 Minuten und bei Methode III bei  $2000 \times g$  während 2 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden jeweils 90% des Überstandes abpipettiert und darin die Anzahl Samenzellen (Spermienverlust) bestimmt. Nach Resuspension mit Gefrierverdünner erfolgte die Bestimmung der funktionellen Membranintegrität mittels HOS-Test sowie die Beurteilung der Motilität. Im aufgetauten Samen prüften wir die Motilität, die Vitalität (SYBR-14/PI), die funktionelle Membranintegrität (HOS-Test) und den Akrosomstatus mit dem Chlortetracyclinassay (CTA). Unsere Ergebnisse zeigen, dass der durchschnittliche Spermienverlust (I, 1,9%; II, 8,7%; III, 3,7%) bei allen drei Zentrifugationsmethoden signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden war. Bei den Samenqualitätsparametern im aufgetauten Samen konnten wir nur im HOS-Test bei Methode III (52,1%) signifikant schlechtere Werte als bei den Methoden I (55,5%) und II (55,3%) feststellen. Der zur Bestimmung des Akrosomstatus durchgeführte CTA zeigte, dass bei allen drei Methoden im aufgetauten Samen mehr als 70% der Spermien kapazitiert und rund 25% kapazitiert und akrosomreagiert waren. Aufgrund unserer Ergebnisse kann gefolgert werden, dass sowohl der Spermienverlust wie auch die funktionelle Membranintegrität (HOS-Test) im aufgetauten Samen von der Zentrifugationsmethode signifikant beeinflusst wird. Deshalb soll der Hengstsamen vor der Kryokonser-

## The influence of centrifugation on quality and freezability of stallion semen

The aim of the present study was to investigate the influence of various centrifugation methods on sperm loss and quality of frozen-thawed semen. From a total of 8 Warmblood stallions of the National Stud Farm in Avenches, 3 ejaculates each were collected and seminal plasma was removed using 3 different centrifugation regimes. In method I (reference method) centrifugation occurred by a speed of  $600 \times g$  during 10 minutes. In method II  $1000 \times g$  was used during 2 minutes while in method III centrifugation was performed by  $2000 \times g$  during 2 minutes. After centrifugation 90% of the supernatant was removed and sperm loss calculated. After resuspension of the pellet with freezing medium, functional membrane integrity was evaluated by HOS-test and motility determined. In frozen-thawed semen motility, viability as well as functional membrane integrity (HOS-test) and acrosome status using chlortetracyclin assay (CTA) were assessed. Our results demonstrate that mean sperm loss (I, 1,9%; II, 8,7%; III, 3,7%) was significantly ( $P < 0.05$ ) different between the three centrifugation regimes. Regarding semen quality of frozen-thawed semen, HOS in method III (52,1%) was significantly lower than in methods I (55,5%) and II (55,3%). Evaluation of the acrosome status by CTA showed that more than 70% of sperm cells were capacitated and 25% capacitated and acrosome reacted. From our results we conclude that sperm loss and functional membrane integrity (HOS-test) in frozen-thawed semen were significantly influenced by the centrifugation regime. Therefore, stallion semen should be centrifuged at  $600 \times g$  during 10 minutes before freezing in order to obtain low sperm loss and a good quality of frozen-thawed semen.

\* Dissertation S. Weiss (2004)

vierung bei 600 × g während 10 Minuten zentrifugiert werden, da mit dieser Methode der Spermienverlust am geringsten und die Samenqualität nach dem Auftauen am besten waren.

**Schlüsselwörter:** Hengst, Kryokonservierung, Samenqualität, Zentrifugation

**Key words:** stallion, cryopreservation, semen quality, centrifugation

## Einleitung

Die Bedeutung der künstlichen Besamung (KB) in der Pferdezucht hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Vor allem die lange Haltbarkeit und gute Transportmöglichkeit des Gefriersamens steigerten das Interesse der Züchterschaft an dieser Technik. Ein zusätzlicher Vorteil von tiefgefrorenem Samen liegt darin, dass er für die Zucht auch nach dem Tod des Hengstes verfügbar bleibt. Dies sind Gründe weshalb heute immer mehr Stuten, besonders solche aus dem Sport, künstlich besamt werden. In der Schweiz macht die künstliche Besamung mit Gefriersamen bereits 20% aller Belegungen bei Warmblutstuten aus und die Tendenz, Gefriersamen von Leistungshengsten aus dem Sport zu verwenden, nimmt stetig zu. Die trainings- und wettkampfbedingte Abwesenheit dieser Hengste von der Station schränkt die Bereitstellung von Frisch- und Kühlsamen während der Zuchtsaison stark ein. Deshalb wird die Produktion von Gefriersamen immer öfters während der sportfreien Wintermonate angestrebt. Als Nachteile der KB mit Tiefgefriersamen müssen im Vergleich zur Frischsamenübertragung der höherer Arbeitsaufwand hinsichtlich Samenproduktion und Stutenmanagement sowie eine geringere Trächtigkeitsrate in Kauf genommen werden. Als Ursache für die schlechtere Fruchtbarkeit werden vor allem die bei der Samenverarbeitung hervorgerufenen Membranschädigungen angenommen, welche die Vitalität und Befruchtungsfähigkeit der Spermien deutlich mindern (Blach et al., 1988; Watson, 2000). Dies hat zur Folge, dass im Vergleich zu Kühl- oder Frischsamen die Trächtigkeitsrate pro Zyklus geringer ist (30–40% vs. 50%) und die Stuten deshalb oft mehrmals besamt werden müssen. Unter günstigen Bedingungen, wie gute Samenqualität nach dem Auftauen sowie eine geschlechtsgesunde Stute und ein optimaler Beamungszeitpunkt, können aber mit Gefriersamen am Ende der Zuchtsaison ebenfalls Trächtigkeitsraten von mehr als 80% erreicht werden (Samper et al., 1995).

Aufgrund der grossen individuellen Variabilität der Samenqualität produzieren nur etwa 25% alle Zuchthengste Samen, der nach Gefrieren und Auftauen zu ähnlichen Trächtigkeitsraten pro Saison führt wie nach

Frischsamenbelegungen (Amann und Pickett, 1987). Einige Autoren (Amann und Pickett, 1987; Samper et al., 1994) berichten sogar, dass sich gewisse Hengste unabhängig von der Qualität des Frischsamens für den Gefrierprozess besser eignen (good freezers) als andere (poor freezers). Als weitere Einflussfaktoren auf die Kryokonservierbarkeit gelten Dichte und Motilität im Frischsamen (Samper et al., 1994), die Samenkonzentration, die Einfriergeschwindigkeit sowie Dauer und Temperatur beim Auftauen (Cochran et al., 1984; Blach et al., 1989; Pickett et al., 1993; Borg et al., 1997). Hengstsamen wird vor der Kryokonservierung routinemässig zur Entfernung des Seminalplasmas zentrifugiert. Damit werden mögliche negative Effekte des Seminalplasmas auf die Spermien während des Tiefgefrierens gemindert (Corteel, 1980; Jasko et al., 1991; Samper und Morris, 1998). Jasko et al. (1991) zeigten, dass trotz Entfernung des Seminalplasmas die Motilität der Spermien erhalten bleibt. Als Nachteile der Zentrifugation sind jedoch Spermienverlust und Samenzellschädigungen zu nennen, die sowohl von der Zentrifugationszeit wie auch der Zentrifugationsstärke abhängen.

Da kontrollierte Studien über die Nachteile der Zentrifugation von Hengstsamen fehlen, bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, den Einfluss von drei verschiedenen Zentrifugationsmethoden auf Spermienverlust und Gefriersamenqualität genauer abzuklären.

## Tiere, Material und Methoden

### Tiere

Für die vorliegenden Untersuchungen standen 8 in der Schweiz gekörte Warmbluthengste des Nationalgestüts Avenches zur Verfügung. Die Hengste waren zwischen 8 und 21 Jahre alt und wurden während des ganzen Jahres auf dem Gestüt gehalten. Die Fütterung bestand aus Heu (zweimal täglich 3 kg), Hafer (dreimal täglich 1–2 Liter) sowie Pellets (täglich 1–2 Liter) und einmal pro Woche Mash. Wasser stand ad libitum

zur Verfügung. Die Hengste wurden täglich bewegt oder konnten auf die Weide. Während der Decksaison (März bis Juni) standen die Hengste im Zuchteinsatz. Vor Versuchsbeginn wurden die extragonadalen Spermienreserven durch Samenentnahmen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen minimiert und die Tiere an das Phantom gewöhnt. Während des Versuchs wurden die Hengste jeweils am Montag, Mittwoch und Freitag abgesamt und insgesamt 24 Ejakulate untersucht und kryokonserviert.

### Untersuchungen im Frischsamen

Unmittelbar nach der Samengewinnung wurde die gelfreie Fraktion des Ejakulates ins Wasserbad (37°C) gestellt, das Volumen in einem Messzylinder abgelesen und die Spermienkonzentration mit einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer gemäss Richtlinien der WHO (WHO-Laborhandbuch, 1999) überprüft. Anschliessend wurde das Ejakulat mit INRA 82-Hepes +2% Eigelb auf 100 Mio. Spermien/ml verdünnt. Die Bestimmung der progressiven Motilität erfolgte mit einem Mika Motion Analyzer (Cell Motion Analyzer SM-CMA-1074, MTM, Montreux). Dazu wurden 3 Tropfen à 6 µl des verdünnten Ejakulates auf einen erwärmten (37°C) Objektträger gegeben, mit Deckgläsern (24 mm × 24 mm) versehen und je 4 Felder pro Tropfen ausgewertet. Dies ergab 12 Messungen, wobei jeweils mindestens 500 Spermien beurteilt wurden.

### Zentrifugation

Der verdünnte Samen wurde bei Raumtemperatur in drei gleiche Aliquote aufgeteilt, in 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und nach drei verschiedenen Methoden bei freiem Auslauf zentrifugiert (Hermle Zentrifuge ZK 380, E. Renggli AG, Rotkreuz, Winkelrotor 6 × 50 ml, Radius 10.5 cm). Als Methode I (Referenzmethode) wurde das französische Verfahren (Vidament et al., 2001) gewählt. Dabei wurde das verdünnte Ejakulat bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 600 × g während 10 Minuten zentrifugiert. Bei Methode II wurde bei 1000 × g während 2 Minuten und bei Methode III bei 2000 × g während 2 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden jeweils 90% des Überstandes abpipettiert und darin die Spermiedichte bestimmt. Das Produkt aus Volumen und Dichte im Überstand wurde als Spermienverlust definiert. Das Spermienpellet wurde mit dem Gefrierverdüner (INRA 82-Hepes +2% Eigelb + 2.5% Glycerin) auf 100 Millionen Spermien/ml resuspendiert. Anschliessend wurde zur Ermittlung der funktionellen Membranintegrität der HOS-Test (Jeyendran et al., 1984; Neild et al., 2000) durchgeführt und die progressive Motilität gemessen.

### HOS-Test

Zur Durchführung des HOS-Tests wurden 1 ml HOS-Lösung (Lactose 50 mmol/l) und 100 ml Ejakulat während 30 Minuten bei 37°C inkubiert (Neild et al., 2000) und davon ein 5 ml grosser Tropfen auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas (24 mm × 24 mm) versehen und bei 400facher Vergrösserung im Phasenkontrastmikroskop insgesamt 200 Spermien beurteilt. Aufgrund der morphologischen Veränderungen des Spermischwanzes konnte der prozentuale Anteil geschwollener Spermien (HOS-positiv) bestimmt werden.

### Samentiefgefrierung

Die Kühlung des Samens auf 4°C erfolgte während einer Stunde in der Kühlvitrine auf einem Mischgerät (Rock'n Roller, Minitüb, Landshut, Deutschland). Anschliessend fanden die Konfektionierung in 0.5 ml Pailletten (MRS1 Cassou, IMV, Aigle, Frankreich) sowie die Samentiefgefrierung (Minidigitcool 700 ZB 290, IMV, Aigle, Frankreich) mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 60°C/Min. von +4°C bis -100°C und 30°C/Min. von -100°C bis -140°C statt. Die tiefgefrorenen Pailletten wurden im Flüssigstickstoff bei -196°C gelagert.

### Untersuchungen im aufgetauten Samen

An der Klinik für Fortpflanzungsmedizin wurden von jedem Ejakulat jeweils zwei Pailletten im Wasserbad bei 37°C während 30 Sekunden aufgetaut und zusammengegeben. Im aufgetauten Samen wurden der HOS-Test, die progressive Motilität sowie die Vitalität (strukturelle Membranintegrität) und der Akrosomstatus bestimmt.

### Vitalität

Zur Bestimmung der Vitalität wurde eine DNA-Doppelfärbung durchgeführt (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande). Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-14 zeigt eine hohe Affinität zur DNA lebender und toter Zellen, während Propidiumjodid (PI) nur die Zellmembran toter Zellen zu durchdringen vermag (Garner et al., 1994). SYBR-14 (Komponente A) wurde mit DMSO 100% in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt (Komponente AL). Propidiumjodid (Komponente B) wurde in der Form verwendet, wie sie von der Firma geliefert wird. Zu 500 µl aufgetautem, auf 37°C gewärmtem Samen wurde 1 µl der Komponente B zugegeben und während 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 3 Minuten wurde 1 µl der Komponente AL dazugegeben und während einer weiteren Minute bei 37°C inkubiert. Dann wurden 5 µl des

gefärbten Samens auf einen Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas (24 mm × 24 mm) versehen und bei 400facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Olympus BX50 U Plan Apo 40 × 0.85 mit Fluoreszenzeinrichtung, U-MWIB-Filtermodul, Hochdruck-Hg-Lampe) betrachtet. Über eine am Mikroskop angeschlossene Videokamera (Color CCD Camera, SANYO VCC-2972) konnten die emittierten Fluoreszenzen auf einen SONY Trinitron Video Monitor (PVM-1440 QM) projiziert und 200 Spermien ausgezählt werden.

### Akrosomstatus

Die Bestimmung des Akrosomstatus erfolgte mittels Chlortetracyclinassay (CTA). Dabei können je nach Fluoreszenzmuster des Spermienkopfes nicht kapazitierte von kapazitierten akrosomintakten und akrosomreagierten Spermien unterschieden werden. Nicht kapazitierte, akrosomintakte Spermien (CTC-F) zeigen eine uniforme Fluoreszenz über den ganzen Spermienkopf, kapazitierte, akrosomintakte Spermien (CTC-B) sind durch ein fluoreszierendes Akrosom und eine fehlende Fluoreszenz im postakrosomalen Bereich gekennzeichnet. Kapazitierte, akrosomreagierte Spermien (CTC-AR) zeigen hingegen keine Fluoreszenz im Akrosombereich, können aber in der postakrosomalen Region fluoreszieren (Wang et al., 1995; Maxwell und Johnson, 1997; Hewitt und England, 1998; Parker et al., 2000; Rathi et al., 2001; Schembri et al., 2002). Die Reagenzien für den CTA wurden gemäss Angaben von Maxwell und Johnson (1997) hergestellt. Zu 20 µl Samen, der auf 37°C erwärmt war, wurden 20 µl CTC-Lösung hinzugegeben und gemischt. Dazu kamen 5 µl Fixierlösung und 50 µl DABCO-Lösung. Die Komponenten müssen strikt im Dunkeln zusammen gegeben und gemischt werden. Ein 2 µl grosser Tropfen wurde auf einen Objektträger gegeben und mit einem 24 × 24 mm Deckglas versehen. Unter dem Mikroskop (Olympus BX50 U Plan Fl 100 × / 1.30 Oil Ph<sub>3</sub> mit Fluoreszenzeinrichtung, U-MSWB-Filtermodul, Hochdruck-Hg-Lampe) wurden bei 1000facher Vergrößerung 200 Spermien ausgewertet.

### Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm StatView 5.0 (SAS Institut, Dübendorf). Der Einfluss der Zentrifugationsmethode und des Hengstes auf den Spermienverlust und die Samenqualitätsparameter wurden mit einer multivariaten Varianzanalyse geprüft. Die graphische Darstellung der Parameter erfolgte mit Boxplots. Zur Berechnung der Unterschiede zwischen den Zentrifugationsmethoden wurden die Ergebnisse dem Fisher's

PLSD post hoc Test unterzogen. Die Signifikanzschwelle wurde auf 0.05 festgelegt.

### Ergebnisse

Die Ergebnisse über den Einfluss der Zentrifugationsmethode sowie des Hengstes auf den Spermienverlust und die Gefriersamenqualität sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Daraus ist klar ersichtlich, dass die Zentrifugationsmethode einen signifikanten ( $P < 0.05$ ) Einfluss sowohl auf Spermienverlust und funktionelle Membranintegrität (HOS-positiv) bei aufgetauten Samenzellen hatte. Der Hengst zeigte einen signifikanten ( $P < 0.05$ ) Einfluss auf die Motilität, den

Tabelle 1: Einfluss von Hengst, Zentrifugationsmethode sowie Interaktion Hengst × Zentrifugationsmethode auf Spermienverlust und Samenqualität.

Parameter	Hengst P	Methode P	Interaktion P
Spermienverlust (%)	> 0.05	< 0.0001	> 0.05
Motilität Endverdünnung (%)	> 0.05	> 0.05	> 0.05
HOS positiv Endverdünnung (%)	> 0.05	> 0.05	> 0.05
Motilität aufgetaut (%)	< 0.0001	> 0.05	> 0.05
HOS positiv aufgetaut (%)	< 0.0029	< 0.0418	> 0.05
Vitalität aufgetaut (%)	< 0.0001	> 0.05	> 0.05
CTA-F (%)	> 0.05	> 0.05	> 0.05
CTA-B (%)	> 0.05	> 0.05	> 0.05
CTA-AR (%)	> 0.05	> 0.05	> 0.05

Tabelle 2: Spermienverlust und Samenqualität ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ ) von je 24 Ejakulaten bei 3 verschiedenen Zentrifugationsmethoden (I: 600 × g, 10 Min.; II: 1000 × g, 2 Min.; III: 2000 × g, 2 Min.).

Parameter	Methode I ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )	Methode II ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )	Methode III ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )
Spermienverlust (%)	1.9 <sup>a</sup> ± 0.3	8.7 <sup>b</sup> ± 1.0	3.7 <sup>c</sup> ± 0.4
Motilität Endverdünnung (%)	72.2 ± 3.7	70.6 ± 3.6	69.6 ± 4.6
HOS positiv Endverdünnung (%)	72.1 ± 2.6	69.1 ± 3.7	74.2 ± 2.0
Motilität aufgetaut (%)	44.8 ± 3.9	44.6 ± 4.2	42.3 ± 3.9
HOS positiv aufgetaut (%)	55.5 <sup>a</sup> ± 2.2	55.3 <sup>a</sup> ± 2.1	52.1 <sup>b</sup> ± 2.0
Vitalität aufgetaut (%)	58.8 ± 3.3	60.4 ± 2.9	61.4 ± 3.2
CTA-F (%)	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.2
CTA-B (%)	71.9 ± 2.4	74.1 ± 2.2	71.6 ± 2.3
CTA-AR (%)	26.9 ± 2.5	24.9 ± 2.3	26.5 ± 2.3

<sup>a,b,c</sup> Werte mit unterschiedlichen Indizes sind signifikant verschieden ( $P < 0.05$ )

HOS-Test sowie auf die Vitalität im aufgetauten Samen. Die Unterschiede des Spermienverlustes und der Samenqualitätsparameter zwischen den einzelnen Zentrifugationsmethoden sind in Tabelle 2 angegeben. Deutlich zeigt sich, dass der durchschnittliche Spermienverlust an Samenzellen zwischen den drei Zentrifugationsmethoden signifikant ( $P < 0.05$ ) verschieden war. Am geringsten war der Verlust bei Methode I (1.9%) und am höchsten bei Methode II (8.7%).

Die minimalen bzw. maximalen Spermienverluste gehen aus Abbildung 1 hervor und schwankten bei Methode I von 0.3 bis 7.2%, bei Methode II von 2.1 bis 21.3% und bei Methode III von 0.6 bis 9.1%.

Beim HOS-Test im aufgetauten Samen zeigte Methode III signifikant weniger HOS-positive Spermien als Methoden I und II. Der minimale und maximale Anteil an HOS-positiven Spermien bewegte sich bei Methode I zwischen 33.5 und 70.5%, bei Methode II

zwischen 38.0 und 69.5% und bei Methode III zwischen 30.0 und 63.0% (Abb. 2).

## Diskussion

Vor dem Tiefgefrieren von Hengstsamen ist die Zentrifugation ein routinemässig durchgeführter Schritt. Mit der teilweisen Entfernung des Seminalplasmas soll dessen schädigender Einfluss auf die Spermien während der Kryokonservierung gemindert und die Spermiedichte nach Resuspension des Pellets erhöht werden. Als Nachteile der Zentrifugation müssen Spermienverluste und Membranschädigungen der Samenzellen genannt werden, was die Vitalität und Befruchtungsfähigkeit der Spermien stark beeinträchtigen kann (Blach et al., 1989; Watson, 2000). Um das Ausmass dieser negativen Auswirkungen abzuklären, wurden in der vorliegenden Studie drei verschiedene Zentrifugationsmethoden miteinander verglichen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sowohl der Spermienverlust wie auch die funktionelle Membranintegrität (HOS-Test) im aufgetauten Samen von der Zentrifugationsmethode signifikant beeinflusst werden. Bei Methode I, die in Frankreich entwickelt wurde und heute weit verbreitet zur Anwendung kommt, wird bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von  $600 \times g$  während 10 Minuten zentrifugiert. Ein Vergleich zu den Methoden II ( $1000 \times g$ , 2 Min.) und III ( $2000 \times g$ , 2 Min.) zeigt, dass bei einer Erhöhung der g-Zahl mit gleichzeitiger Reduktion der Zentrifugationsdauer auf 2 Minuten der Spermienverlust deutlich erhöht wird. Da der Verlust bei Methode II (8.7%) verglichen mit den Methoden I (1.9%) und III (3.7%) am höchsten war, kann gefolgert werden, dass bei einer Zentrifugationsdauer von 2 Minuten die g-Zahl über 2000 erhöht werden muss, um den Spermienverlust gering zu halten. In diesem Zusammenhang muss jedoch berücksichtigt werden, dass mit einer Erhöhung der Zentrifugalbeschleunigung auch die Membranschädigungen (HOS-Test) der Samenzellen nach dem Auftauen signifikant ansteigen. Nach Aitken und Clarkson (1988) sollen die nach der Zentrifugation menschlicher Ejakulate beobachteten Membranschädigungen irreversibel und auf sogenannte «reactive oxygen species» (ROS) zurückzuführen sein. Dabei soll die Zentrifugationszeit eine grössere Rolle spielen als die Zentrifugalbeschleunigung (Shekarriz et al., 1995).

Angaben aus der Literatur zeigen, dass nach der Zentrifugation von Ejakulaten bezüglich Spermienverlust und Spermenschädigung tierartliche Unterschiede bestehen. So haben Carvajal et al. (2001) gezeigt, dass nach Zentrifugation von Eberejakulaten bei  $2400 \times g$  während 3 Minuten die Vitalität und *in vitro* Penetration homologer Oozyten der aufgetauten Spermien

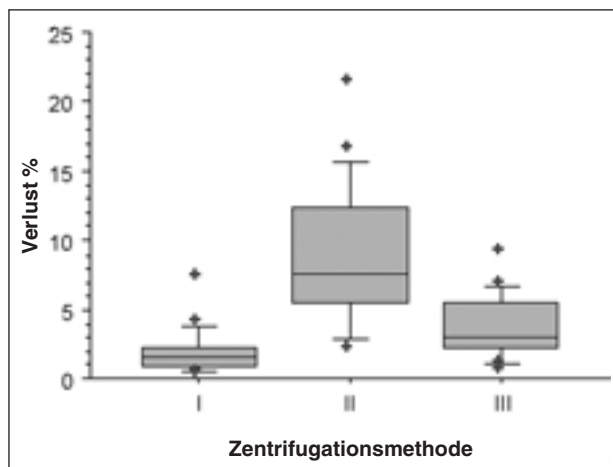


Abbildung 1: Boxplot-Darstellung des Spermienverlustes von je 24 Ejakulaten bei 3 verschiedenen Zentrifugationsmethoden (I:  $600 \times g$ , 10 Min.; II:  $1000 \times g$ , 2 Min.; III:  $2000 \times g$ , 2 Min.).

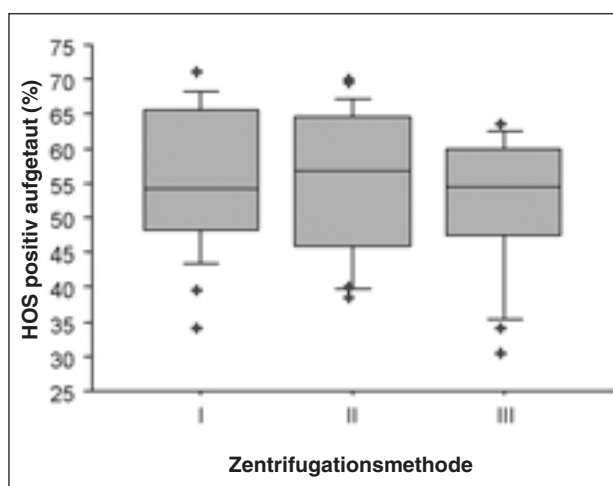


Abbildung 2: Boxplot-Darstellung der HOS-positiven Spermien im aufgetauten Samen von je 24 Ejakulaten bei 3 verschiedenen Zentrifugationsmethoden (I:  $600 \times g$ , 10 Min.; II:  $1000 \times g$ , 2 Min.; III:  $2000 \times g$ , 2 Min.).

besser waren als bei  $800 \times g$  während 10 Minuten (Referenzmethode, Westendorf et al., 1975). Allerdings wurde bei Anwendung der Referenzmethode beim Eber ein Spermienverlust zwischen 19 und 25% (Erikson et al., 2002) gefunden, was im Vergleich zu Hengstsamen (1.9%) bei einer Zentrifugalbeschleunigung von  $600 \times g$  während 10 Minuten deutlich höher ist. Anders als beim Eber, aber ähnlich wie beim Hengst wird bei der Konservierung von Rüdensamen eine Zentrifugation bei  $720 \times g$  während 5 Minuten empfohlen. Mit dieser Methode betrug der Spermienverlust nur 2.3% und die Vitalität der konservierten Spermien war deutlich besser als bei höheren  $g$ -Zahlen (Rijsselaere et al., 2002).

In unseren Untersuchungen haben wir neben der Beurteilung der funktionellen Membranintegrität mittels HOS auch den Akrosomstatus mit Hilfe des Chlortetracyclinassays (CTA) genauer abgeklärt. Das in diesem Test eingesetzte Chlortetracyclin besitzt die Eigenschaft nach Bindung mit freien Kalzium-Ionen zu fluoreszieren. Da die intrazelluläre Zunahme freier Kalzium-Ionen zur Auslösung von Kapazitation- und Akrosomreaktion von entscheidender Bedeutung ist, können mit dem CTA nicht kapazitierte von kapazitierten akrosomintakten und akrosomreagierten Spermien unterschieden werden. Der CTA wurde schon früher bei verschiedenen Spezies wie Maus (Sailing und Storey, 1979), Schwein (Wang et al., 1995), Rind (Fraser et al., 1995), Schaf (Gillan et al., 1997), Ziege (Kaul et al., 1997), Pferd (Varner et al., 1987; Rathi et al., 2001; Schembri et al., 2002), Hund (Hewitt und England, 1998) und auch beim Menschen (Lee et al., 1987) erfolgreich angewendet. Nach Vergleich aller drei Zentrifugationsmethoden konnten wir keine signifikanten Unterschiede im Akrosomstatus feststellen. Unerwartet war für uns die Beobachtung, dass im aufgetauten Samen bei allen drei Methoden mindestens

70% der Spermien kapazitiert und rund 25% kapazitiert und akrosomreagiert waren. Dieses Ergebnis deckt sich mit demjenigen von Schembri et al. (2002), die rund 65% kapazitierte und über 30% akrosomreagierte Spermien im aufgetauten Hengstsamen fanden. Diese Autoren zeigten ausserdem, dass im Frischsamen mehr als 90% nicht kapazitierte Spermien vorhanden waren und dass die nach Kryokonservierung beobachteten Akrosomveränderungen hauptsächlich auf die Entfernung des Seminalplasmas und anschließende Resuspension des Pellets mit Verdüner zurückzuführen waren. Der erhöhte Anteil an kapazitierten und akrosomreagierten Spermien nach Zentrifugation könnte ein weiterer Grund für die reduzierte Fruchtbarkeit nach Gefriersamenübertragung sein. Bei der Produktion von Tiefgefriersperma sollte deshalb nicht der ganze Ejakulatüberstand entfernt werden, doch ist nicht genau bekannt welche Restmenge Seminalplasma im Gefriermedium verbleiben sollte. Nach Amann und Pickett (1987) wird empfohlen nach der Zentrifugation rund 90% des Überstandes zu verwerfen.

Wie schon aus früheren Untersuchungen (Janett et al., 2000, 2003a, 2003b) bekannt ist, konnten wir auch in dieser Studie einen signifikanten Einfluss des Hengstes auf Motilität, HOS und Vitalität des aufgetauten Samens nachweisen. Eine Interaktion von Hengst und Zentrifugationsmethode war jedoch nicht vorhanden. Dies zeigt einmal mehr, dass bei der Gefriersamenproduktion der Hengst die grösste Variable darstellt.

Zusammenfassend erlauben unsere Ergebnisse die Schlussfolgerung, dass bei der Kryokonservierung von Hengstsamen die Zentrifugation bei  $600 \times g$  während 10 Minuten hinsichtlich Spermienverlust und Qualität des aufgetauten Samens den grössten Erfolg verspricht.

### Influence de la méthode de centrifugation sur la qualité et la cryoconservation de semence d'étalon

Le but de cette étude était d'éclaircir l'influence de diverses méthodes de centrifugation sur la perte en spermatozoïdes et la qualité de la semence congelée. Pour ce faire, on a recueilli 3 éjaculats provenant de 8 étalons approuvés du Haras national d'Avenches et on les a centrifugés pour séparer le plasma séminal selon 3 méthodes différentes. Dans la méthode I (méthode de référence), la centrifugation a eu lieu avec une accélération de  $600 \times G$  pendant 10 minutes. Dans la méthode II, on a appliqué  $1000 \times G$  pendant 2 minutes et dans la méthode III,  $2000 \times G$  pendant 2 minutes. Après centrifugation, 90% du surnageant a été chaque fois pipeté et on a déterminé son contenu en spermatozoïdes. Après resuspension avec le diluant de congélation, on a observé l'intégrité fonctionnelle de la membrane au moyen du test HOS et on a jugé de la motilité. Dans les semences décongelées, on a examiné la motilité, la vitalité (SYBR-14/PI), l'intégrité fonctionnelle de la membrane (test HOS) et le statut de l'acrosome avec le test à la chlorotétracycline (CTA). Nos résultats montrent que la perte en spermatozoïdes (I: 1,9%; II: 8,7%; III: 3,7%) est significativement différente ( $p < 0,05$ ) selon la méthode de centrifugation. Pour ce qui est des paramètres de qualité de la semence décongelée, il n'a été possible de constater des valeurs significativement moins bonnes qu'avec la méthode III (52,1%) par rapport aux méthodes I (55,5%) et II (55,3%). Le CTA utilisé pour définir le statut de l'acrosome a montré que, pour les 3 méthodes, plus de 70% des spermatozoïdes étaient capités et que 25% étaient capités et acrosomés. Sur la base de nos observations, on peut conclure qu'aussi bien la perte de spermatozoïdes que l'intégrité fonctionnelle de la membrane (test HOS) sont influencés de façon significative par la méthode de centrifugation. Il convient donc de centrifuger la semence d'étalon avant cryoconservation à  $600 \times G$  pendant 10 minutes car c'est cette méthode qui engendre la plus petite perte en spermatozoïdes et conserve la meilleure qualité de semence après décongélation.

### Influsso del metodo della centrifugazione sulla qualità e conservazione criogena del seme degli stalloni

Scopo de presente studio è di chiarire l'influsso dei differenti metodi di centrifugazione sulla perdita di spermatozoi e sulla qualità dei semi congelati. Da 8 stalloni mezzosangue selezionati della stazione di inseminazione di Avenches sono stati presi su ognuno 3 eiaculati, e centrifugati con 3 differenti metodi per estrarre il plasma seminale. La centrifugazione con il metodo I (metodo di referenza) è avvenuta con una accelerazione centrifuga relativa di  $600 \times g$  durante 10 min, con il metodo II di  $1000 \times g$  durante 2 minuti e con il metodo III di  $2000 \times g$  durante 2 minuti. Dopo la centrifugazione il 90% del supernatante è stato pipettato ed è stato determinato il numero delle cellule seminali (perdita di spermatozoi). Dopo la risospensione con un diluente per la congelazione sono state definite l'integrità funzionale della membrana tramite test HOS e la valutazione della motilità. Nei semi disgelati sono stati esaminati la motilità, la vitalità (SYBR-14/PI), l'integrità funzionale della membrana (test HOS) e lo stato degli acrosomi con assay della clorotetraciclina (CTA). I nostri risultati rilevano che in media la perdita di spermatozoi (I, 1,9%; II, 8,7%; III, 3,7%) in tutti e tre i metodi di centrifugazione era significativamente differente ( $P < 0.05$ ). Per quel che concerne i parametri di qualità dello sperma tramite test HOS abbiamo riscontrato dei risultati peggiori nello sperma disgelato soltanto nel metodo III (52,1%) e non nei metodi I (55,5% e II (55,3%). La determinazione dello stato degli acrosomi effettuato con CTA ha mostrato che per tutti e tre i metodi con semi disgelati più del 70% degli spermatozoi avevano effettuato la capacitazione e all'incirca il 25% oltre alla capacitazione erano in reazione con gli acrosomi. Sulla base dei risultati ottenuti si può dedurre che sia la perdita di spermatozoi sia l'integrità funzionale della membrana (test HOS) in semi disgelati sono significativamente influenzati dai metodi di centrifugazione.

Perciò i semi di stalloni devono essere centrifugati prima della conservazione criogena con  $600 \times g$  durante 10 minuti. Grazie a questo metodo la perdita di spermatozoi è minima e la qualità del seme migliore dopo lo sgelamento.

## Literatur

- Aitken R.J., Clarkson J.S.: Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining of the efficiency of sperm preparation technique. *J. Androl.* 1988, 9: 367–76.
- Amann R.P., Pickett B.W.: Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 1987, 7: 145–173.
- Blach E.L., Amann R.P., Bowen R.A., Frantz D.: Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. *Theriogenology* 1989, 99: 141–150.
- Borg K., Colenbrander B., Fazeli A., Parlevliet J., Malmgreen L.: Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology* 1997, 48: 531–536.
- Carvajal G., Cuello C., Ruiz M., Lucas X., Vazquez J.M., Martinez E.A., Roca J.: Effect of the centrifugation regimes on the viability and penetrability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* 2001, 55: 302.
- Cochran J.D., Amann R.P., Froman D.P., Pickett B.W.: Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology* 1984, 22: 25–38.
- Corteel J.M.: Effects du plasma seminal sur la survie et la fertilité des spermatozoides conservées in vitro. *Reprod. Nutr.* 1980, 20: 1111–1123.
- Eriksson B.M., Petersson H., Rodriguez-Martinez H.: Field fertility with exported boar semen frozen in the new Flat-Pack container. *Theriogenology* 2002, 58: 1065–1079.
- Fraser L.R., Abeydeera L.R., Niwa K.: Ca<sup>2+</sup>-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 1995, 40: 223–241.
- Garner D.L., Johnson L.A., Yue S.T., Roth B.L., Haugland P.R.: Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.* 1994, 15: 620–629.
- Gillan L., Evans G., Maxwell E.M.: Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 1997, 9: 481–487.
- Hewitt D.A., England G.C.W.: An investigation of capacitation and the acrosome reaction in dog spermatozoa using a dual fluorescent staining technique. *Anim. Reprod. Sci.* 1998, 51: 321–332.
- Janett F., Thun R., Ryhiner A., Burger D., Hässig M., Hertzberg H.: Influence of Eqvalan® (Ivermectin) on semen quality and freezability of stallion semen. *Theriogenology* 2000, 55: 785–792.
- Janett F., Thun R., Bettschen S., Burger D., Hässig M.: Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. *Anim. Reprod. Sci.* 2003a, 77: 213–221.
- Janett F., Thun R., Niederer K., Burger D., Hässig M.: Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 2003b, 60: 453–461.
- Jasko D.J., Moran D.M., Farlin M.E., Squires E.L.: Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology* 1991, 35: 1059–1067.
- Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G., Zaneveld L.J.D.: Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 1984, 70: 219–228.
- Kaul G., Singh S., Gandhi K.K., Anand S.R.: Calcium requirement and time course of capacitation of goat spermatozoa assessed by chlortetracycline assay. *Andrologia* 1997, 29: 243–251.
- Lee M.A., Trucco G.S., Bechtol K.B., Wummer N., Kopt G.S., Blasco L., Storey B.T.: Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by a chlortetracycline fluorescence assay. *Fertil. Steril.* 1987, 48: 649–658.
- Maxwell W.M.C., Johnson L.A.: Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 1997, 46: 408–418.
- Neild D.M., Weild D.M., Chaves M.G., Flores M., Mirgaya M.H., Gonzalez E, Agüero A.: The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia* 2000, 32: 351–355.
- Sailing P.M., Storey B.T.: Mouse gamete interactions during fertilization in vitro. Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *J. Cell. Biol.* 1979, 83: 544–555.
- Parker N.A., Bailey T.L., Bowen J.M., Ley W.B., Purswell B.J., Dasconio J.J.: In vitro and xenogenous capacitation-like changes of fresh, cooled, and cryopreserved stallion sperm as assessed by a chlortetracycline stain. *J. Androl* 2000, 21: 45–52.
- Pickett B.W., Amann R.P.: Cryopreservation of semen. In: *Equine Reproduction*. Eds. A.O Mc Kinnon., J.L.Voss, Lea & Febiger, Philadelphia, 1993: 769–789.
- Rathi R., Colenbrander B., Bevers M.M., Gadella B.M.: Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.* 2001, 65: 462–470.
- Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., de Kruif A.: Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* 2002, 57: 1669–1681.
- Samper J.C., Morris C.A.: Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology* 1998, 49: 895–903.
- Samper J.C.: Stallion semen cryopreservation: Male affecting pregnancy rates. *Proc. Soc. Theriogenology* 1995, San Antonio, TX: 160–165.
- Samper J.C., Hearn P., Ganheim A., Curtis E.: Pregnancy rates and effect of extender on motility and acrosome status of frozen thawed stallion spermatozoa. *Equine Pract.* 1994, 41–43.



*Schembri M. A., Major D. A., Suttie J. J., Maxwell C., Evans G.:* Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Reprod. Fertil. Dev.* 2002, 14: 225–233.

*Shekarriiz M., De Wire D.M., Thomas Jr.A.J., Agarwal A.:* A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Europ. Urol.* 1995, 28: 31–35.

*Varner D.D., Ward C.R., Storey B.T., Kenny R.M.:* Induction and characterization of acrosome reaction in equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 1987, 48: 1383–1389.

*Vidament M., Yvon J. M., Couty I., Arnaud G., Nguekam-Feugang J., Noue P., Cottron S., Le Tellier A., Noel E., Palmer E., Magistrini M.:* Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. *Anim. Reprod. Sci.* 2001, 68: 201–218.

*Wang W.H., Abeydeera L. R., Fraser L. R., Niwa K.:* Functional analysis using chlortetracycline fluorescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.* 1995, 104: 305–313.

*Watson P.F.:* The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anima. Report. Sic.*, 2000, 60–61: 481–492.

*Westendorf P., Richter L., Treu H.:* Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Paillettenverfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 1975, 82: 261–267.

*WHO-Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion.* Springer-Verlag, Berlin, 1999.

---

### Korrespondenzadresse

Simone Weiss, Haras National, Clinique, CH-1580 Avenches  
E-Mail: [simone.weiss@mbox.haras.admin.ch](mailto:simone.weiss@mbox.haras.admin.ch)

*Manuskripteingang: 15. Dezember 2003*

*In vorliegender Form angenommen: 25. Februar 2004*