

Kapitel 6

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stellt den Einfluß verschiedener Konfektionsformen auf die Samenauftauqualität bei Anwendung zweier Einfrierverfahren vergleichend dar.

Darüberhinaus wurden die Auswirkungen von Samenentnahmetechnik und Zentrifugation auf natives, resuspendiertes und aufgetautes Sperma untersucht.

Als Beurteilungsparameter dienten die Spermienmotilität (phasenkontrastmikroskopische Schätzung und Computervideomikrographie), die Akrosomintegrität (Spermac^R-Färbung) und die Membranintegrität (CFDA-, PI-Färbung).

In Versuchsabschnitt 1 wurden 36 Ejakulate von sechs Hengsten im split-sample Verfahren in Makrotüb^R-Röhrchen, flachformatigen Behältnissen, 0,5 ml- und 0,25-ml-Pailletten konfektioniert. Die Makrotüb^R wurden im Standardverfahren in der Styroporbox, die 0,5-ml- und 0,25-ml-Pailletten im computergesteuerten Einfrierautomaten und die Flachtüb mit beiden Verfahren tiefgefroren.

In Versuchsabschnitt 2 wurden 72 Ejakulate von sechs Hengsten alternierend fraktioniert und nicht fraktioniert entnommen. Die spermienreichen Fraktionen (fraktionierte Samenentnahme) wurden geteilt, zur

Hälfte mit und zur anderen Hälfte ohne Zentrifugation weiterverarbeitet. Beide Teilgruppen wurden mit den zentrifugierten Gesamtejakulaten (nicht fraktionierte Samenentnahme) verglichen.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Nach dem Auftauen waren die Samenproben des im ungesteuerten Einfrierverfahren tiefgefrorenen Flachtüb den Teilejakulaten des Makrotüb^R hinsichtlich Motilität (Tab. 4.2, S. 69; Tab. 4.3, S. 70) und Morphologie (Tab. 4.6, S. 79) signifikant überlegen. Ursachen sind homogenere Einfrier- und Auftauverläufe im flachformatigen Behältnis.
2. Für das im Flachtüb konfektionierte Sperma war das computergesteuerte Einfrierverfahren gegenüber der Tiefgefrierung in der Styroporbox die signifikant bessere Methode (Tab. 4.2, S. 69; Tab. 4.3, S. 70; Tab. 4.6, S. 79). Als mögliche Gründe werden die langsame Abkühlrate bis zu einer Temperatur von 5 °C sowie geringere Schwankungen im Einfrierverlauf diskutiert.
3. Die Samenproben, die in der 0,5-ml-Paillette im Einfrierautomaten eingefroren wurden, waren eine Stunde nach dem Auftauen sowohl den Teilejakulaten der flachformatigen Behältnisse als auch denen der 0,25-ml-Pailletten signifikant überlegen (Tab. 4.2, S. 69; Tab. 4.3, S. 70; Tab. 4.6, S. 79). Vermutlich wurde durch die einheitliche Einfrierrate für alle drei Verpackungsformen bei der Minipaillette aufgrund ihres weiten Volumen-Oberflächen-Verhältnisses die optimale Einfriergeschwindigkeit überschritten. Außerdem kommt wegen des geringen Füllungsvolumens eine hohe Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen in Betracht.
4. Bei dem Vergleich aller Konfektionierungsformen ohne Berücksichtigung der Einfriermethode zeigte sich ein signifikanter Vorteil der 0,5-ml-Paillette gegenüber allen anderen Verpackungsformen (Tab. 4.2, S. 69; Tab. 4.3, S. 70; Tab. 4.6, S. 79).
5. Die Samenentnahmetechnik hatte keinen Einfluß auf die Morphologie und Motilität des Nativsamens. Die quantitativen Parameter

unterschieden sich hingegen: Die spermienreichen Fraktionen enthielten im Vergleich zu den Gesamtejakulaten im Mittel in 44,6 % des Volumens 73,2 % der Spermien.

6. Die zentrifugierten Gesamtejakulate zeigten nach dem Auftauen signifikant bessere Motilitätswerte als die nicht zentrifugierten spermienreichen Fraktionen (Tab. 4.13, S. 89; Tab. 4.14, S. 89). Hinsichtlich der Morphologie unterschieden sie sich nicht.
7. Die Gewinnung der spermienreichen Fraktion mit anschließender Zentrifugation führte sowohl gegenüber den nicht zentrifugierten spermienreichen Fraktionen als auch im Vergleich zu den zentrifugierten Gesamtejakulaten zu signifikanten Vorteilen in allen untersuchten Parametern (Tab. 4.13, S. 89; Tab. 4.14, S. 89; Tab. 4.20, S. 98). Somit ist eine weitere Reduzierung des Seminalplasmas durch Zentrifugation auch nach fraktionierter Samenentnahme sinnvoll.
8. Zwischen den mit Hilfe der Computervideomikrographie und den durch mikroskopische Schätzung ermittelten Motilitätswerten bestanden hochsignifikante Zusammenhänge (Tab. 4.1, S. 66; Tab. 4.12, S. 88).
9. Der Prozentsatz kopfkappenintakter (Spermac^R-Färbung), membranintakter (CFDA-Färbung) und als „lebend“ bezeichneter (PI-Färbung) Samenzellen korrelierte hochsignifikant (Tab. 4.4, S. 74; Tab. 4.15, S. 91). Es wurde ein großer Prozentsatz an Samenzellen ermittelt, die trotz intakter Akrosomen Membranschädigungen zeigten. Zur Aufdeckung von Unterschieden, die durch verschiedene Samenaufbereitungsmethoden entstanden waren, erwiesen sich die beiden Fluoreszenzfärbungen (CFDA- und PI-Färbung) als empfindlicher (Tab. 4.16, S. 92).
10. Zwischen dem Anteil gesamtmotiler Samenzellen und dem Prozentsatz intakter Spermien wurden ebenfalls hochsignifikante Korrelationen ermittelt (Tab. 4.7, S. 81; Tab. 4.19, S. 97). Dabei war der Zusammenhang zwischen Membranintegrität und Motilität enger als die Beziehung zwischen Kopfkappenintegrität und der Motilität.

Kapitel 7

Summary

Sabine Kneißl

Cryopreservation of stallion semen:

The influence of semen collection techniques, centrifugation, packaging forms, and methods of freezing on the motility and plasma membrane integrity of spermatozoa.

The present study shows the influence of various packaging forms on semen quality with the use of two methods of freezing. In addition, the effects of semen collection methods and centrifugation on native, resuspended, and thawed semen are examined.

Sperm motility (subjective estimations and computer videomicrography), acrosome integrity (Spermac^R staining), and plasma membrane integrity (carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide staining) served as criteria for evaluation.

In trial I 36 ejaculates from six stallions were packaged in macrotubes, flat straws, and 0.5 and 0.25 ml French straws. The macrotubes were frozen using the standard method in a styrofoam box, both types of French straws were frozen using a computer-controlled freezing machine, and the flat straws were frozen using both methods.

In trial II 72 ejaculates from six stallions were alternately collected either fractioned or nonfractioned. The sperm-rich fraction (fractioned semen collection) was split, and one half was centrifuged, and the other half was further processed without centrifugation. Both fractioned groups were compared with the centrifuged whole ejaculates (nonfractioned semen collection).

The following results were seen:

1. In split semen samples frozen with the standard method, the motility (table 4.2, p. 69; table 4.3, p. 70) and morphology (table 4.6, p. 79) of subsamples frozen in flat straws were significantly better than for the subsamples frozen in macrotubes. The reason for this is the more homogenous freezing and thawing curves seen with flat straws.
2. For semen packaged in flat straws the computer-controlled freezing method was significantly better than freezing in the styrofoam box (table 4.2, p. 69; table 4.3, p. 70; table 4.6, p. 79). The slow cooling rate down to 5 °C and reduced variability in the cooling curve are discussed as possible reasons.
3. One hour after thawing, the split samples frozen in the 0.5 ml French straws were significantly better than the split samples in flat straws and 0.25 ml French straws (table 4.2, p. 69; table 4.3, p. 70; table 4.6, p. 79). The common freezing rate used for all three packaging forms probably exceeded the optimal freezing rate for the 0.25 ml French straw, due to its large surface to volume ratio.
4. When packaging forms were compared independent of the freezing method used, a significant advantage was seen for the 0.5 ml French straws over the other packaging forms (table 4.2, p. 69; table 4.3, p. 70; table 4.6, p. 79).
5. The method used for collecting semen did not have an influence on the morphology or motility of the native semen. The quantitative parameters differed though: compared to the whole ejaculate, the

sperm-rich fraction contained 73,2 % of the total spermatozoa in only 44,6 % of the volume.

6. The centrifuged whole ejaculates showed significantly better motility values after thawing than the non-centrifuged sperm-rich fraction (table 4.13, p. 89; table 4.14, p. 89). No differences in morphology were seen.
7. The collection and centrifugation of the sperm-rich fraction resulted in significant advantages in all parameters examined, in comparison to both non-centrifuged sperm-rich fractions and centrifuged whole ejaculates (table 4.13, p. 89; table 4.14, p. 89; table 4.20, p. 98). A further reduction of the seminal plasma by centrifugation also makes sense, therefore, after fractioned collection.
8. Highly significant relationships were seen between the subjective motility estimations and motility values obtained using computer videomicrography (table 4.1, p. 66, table 4.12, p. 88).
9. The percentages of acrosome-intact (Spermac^R staining), plasma membrane-intact (CFDA staining), and "live" (PI staining) spermatozoa were highly significantly correlated (table 4.4, p. 74; table 4.15, p. 91). A high percentage of spermatozoa were seen, which had damaged plasma membranes, despite having intact acrosomes. Both fluorescent stains (CFDA and PI) were shown to be sensitive indicators of differences due to the various methods of handling semen (table 4.16, p. 92).
10. Highly significant correlations were also seen between the percentages of overall motility and intact spermatozoa. The relationship between plasma membran integrity and motility was hereby closer than the relationship between acrosome integrity and motility (table 4.7, p. 81; table 4.19, p. 97).