

6 Zusammenfassung

An 81 Ejakulaten von 15 Hengsten wurde der Einfluß eines modifizierten Tiefgefrierverdünners, einer verlängerten Äquilibrationszeit und unterschiedlicher computergesteuerter Tiefgefriereschwindigkeiten überprüft. Darüberhinaus befaßte sich die vorliegende Arbeit mit der Ermittlung des für Pferdespermien kritischen Temperaturbereiches während des Tiefkühlprozesses, in welchem die Samenzellqualität die deutlichste Beeinträchtigung erfährt. Dabei wurde gleichzeitig auf eine eventuelle Abhängigkeit dieses Bereiches von der jeweiligen Kühlrate geachtet.

Als Prüfparameter dienten Motilität (Schätzwert und Meßwert der Computervideomikrographie), Akrosomintegrität (Spermac[®]-Färbung) und Membranintegrität (Carboxyfluoreszein-Diazetat- und Propidiumiodid-Färbung).

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Bei der Beurteilung der Motilität korrelierte die Aussage des Schätzwertes hochsignifikant ($p < 0,0001$) mit dem Meßwert aus der Computervideomikrographie.
2. Zwischen allen drei eingesetzten Färbeverfahren bestanden Korrelationen.
(CFDA - PI: $r = 0,97$; $p < 0,0001$)
(CFDA - Spermac: $r = 0,85$; $p < 0,0023$)
(PI - Spermac: $r = 0,87$; $p < 0,0139$)
Dabei ließ sich mit den Verfahren der Fluoreszenzfärbungen eine doppelt so große Anzahl morphologischer Schädigungen nachweisen (PI = $60,6 \pm 6,8$; CFDA = $62,5 \pm 6,9$) als bei Verwendung der Spermac[®]-Färbung (Spermac = $33,5 \pm 4,5$), d.h. die Membranintegrität ist ein empfindlicherer Zeiger für Strukturveränderungen der Samenzellen als die Akrosomintegrität.
3. Die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbungen korrelierten hochsignifikant ($p < 0,0004$) sowohl mit den geschätzten als auch mit den

gemessenen Werten (Gesamtmotilität) der Motilitätsauswertung, während die Korrelation mit der Spermac[®]-Färbung "nur" signifikant war.

(Korrelation Spermac - Schätzwert: $p < 0,0667$)

(Korrelation Spermac - Computerwert: $p < 0,0979$)

4. Der modifizierte Tiefgefrierverdünner hat sich in dieser Form als ungeeignet für die Kryokonservierung erwiesen.
5. Die verlängerte Anpassungszeit übte auf die Motilität keinen statistisch signifikanten Einfluß aus, während die angepaßten Samenzellen morphologisch eindeutig (PI: $p < 0,004$; CFDA: $p < 0,01$) weniger Schäden aufwiesen als die unangepaßten.
6. Die schnelle Kühlrate ($25^{\circ}\text{C} / \text{min}$) führte gegenüber der langsamen Tiefgefriereschwindigkeit ($5^{\circ}\text{C} / \text{min}$) zu den besseren Auftauresultaten.
7. Der kritische Temperaturbereich ließ sich relativ genau abgrenzen und war beeinflussbar durch die Geschwindigkeit des Einfrierprozesses. Bei der langsamen Gefriereschwindigkeit fand die größte Schädigung der Samenzellen zu einem früheren Zeitpunkt statt (zwischen -10°C und -20°C) als während der Tiefgefrierung mit der schnellen Kühlrate (zwischen -20°C und -30°C).

7 Summary

Isabel Röbbelen

Comparative investigations on several methods for the cryopreservation of stallion semen.

The influence of various cryoextenders, equilibration times, and freezing rates on motility and membrane integrity of spermatozoa

The effects of a modified cryoextender, a lengthened equilibration period, and different computer-controlled deep-freezing rates on various parameters of frozen-thawed semen were tested on 81 ejaculates from 15 stallions. In addition, the critical temperature range in the deep-freezing process, in which the largest reduction in the quality of spermatozoa occurs, was studied. The possible dependence of this range on the respective cooling rate was hereby considered at the same time.

Motility (estimations and computer-videomicrographic measurements), acrosomal integrity (Spermac[®] staining), and plasma membrane integrity (Carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide staining) served as test parameters.

The following results were obtained:

1. A highly significant correlation ($p < 0,0001$) was seen between the results of subjective motility estimations and computer-videomicrographic measurements.
2. Correlations were seen between the results of all three stains tested.
(CFDA - PI: $r = 0,97$; $p < 0,0001$)
(CFDA - Spermac: $r = 0,85$; $p < 0,0023$)
(PI - Spermac: $r = 0,87$; $p < 0,0139$)

Twice as much morphological damage could be shown using fluorescence staining (PI = $60,6 \pm 6,8$; CFDA = $62,5 \pm 6,9$) as with Spermac[®] staining (Spermac = $33,5 \pm 4,5$), i.e. plasma membrane

integrity is a more sensitive indicator of structural changes in spermatozoa than acrosomal integrity.

3. A highly significant correlation ($p < 0,0004$) was seen between the results of fluorescence stainings and both the subjective estimates and computer measurements of motility (total motility), whereas the correlation between Spermac[®] staining and motility was “only” significant.

(Korrelation Spermac - Schätzwert: $p < 0,0667$)

(Korrelation Spermac - Computerwert: $p < 0,0979$)

4. The modified cryoextender proved to be unsuited for cryopreservation.
5. The lengthend equilibration time did not have a statistically significant effect on motility, but clearly (PI: $p < 0,004$; CFDA: $p < 0,01$) less morphological damage was seen in equilibrated spermatozoa than in nonequilibrated.
6. The rapid cooling rate ($25^{\circ}\text{C} / \text{min}$) led to better thawing results compared with the slow deep-freezing rate ($5^{\circ}\text{C} / \text{min}$).
7. The critical temperature range could be relatively closely defined and was influenced by the rate of the deep-freezing process. With the slow cooling rate the largest reduction in the quality of spermatozoa occurred prior (between -10°C and -20°C) to the deep-freezing with the rapid cooling rate (between -20°C and -30°C).