

# Kapitel 6

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand charakteristischer Daten zur osmotischen Resistenz von Hengstspermien korrelative Beziehungen zur Flüssig- und Kryokonservierungsfähigkeit unter Berücksichtigung inter- und intraindividuel-ler Unterschiede untersucht.

Dazu wurden routinemäßig gewonnene Ejakulate von 11 Warmbluthengsten in vier Fraktionen geteilt. Ein Teil des Ejakulates wurde einem hypoosmotischen Belastungstest (~300 bis ~50 mosmolar in 5 Stufen) unterzogen. Der zweite Teil wurde nach Verdünnung auf eine Samenzellkonzentration von 50 Mio. Samenzellen/ml tiefgefroren (BURNS 1992). Die restlichen Fraktionen wurden zum Anlegen einer Halteprobe (Verdünnungsverhältnis 1 : 3 im Magermilch-Verdünner) sowie zur Gewinnung von Seminalplasma genutzt. Dieses wurde direkt im Anschluß an die Gewinnung zur pH-Wert Bestimmung und nach Gefrierlagerung (-20°C) zur Osmolaritätsbestimmung verwendet.

Die hypoosmotisch induzierte Volumenreaktion wurde mikroskopisch bestimmt. Dazu wurde eine Formolzitrifixation in Anlehnung an den von JEYENDRAN et al. (1984) etablierten hypoosmotischen Schwellungstest (HOS) durchgeführt. Zur Bewertung der Morphologie wurde die Triple-stain Färbung nach TALBOT und CHACON (1981) modifiziert.

Die Evaluierung der kryokonservierten Samenproben erfolgte mittels Triple-stain Technik und Motilitätsbestimmung bei den Auftauproben (geschätzt und computervideomikrographisch). Ebenfalls mikroskopisch wurde die Motilität der flüssigkonservierten Halteproben nach 24-, 48- und 72-stündiger Lagerung bei +5°C. erfaßt.

Die folgenden Hauptergebnisse wurden erzielt:

1. Der Anteil morphologisch intakter Spermatozoen nahm mit zunehmender hypoosmotischer Belastung ab. Bei der Flüssig- sowie Tiefgefrierkonservierung hat sich der Anteil vorwärtsmotiler Spermatozoen bei allen Hengsten signifikant verringert. Der Anteil lebender Spermatozoen war bei den Auftauproben signifikant kleiner als bei den Nativejakulaten. Im Gegensatz dazu erhöht sich der Anteil akrosomenreagerter Spermatozoen (lebend und tot) signifikant während der Kryokonservierung.

Der Vergleich der osmotischen Resistenz mit der Flüssig- bzw. Tiefgefrierkonservierungsfähigkeit erbrachte eindeutig positive Korrelationen. Diese Korrelationen werden bei der Auswertung der morphologischen Veränderungen anhand der Triple-stain Färbung deutlicher (höheres Signifikanzniveau) als bei der Formolzitratfixation. Zwischen den Hengsten wurden signifikante Unterschiede festgestellt.

2. Nach einstündiger Lagerung bei Raumtemperatur ist der Anteil vorwärtsmotiler Spermatozoen bei nachverdünnten Auftauproben signifikant höher als bei nicht nachverdünnten Proben.

3. Bei der Messung der Osmolarität und des kolloidalen Drucks des Seminalplasmas (alle 15 Minuten bis zu zwei Stunden) mit sowie ohne Zusatz eines Proteasehemmers (PMSF) festgestellte Veränderungen waren sehr geringfügig, streuten sehr stark und ließen keine eindeutigen Tendenzen erkennen.

Die Ergebnisse bestätigen die bereits früher festgestellten Qualitätsminderungen durch Lagerung bzw. Tiefgefrierung von Hengstpermien, sowie die deutlichen interindividuellen Unterschiede in der Tiefgefrier- bzw. Flüssigkonservierungsfähigkeit. Die Konservierungseignung steht in hoch signifikanter Korrelation zur osmotischen Resistenz.

Eine entsprechende Untersuchung der Nativejakulate läßt somit eine Einteilung in für die Konservierung geeignete bzw. ungeeignete Hengste zu.

Kristina Kohne

Use of osmotic resistance determination for the assessment of liquid- and deep-freeze preservation capacity of stallion spermatozoa.

## **Kapitel 7**

### **Summary**

In this survey correlative relations between liquid- and deep-freeze preservation capacity and the osmotic resistance of stallion spermatozoa have been examined under consideration of inter- and intraindividual differences.

For this purpose usually collected ejaculates from 11 warm-blooded stallions have been divided into four fractions. A part of the ejaculate has undergone a hypoosmotic test (~ 300 to ~ 50 mosmol in 5 stages). The second part has been deep frozen after diluting to a spermatozoa concentration of 50 mill/ml (BURNS 1992). The remaining fractions have been used for liquid preservation (1 : 3 in skimmed milk extender) as well as for producing seminal-plasma for later pH-value and definition of osmolarity.

The hypoosmotic induced volume reaction has been defined by microscope. For this purpose a formolcitratefixation according to the hypoosmotic swelling test (HOS) established by JEYENDRAN et al. (1984) has been made. For the assessment of the morphology the triple-stain technique after TALBOT and CHACON (1981) has been modified.

The evaluation of the cryopreserved samples was made through triple-stain technique and motility (determined by computervideomicrography and estimated) of the thawed samples. Also the motility of the liquid preserved samples after 24,- 48- and 72 hours of storage at +5°C have been estimated by microscope.

The following main results have been found:

1. The amount of morphological intact spermatozoa decreased under increasing hypoosmotic stress. Through liquid- and deep-freeze preservation the amount of forward moving spermatozoa of all stallions reduced significantly. The amount of living spermatozoa was also significantly smaller in the thawing samples than in the native ejaculates. On the contrary to that the amount of acrosome reacted spermatozoa (living and dead) increased significantly through deep-freeze preservation.

Comparing the osmotic resistance with the liquid- or deep-freeze preservation capacity positive correlations could definitely be established. These correlations became clearer in the evaluation of morphological changes with the triple-stain technique than with the formolcitratefixation. Significant differences between the stallions could be established.

2. After storing for one hour at room temperature amount of forward moving spermatozoa is significantly higher with the additional diluted thawing samples than with the deep frozen samples which are not additionally diluted after thawing.

3. While measuring the osmolarity and the colloid-pressure of the seminal-plasma (every 15 minutes up to two hours) with and without protease-inhibitor (PMSF) the stated changes were very minor, varied very much and no clear tendency was seen.

The results certify the up-to-now stated quality reduction through storage or deep freezing of stallion spermatozoa as well as clearly individual differences in the deep freeze or liquid preservation capacity. A high correlation towards the osmotic resistance could be shown.

Therefore, a corresponding examination of native ejaculates permits a division in these stallion which are suitable for preservation and those which are not.