

6. Zusammenfassung

Anke Kühne (1995)

Einfluß des Seminalplasmas auf Motilität und Membranintegrität von kryokonserviertem Hengstsperma

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Zugabe von Seminalplasma unterschiedlicher Spenderhengste zu Ejakulaten einzelner Hengste vor der Kryokonservierung die Motilität und Membranintegrität der Spermien nach dem Auftauen beeinflußt. Die Motilität der Spermien wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop geschätzt, zur Untersuchung der Membranintegrität wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Carboxylfluoresceindiacetat (CFDA) und Propidiumiodid (PI) verwendet. Vor Durchführung der eigentlichen Versuche wurden diese Färbungen zunächst für equines Sperma validiert.

Bei Verwendung beider Färbungen nahm der Anteil membranintakter Spermien signifikant ab, wenn die Samenzellen kurzzeitig auf 52°C erhitzt oder ohne Zusatz von Gefrierschutzsubstanzen bei -18°C gelagert wurden. Die CFDA- und die PI-Färbung zeigten Membranalterationen der Spermien jedoch nicht im gleichen Ausmaß an. Mit der PI-Färbung wurde stets ein höherer Anteil membranintakter Samenzellen ermittelt als mit der CFDA-Färbung. Nach Lagerung bei 5°C für 24 und 48 Stunden nahm die Anzahl der als membranintakt klassifizierten Samenzellen bei Auswertung mit der CFDA-Färbung signifikant ab, bei Verwendung der PI-Färbung blieb die Anzahl dieser Zellen dagegen gleich. Die Membranintegrität von Hengstsamenzellen wird demnach von CFDA empfindlicher angezeigt als von Propidiumiodid und diese Färbung ist daher zur Untersuchung der Membranintegrität von Hengstspermien gut geeignet.

Zur Bestimmung des Einflusses von fremden Seminalplasma auf Hengst-samenzellen während des Einfrierens und Auftauens wurden zunächst zwei Seminalplasmapools (Pool 1: n=5 Hengste, Pool 2: n=4 Hengste) gebildet (Hauptversuch A). Diese Pools wurden in unterschiedlichen Mengenanteilen (30 und 50% des Volumens) Ejakulaten von Hengsten, deren Seminalplasma in dem Pool nicht enthalten waren, zugesetzt. Die Einwirkzeit des Seminalplasmas vor der weiteren Aufarbeitung der Ejakulate betrug 10 und 30 Minuten. Ein Einfluß des zugesetzten Seminalplasmas auf die Membranintegrität und der Motilität der Samenzellen bestand nicht, da sich kryokonservierte Ejakulate, die mit und ohne Zusatz von fremden Seminalplasma eingefroren worden waren, hinsichtlich des Anteils vorwärtsbeweglicher und membranintakter Spermien nach dem Auftauen nicht signifikant unterschieden und weder durch Verwendung unterschiedlicher Seminalplasmamengen noch durch Verlängerung der Einwirkzeit beeinflusst wurden.

Im folgenden Versuch (Hauptversuch B) wurden einzelne fremde Seminalplasma Ejakulaten verschiedener Hengste zugesetzt. Dazu wurden die Hengste anhand des Anteils an vorwärtsbeweglichen Samenzellen nach Kryokonservierung ihrer Ejakulate in solche mit guter Tiefgefriereignung (Gruppe 1; Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach Samenkryokonservierung $\geq 30\%$; n=5 Hengste) und mit schlechter Tiefgefriereignung (Gruppe 2; Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach Samenkryokonservierung $\leq 20\%$; n=5 Hengste) eingeteilt.

Der Zusatz von Seminalplasma individueller Hengsten mit guter Tiefgefriereignung hatte einen positiven Effekt auf die Membranintegrität und Vorwärtsmotilität der Samenzellen von Hengsten mit schlechter Eignung zur Samenkryokonservierung. Das Seminalplasma von Hengsten mit schlechter Einfriereignung (Gruppe 2) hatte dagegen einen negativen Effekt auf die

Spermien von Hengsten, deren Ejakulate sich gut für die Tiefgefrierkonservierung eignen (Gruppe 1). Nach Hinzufügen von 30% Seminalplasma von Hengsten der Gruppe 1 zu Ejakulaten von Hengsten der Gruppe 2 nahm die Anzahl vorwärtsbewegliche Samenzellen von $24,0 \pm 1,6\%$ auf $34,5 \pm 1,9\%$ zu ($P < 0,05$). Bei der Färbung mit CFDA nahm der Prozentsatz membranintakter Spermien von $27,0 \pm 2,1\%$ auf $34,3 \pm 2,3\%$ ($P < 0,05$) und die Anzahl geschädigter Spermien mit intaktem Akrosom von $57,4\% \pm 4,4\%$ auf $66,3 \pm 4,9\%$ ($P < 0,05$) zu. Mit der PI-Färbung konnten keine signifikanten Veränderungen der Membranintegrität durch einen Zusatz von Seminalplasma ermittelt werden. Nach Zugabe von Seminalplasma von Hengsten der Gruppe 2 (schlechte Tiefgefrierleistung) zu den Ejakulaten von Hengsten der Gruppe 1 (gute Tiefgefrierleistung) nahm die Anzahl der vorwärtsbeweglichen Spermien von $36,0 \pm 1,6\%$ auf $30,0 \pm 2,7\%$ ($P < 0,05$) ab, der Anteil der membranintakten Zellen veränderte sich unabhängig von der verwendeten Färbetechnik nicht.

Es konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe von Seminalplasma von Hengsten, deren Ejakulate sich gut für eine Kryokonservierung eignen, die Tiefgefrierresistenz von Samenzellen solcher Hengste, deren Ejakulate eine schlechte Tiefgefrierleistung aufweisen, verbessert werden kann. Die Resistenz der Samenzellen gegenüber Tiefgefrier- und Auftauprozessen wird also durch das Seminalplasma beeinflusst. Die beobachteten Veränderungen der Laborparameter Motilität und Membranintegrität lassen die Schlußfolgerung zu, daß auch die Befruchtungsfähigkeit dieser Ejakulate nach dem Auftauen verbessert wird. Nach Zusatz von Fremdseminalplasma können möglicherweise auch Ejakulate von Hengsten, die bislang nicht für die Samenkryokonservierung in Frage kamen, so tiefgefroren werden, daß eine ausreichende Befruchtungsfähigkeit erhalten bleibt.

7. Summary

Anke Kühne (1995)

Effects of seminal plasma on motility and membrane integrity of equine spermatozoa after cryopreservation

In this study, effects of adding seminal plasma from different stallions to horse semen before cryopreservation on post-thaw motility and membrane integrity of spermatozoa were investigated. The percentage of progressively motile spermatozoa was estimated by use of phase contrast microscopy. For the assessment of sperm membrane integrity, staining with carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and propidium iodide (PI), after validation of these techniques for equine semen, was used.

Heating semen to 52 °C and freezing at -18 °C without cryoprotectants decreased the number of spermatozoa classified as membrane-intact with both staining techniques. However, propidium iodide and carboxyfluorescein diacetate staining did not detect membrane alterations to the same extent. With the PI stain more spermatozoa were classified as intact than when CFDA staining was used. Storage at 5 °C for 24 and 48 hours clearly decreased the percentage of spermatozoa classified as membrane-intact after carboxyfluorescein diacetate but not propidium iodide staining. Carboxyfluorescein diacetate therefore is particularly sensitive to assess the integrity of horse sperm membranes, whereas propidium iodide underestimates the percentage of membrane-damaged cells.

To determine effects of foreign seminal plasma on stallion spermatozoa during freezing and thawing, in a first experiment (experiment A) two seminal plasma pools were collected (pool 1: n=5 stallions, pool 2: n=4 stal-

lions). Aliquots of these pool were added in different amounts (30 and 50% of semen volume) to ejaculates from stallions whose seminal plasma was not contained in the respective pool. After the addition of pooled seminal plasma, semen was incubated at room temperature for 10 and 30 minutes before further processing. No significant differences in membrane integrity and motility of spermatozoa were found between ejaculates frozen with and without pooled seminal plasma from other stallions. The addition of pooled seminal plasma, therefore, did not affect semen quality after cryopreservation irrespective of the amount added or the duration of incubation. It is suggested that seminal plasma contains different factors that positively and negatively affect semen quality after cryopreservation. When a seminal plasma pool is used, the combination of these factors results in a neutralization of their effects.

In a second study (experiment B) seminal plasma from individual stallions was added to ejaculates before cryopreservation. For this experiment, animals were divided into two groups according to sperm motility after cryopreservation of three ejaculates. Stallions with ≥ 30 % progressively motile spermatozoa after freezing and thawing were considered to be of high post-thaw sperm motility (group 1; n=5) and those with ≤ 20 % progressively motile spermatozoa were assigned to the low post-thaw sperm motility group (group 2; n=5). Stallions with a progressive sperm motility between 20 % and 30 % (n=4) were not included into the experiment.

The addition of seminal plasma from individual stallions with high post-thaw sperm motility positively affected membrane integrity and progressive motility of spermatozoa from stallions with low post-thaw sperm motility. Seminal plasma from stallions with low post-thaw sperm motility (group 2) had a

negative effect on spermatozoa from stallions with high post-thaw sperm motility (group 1).

Adding 30 % of seminal plasma from stallions with high post-thaw sperm motility (group 1) to ejaculates from stallions with low post-thaw sperm motility (group 2) increased progressive motility (from 24.0 ± 1.6 to 34.5 ± 1.9 %, $P < 0.05$) and sperm membrane integrity determined by carboxyfluorescein diacetate staining (from 27.0 ± 2.1 to 34.3 ± 2.3 % membrane-intact spermatozoa, $P < 0.05$). The percentage of membrane damaged cells with an intact acrosome increased from $57.4\% \pm 4.4$ % to 66.3 ± 4.9 % ($P < 0.05$). No effect of seminal plasma from other stallions was detected with the propidium iodide stain. The addition of seminal plasma from stallions with low post-thaw sperm motility to ejaculates from stallions with high post-thaw sperm motility decreased progressive motility (from 36.0 ± 1.6 to 30.0 ± 2.7 %; $P < 0.05$) but did not induce changes in membrane integrity.

It can be concluded, that seminal plasma from stallions with good semen quality after cryopreservation increased the resistance of spermatozoa from stallions with low post thaw semen quality against freezing and thawing. The changes observed in the laboratory parameters motility and membrane integrity suggest that the fertilizing capacity of the ejaculates was influenced to a comparable extent. The individual composition of seminal plasma therefore affects the resistance of equine spermatozoa during freezing and thawing and therefore is one factor that determines the suitability of individual stallions for semen cryopreservation. In individual sires, which at present cannot be used for semen cryopreservation, addition of seminal plasma from stallions with good semen quality after thawing can be expected to improve post-thaw fertility of semen.