

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob der Zucker Trehalose in Kombination mit oder anstelle von anderen Zuckern (Glucose, Lactose, Raffinose) als kryoprotektive Substanz im Verdünnermedium bei der Tiefgefrierung von Hengstesperma eingesetzt werden kann.

Ausgangsbasis war ein hauptsächlich in Frankreich eingesetzter Tiefgefrierverdünner (PALMER 1984), der ausgehend von einem Grundverdünner (Stammlösung D1) mit Magermilch (D2) und Eigelb (D3) versetzt wurde. Die Glycerinkonzentration betrug 2,5%. Es sind Verdünnervarianten mit unterschiedlicher Trehalosekonzentration hergestellt worden, indem die Zucker des Ausgangsverdünners schrittweise durch Trehalose ersetzt wurden, ohne die Osmolarität zu verändern:

Verd A = Originalverdünner

Verd B = Trehalose (95,43g/l) anstelle Glucose (50,00g/l)

Verd C = Trehalose (3,15g/l) anstelle Lactose (3,00g/l)

Verd D = Trehalose (1,91g/l) anstelle Raffinose (3,00g/l)

Verd E = Trehalose (100,49g/l) anstelle Glucose + Lactose + Raffinose (56g/l)

Von 7 Holsteiner Hengsten wurden jeweils 6 Ejakulate gewonnen, so daß insgesamt 42 Ejakulate zur Auswertung kamen. Jedes Ejakulat wurde in 5 Fraktionen geteilt und mit den Verdünnervarianten A - E tiefgefroren. An den aufgetauten Samenproben wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt. Die Motilitätsauswertung erfolgte computervideomikrographisch. Die Membranintegrität wurde mittels der Carboxyfluoresceindiacetat-Färbung (CFDA) und der Propidiumiodid-Färbung (PI) überprüft. Zur Bestimmung des Zellvolumens wurde ein formunabhängiges Meßsystem basierend auf einer elektronischen Volumenanalyse eingesetzt (Cell-Analyzer-CASY1-System)

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtmotilität sowie Vorwärtsmotilität zwischen den Verdünnervarianten mit unterschiedlichen Trehalosekonzentrationen gefunden werden. Die Mittelwerte (GM/VM) lagen zwischen $66,5 \pm 8,3 \%$ / $42,4 \pm 7,3 \%$ und $76,4 \pm 6,2 \%$ / $49,1 \pm 5,2 \%$ ($p > 0,05$).

2. In dem Parameter VCL (Geschwindigkeit über die tatsächlich zurückgelegte Bahn) wurden bei den Verdünnervarianten C und D zu beiden Meßzeitpunkten t_0 und t_1 (t_0 = sofort nach dem Auftauen; t_1 = nach 1 Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur) signifikant höhere Werte gemessen, als bei den Verdünnern A (t_0 und $t_1, p < 0,05$), B ($t_0, p < 0,001$, $t_1, p < 0,05$) und E ($t_0, p < 0,01$, $t_1, p < 0,05$).
3. In Bezug auf die Anteile lebender Spermien (Propidiumiodid-Färbung) und membranintakter Spermien (Carboxyfluoreszein-Diacetat-Färbung) waren die Verdüner B und E den Verdünnervarianten A, C und D überlegen ($p < 0,001$). Verdüner B und E erzielten hingegen in dem Parameter Akrosomintegrität niedrigere Werte ($p < 0,001$) als die übrigen Verdüner.
4. Im Spermiedurchmesser ergaben sich zwischen den geprüften Verdünnervarianten keine Unterschiede, weder unter isotonen und hypotonen Bedingungen noch zu beiden Meßzeitpunkten (30 Sekunden und 5 Minuten Inkubation).
5. Der Quotient aus mittlerem hypotonen zu mittlerem isotonen Zellvolumen ergab zum Meßzeitpunkt 30 Sekunden statistisch signifikante Unterschiede zwischen Verdünnervariante A zu den Varianten C ($p < 0,001$), D ($p < 0,01$) und E ($p < 0,05$). Ferner zwischen den Varianten B und C ($p < 0,05$) und E und C ($p < 0,05$).
6. Korrelative Beziehungen bestanden zwischen den Ergebnissen der CFDA- und der PI-Färbung ($r = 0,85$; $p < 0,01$), weiterhin zwischen den videomikrographisch ermittelten Motilitätswerten und dem Anteil lebender Spermien ($r = 0,85$; $p < 0,01$) sowie dem Anteil membranintakter Spermien ($r = 0,84$; $p < 0,01$). Keine Korrelationen bestanden zwischen den Motilitätswerten und den Ergebnissen der spermiovolumetrischen Messung.
7. Der Effekt von Trehalose als kryoprotektive Substanz scheint in einer Stabilisierung der Plasmamembran zu liegen.

7 Summary

Holger Steinmann: Cryopreservation of stallion semen with trehalose as a cryoprotective agent.

The objective of the present thesis was to investigate whether the sugar trehalose can be used, in combination with or instead of other sugars (glucose, lactose, raffinose) as a cryoprotective substance in the diluent medium when deep-freezing stallion sperm.

Starting from deep-freeze diluent used mainly in France (PALMER 1984), diluents with different concentrations of trehalose were prepared by progressively replacing the sugar of the original diluent with trehalose without changing the osmolarity:

Diluent A = Original diluent

Diluent B = Trehalose (95,43g/l) instead of glucose (50,00 g/l)

Diluent C = Trehalose (3,15g/l) instead of lactose (3,00g/l)

Diluent D = Trehalose (1,91g/l) instead of raffinose (3,00g/l)

Diluent E = Trehalose (100,49g/l) instead of glucose + lactose + raffinose (56,00g/l)

6 Ejaculates from 7 Holstein stallions were collected. Totally 42 ejaculates were included in the study. Each ejaculate has been divided into 5 fractions and cryopreserved with the different diluents A - E. Comparative studies were carried out with the thawed semen. The motility was determined by computervideomicrography. Membrane integrity was checked by carboxyfluoresceindiacetate-staining (CFDA) and propidiumiodide-staining (PI). A shape-independent measuring system based on electronic volume analysis was used (Cell Analyser CASY 1 System) to determine cell volume.

1. No significant differences were detectable in total motility or in forward motility between the diluents with different trehalose concentrations. The average values (total motility/forward motility) were between $66,5 \pm 8,3\%$ / $42,4 \pm 7,3\%$ and $76,4 \pm 6,2\%$ / $49,1 \pm 5,2\%$ ($p > 0,05$).

2. Significantly higher values for the parameter VCL (spermvelocity over the path actually traversed) were measured in the diluents C and D at the two measurement times t_0 and t_1 (t_0 = immediately after thawing; t_1 = after incubation at room temperature for 1 hour) than in the diluents A (t_0 and t_1 , $p < 0,05$), B (t_0 $p < 0,001$, t_1 $p < 0,05$) and E (t_0 $p < 0,01$, t_1 $p < 0,05$).
3. With regard to the proportion of live sperms according the propidium iodide staining and the proportion of sperm with intact membranes according the carboxyfluorescein diacetate staining, diluents B and E were superior to diluents A, C and D ($p < 0,001$). On the other hand diluents B and E achieved lower values for the acrosome integrity parameter ($p < 0,001$) than the other diluents.
4. There were no differences in sperm diameter between the different diluents tested, either under isotonic or hypotonic conditions or at the two measurement times (30 seconds and 5 minutes incubation).
5. The sperm volume quotient (mean hypotonic cell volume divided by the mean isotonic cell volume) yielded statistically significant differences between diluent variant A relative to variants C ($p < 0,001$), D ($p < 0,01$) and E ($p < 0,05$) at the measurement time of 30 seconds. There were also differences between diluents B and C ($p < 0,05$) and E and C ($p < 0,05$).
6. There were correlative relationships between the results of the CFDA (carboxyfluorescein diacetate) and PI (propidium iodide) staining ($r = 0,85$; $p < 0,01$). Such relationship also existed between the motility values determined by video-micrography and the proportion of living sperms ($r = 0,85$; $p < 0,01$) and also the proportion of intact membrane sperms ($r = 0,84$; $p < 0,01$). There were no correlations between the motility and the results of sperm volume measurement.
7. The action of trehalose as a cryo-protective substance appears to lie in stabilisation of the plasma membrane.