

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß der Einfriergeschwindigkeit auf Pferdespermien unter Einsatz zweier verschiedener Tiefgefrierverfahren überprüft werden.

In den Untersuchungen wurden 92 Ejakulate von 21 Pferden verwendet, die im split-sample-Verfahren tiefgefroren wurden. Die Datenerfassung erfolgte innerhalb von zwei Versuchsabschnitten. Als Beurteilungskriterien wurde die Motilitätsanalyse mittels Computervideomikrographie, die Morphologie mittels CFDA-PI-Färbung und der hypoosmotische Schwellungstest (HOS) eingesetzt.

Im ersten Versuchsabschnitt wurde die Gefriertechnologie der direktionalen Gefrierung erstmalig auf ihre Eignung für die Kryokonservierung von Pferdesperma im Vergleich mit einem Tiefgefrierautomaten untersucht. Das Wesen der direktionalen Gefrierung beruht auf einer sukzessiven, partiell fortschreitenden Gefrierung von Spermien mit einer Einfriergeschwindigkeit, die weit oberhalb der bei schon etablierten Verfahren liegt. Die Spermien wurden bei der direktionalen Gefrierung mit drei verschiedenen Temperaturgradienten ($T_b \rightarrow T_c$) mit je fünf Geschwindigkeiten tiefgefroren (0,9 mm/s; 1,2 mm/s; 1,5 mm/s; 1,8 mm/s und 2,3 mm/s, welche Einfriergeschwindigkeiten von 1350°C/min bis 9246°C/min entsprechen. Als Vergleichsverfahren erfolgte die Tiefgefrierung in einem Tiefgefrierautomaten mit zwei Kühlraten (25°C/min und 60°C/min).

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Bei den Temperaturgradienten $T_h 5^\circ\text{C} \rightarrow T_c -50^\circ\text{C}$ und $T_h 5^\circ\text{C} \rightarrow T_c -20^\circ\text{C}$ ließ sich eine tendenzielle Zunahme der Auftaumotilität der Spermien in Richtung der langsamen Einfriergeschwindigkeit verzeichnen. Die Auftaumotilitäten der Spermien der fünf Einfriergeschwindigkeiten des Gradienten $T_h 17^\circ\text{C} \rightarrow T_c -50^\circ\text{C}$ wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.
2. Der Vergleich der drei Temperaturgradienten der direktionalen Gefrierung erbrachte hinsichtlich der Auftaumotilität der Spermien geringfügige Unterschiede zwischen den Gradienten $T_h 17^\circ\text{C} \rightarrow T_c -50^\circ\text{C}$ und $T_h 5^\circ\text{C} \rightarrow T_c -50^\circ\text{C}$. Signifikant schlechtere Auftauergebnisse wurden mit dem Gradienten $T_h 5^\circ\text{C} \rightarrow T_c -20^\circ\text{C}$ erreicht.
3. Bei der morphologischen Überprüfung der Spermien die mit den fünf Einfriergeschwindigkeiten des Gradienten $T_h 5^\circ\text{C} \rightarrow T_c -50^\circ\text{C}$ tiefgefroren wurden, ließen sich keine statistisch nachweisbaren Differenzen ermitteln.

4. Beim Vergleich der Kühlraten (25°C/min und 60°C/min) des Tiefgefrierautomaten, traten nur geringfügige Unterschiede hinsichtlich der Motilität der Spermien auf. Bezüglich der Morphologie wies die Kühlrate 60°C/min signifikant mehr Spermien mit vollständig geschädigter Membran auf.
5. Das Tiefgefrieren von Spermien im Tiefgefrierautomaten war den drei Temperaturgradienten der direkionalen Gefrierung hinsichtlich der Motilität und der Morphologie signifikant überlegen. Die direktionale Gefrierung hat sich in dieser Form als ungeeignet für die Kryokonservierung von Pferdespermien erwiesen.
6. Bei Prüfung der 13 Pferde auf ihre intraindividuellen Unterschiede traten signifikante Differenzen zwischen den drei Ejakulaten auf, zudem konnten signifikante interindividuelle Unterschiede nachgewiesen werden.

Im Versuchsabschnitt II wurde der kritische Temperaturbereich bei der Tiefgefrierung von Pferdesperma anhand von zwei Kühlraten ermittelt, in dem sich die größten Schädigungen bemerkbar machten. Es wurden zwei Kühlraten (20°C/min und 60°C/min) miteinander verglichen. Zusätzlich wurden zwei unterschiedliche Lagerungstemperaturen von Spermien, die mit einem glycerinhaltigen Verdünnser aufbereitet waren, miteinander verglichen (20°C und 5°C für jeweils 2 Stunden).

Folgenden Ergebnisse wurden erzielt:

1. Zwischen der Lagerung von resuspendierten Spermien bei 20°C und bei 5°C für zwei Stunden traten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Motilität, der Morphologie und bei hypoosmotischer Belastung auf.
2. Beim Vergleich der langsameren (20°C/min) mit der schnelleren (60°C/min) Kühlrate konnten weder in Bezug auf die Motilität noch auf die Morphologie der Spermien signifikante Differenzen nachgewiesen werden. Eine tendenziell höhere Auftaumotilität ließ sich mit dem schnelleren Programm erzielen. Dieser Trend wurde durch eine größere Anzahl intakter Zellen bestätigt.
3. Der kritische Temperaturbereich von -20°C bis -30°C konnte in beiden Kühlraten hinsichtlich der Motilität und der morphologischen Parameter der Spermien ermittelt werden. In der langsameren Kühlrate kam es zusätzlich im Temperaturbereich von -10°C bis -20°C noch zu einer weiteren deutlichen Abnahme der Spermienmotilität. Die Ergebnisse der Motilitätsanalyse und der morphologischen Auswertung konnten nicht durch die zellvolumetrische Untersuchung bestätigt werden.

7. SUMMARY

Nataly Klus

Development of a directional freezing-method for horse spermatozoa in comparison to a computer-controlled-freezing

It was the aim of this study to investigate the influence of freezing rate on horse spermatozoa using two different methods of freezing.

A total of 92 ejaculates from 21 warmblood stallions were included in the experiments. The study comprised two trials. The evaluation parameters were motility (determined by computervideomicrography by MIKA Motion Analyser), morphology (CFDA-PI fluorescence staining) and the hypoosmotic swelling test (HOS) (Cell Analyser System CASY® 1).

During the first trial the directional freezing methods were studied with regard to its suitability for the cryopreservation of horse semen in comparison to computer-controlled-freezing. Directional freezing is based on a gradual partially increasing freezing of spermatozoa with a freezing velocity much higher than established procedures. Ejaculates were frozen using three different temperature-gradients (Th 5°C→Tc -50°C; Th 17°C→Tc -50°C; Th 5°C→Tc -20°C) and five freezing velocities (0,9 mm/s; 1,2 mm/s; 1,5 mm/s; 1,8 mm/s and 2,3 mm/s respectively 1350°C/min to 9246°C/min. For comparison computer-controlled-freezing was used with two cooling rates (25°C/min and 60°C/min).

The following results were achieved:

1. There was an increased tendency towards slower velocities in post-thaw motility of spermatozoa using gradient Th 5°C→Tc -50°C and Th 5°C→Tc -50°C. No differences were detected in the post-thaw motility of the spermatozoa of the gradient Th 17°C→Tc -50°C and its five freezing velocities
2. Comparing three temperature-gradients with regard to the sperm motility of the spermatozoa there were only small differences between gradient Th 5°C→Tc -50°C and gradient Th 17°C→Tc -50°C. As compared with the gradient Th 5°C→Tc -20°C both gradients showed significant better results.
3. No difference in morphology of the spermatozoa were seen between the semen samples frozen with the five freezing rates of the gradient Th 5°C→Tc -50°C.

4. The post-thaw motility was similar for sperm frozen using two cooling rates (25°C/min and 60°C/min) in the computer-controlled-freezing. With regard to the morphology there were more spermatozoa with damaged membrane in the faster cooling rate.
5. Motility and morphology values were significantly higher when frozen with the computer-controlled-system than in the three gradients and five velocities of the directional freezing. Directional freezing as used here was not suited for the cryopreservation of horse spermatozoa.
6. There were significant differences in the three ejaculates. Significant interindividual differences in regard to the post-thaw motility were also observed.

In the second trial the critical temperature range in the deep-freezing process in which largest reduction in quality of spermatozoa occurs, was studied based on two deep freezing rates (20°C/min and 60°C/min). Additionally, two different storage temperatures (20°C and 5°C for 2h) of prepared spermatozoa in a glycerol-extender were compared.

The following results were obtained:

1. There was no significant difference with regard to sperm motility, morphology and hypoosmotic swelling test between storage for two hours at 5°C or 20°C. A slight improvement of the storage temperature at 20°C was observed.
2. The rapid deep freezing rate (60°C/min) did not lead to better thawing results compared with the slower deep freezing rate (20°C/min) relative to post-thaw motility, morphology and cell volumetry of the spermatozoa. A slight improvement of the deep freezing rate 60°C/min with regard to the motility and the number of intact cells was observed.
3. The critical temperature range relative to sperm motility and morphology could be defined between -20°C and -30°C in the two deep freezing rates. There was a second temperature range in the slower deep freezing rate between -10°C and -20°C with a remarkable decrease in sperm motility. The results of the motility and the morphology values were not confirmed with the results of cell volumetry analysis.