

Zusammenfassung

Christoph Börgel

Untersuchungen zur Kryokonservierung von Pferdesperma unter Anwendung verschiedener Verdüner, Spermienkonzentrationen und Einfrierprogramme.

In einem Versuch mit geteilten Erstejakulaten von 72 dreijährigen Warmbluthengsten, die in den Monaten Januar und Februar 1992 an der Veterinärmedizinischen Fakultät Utrecht auf Zuchttauglichkeit untersucht worden sind, wurde der Einfluß zweier unterschiedlicher Verdüner (Verdüner 1: EDTA-Laktose-Eidotter (20%)-Glycerin (5%), Verdüner 2: Glucose-Magermilch-Eidotter (2%)-Glycerin (2,5%)), zweier Spermienkonzentrationen (Konzentration 1: 200 Mio. Spermien/ml, Konzentration 2: 1 Mrd. Spermien/ml) sowie zweier Einfrierprogramme (Programm 1: 0,3°C/min von +20°C bis -15°C und 25°C/min bis -150°C, Programm 2: 10°C/min von 20°C bis -10°C und 25°C/min bis -150°C.) auf Spermienmotilität, Akrosominintegrität sowie Membranintegrität des aufgetauten Samens untersucht.

Die Ejakulate wurden geteilt und nach 1:1 (v:v) Vorverdünnung mit dem entsprechenden glyzerinfreien Verdüner bei Raumtemperatur 15 min bei 1000 g zentrifugiert. Nach Resuspension auf die Konzentration von 200 Mio. sowie 1 Mrd. Spermien/ml wurde der Samen in 0,5 ml Pailletten abgefüllt und in computergesteuerten Anlagen eingefroren. Die in Flüssigstickstoff gelagerten Proben wurden bei +37°C für 30 Sekunden aufgetaut, 1:1 (v:v) mit dem korrespondierenden, glyzerinfreien Verdüner nachverdünnt und nach 5-minütiger Inkubation bei +37°C in einem Hamilton-Thorn-Motilityanalyser untersucht. Nach dichromatischer Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Carboxyfluoreszeindiacetat/Propidiumjodid, welche die Beurteilung der Membranintegrität ermöglicht, sowie der Spermac^R-Färbung, die eine Beurteilung der Akrosominintegrität erlaubt, wurden jeweils 200 Spermien ausgewertet.

Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Der EDTA-Laktose-Eidotter(20%)-Glycerin(5%)-Verdüner (Verdüner 1), wies für den aufgetauten Samen hinsichtlich der Motilität, der Plasmamembran- und Akrosominintegrität (CFDA/PI-Anfärbung) sowie der Akrosominintegrität (Spermac^R-Färbung) signifikant bessere Ergebnisse auf als der Glucose-Magermilch-Eidotter(2%)-Glycerin(2,5%)-Verdüner (Verdüner 2).

2. Die Konfektionierung des Samens mit einer Spermienkonzentration von 1 Mrd. Spermien/ml erwies sich, bezogen auf die Gesamtmotilität und die Akrosomintegrität (CFDA/PI-Anfärbung, Spermac^R-Färbung), der Spermienkonzentration von 200 Mio. Spermien/ml als signifikant überlegen. Hinsichtlich der Plasmamembranintegrität (CFDA/PI-Anfärbung) wies jedoch die niedrigere Spermienkonzentration signifikant bessere Ergebnisse auf.

Bezogen auf Spermien mit intakter Plasmamembran und intaktem Akrosom konnten keine Differenzen zwischen den beiden Spermienkonzentrationen dargestellt werden.

3. Der Vergleich der zwei Einfrierprogramme zeigte, daß für den aufgetauten Samen mit dem Einfrierprogramm 1 bezüglich der Motilität, der Plasmamembran- und Akrosomintegrität (CFDA/PI-Anfärbung) sowie der Akrosomintegrität (Spermac^R-Färbung) signifikant bessere Ergebnisse erzielt wurden. Dieser positive Effekt wird auf die langsamere Abkühlung bis 5°C zurückgeführt.
4. Durch die CFDA/PI-Anfärbung konnte gezeigt werden, daß der Einfluß der Einfriergeschwindigkeiten bei Verwendung der Spermienkonzentration von 1 Mrd. Spermien/ml aufgehoben wurde, ebenso wie ein Unterschied zwischen beiden Spermienkonzentrationen durch die schnellere Einfriergeschwindigkeit nicht dargestellt werden konnte. Der Einfluß des Verdünners auf die Samenqualität nach dem Auftauen wurde durch die Verwendung der hohen Spermienkonzentration verdeckt. Bei Verwendung des Verdünners 2 konnte kein Einfluß der Spermienkonzentration sichtbar gemacht werden.
5. Die CFDA/PI-Anfärbung ist, gegenüber der Spermac^R-Färbung, die wesentlich „sensiblere“ Färbemethode zur Darstellung von Tiefgefrierschäden an Hengstpermien.

Summary

Christoph Börgel

Cryopreservation of stallion semen with respect to different extenders, sperm concentration and cooling rates.

In January and February 1992 first ejaculates of 72 three-year-old maiden warmblood stallions were collected and examined during a routine andrological examination at the Department of Herd Health and Reproduction at the University of Utrecht.

In a split-sample experiment the influence of two extenders (extender 1: EDTA-lactose-egg yolk (20%)-glycerin(5%); extender 2: glucose-skim milk-egg yolk (2%)-glycerin (2.5%)), two sperm concentration rates (concentration 1: 200×10^6 spermatozoa/ml; concentration 2: 1000×10^6 Spermatozoa/ml) and two cooling rates (program 1: $0.3^\circ\text{C}/\text{min}$ from $+20^\circ\text{C}$ to -15°C and $25^\circ\text{C}/\text{min}$ up to -150°C ; program 2: $10^\circ\text{C}/\text{min}$ from 20°C to -10°C and $25^\circ\text{C}/\text{min}$ up to -150°C .) on sperm motility, acrosome integrity and plasma membrane integrity of thawed semen was evaluated.

Half of the raw semen was diluted 1+1 (v:v) in extender 1 and the other half in extender 2. The samples were centrifuged at room temperature for 15 min at 1000 g. Both samples were divided to receive a final concentration of either 200×10^6 spermatozoa/ml or 1000×10^6 spermatozoa/ml. 0.5 ml straws were filled and each of the four samples was split in two for freezing in a computer-controlled freezer.

After freezing the samples were stored in liquid nitrogen. After thawing the samples for 30 sec at 37°C they were diluted 1+1 (v:v) with the corresponding glycerin-free extender. After 5 minutes of incubation at 37°C sperm motility of each sample was assessed with a Hamilton-Thorn-Semen Motility Analyser. Spermac^R-staining, which is a differential acrosome staining method for use on fresh and diluted semen, and a fluorescent staining method with carboxyfluoresceindiacetate/propidiumiodide (CFDA/PI) to evaluate membrane integrity were used to examine 200 spermatozoa of each sample.

The following results were seen:

1. With regard to post-thaw motility, plasma membrane and acrosome integrity (CFDA/PI-staining) and acrosome integrity (Spermac^R-staining), extender 1 showed significant better results than extender 2.

2. Using a sperm concentration of 1000×10^6 spermatozoa/ml, motility and acrosome integrity of thawed semen were significantly higher than using a concentration of 200×10^6 spermatozoa/ml. As for integrity of plasma membrane using a concentrate of 200×10^6 spermatozoa/ml proved to be considerably better. With regard to sperm cells having an intact plasma membrane and intact acrosome after freezing and thawing no difference could be detected between both sperm concentrates.
3. Comparing both cooling rates the slow cooling rate (program 1) presented significantly better results than program 2.
4. The CFDA/PI-staining method demonstrated that the influence of cooling rates was neutralized by using a sperm concentration of 1000×10^6 spermatozoa/ml. The influence of sperm concentration was neutralized when using freezing program 2.

The influence of extender on the post-thaw semen quality was neutralized using the high concentration rate as well as no influence of concentration could be shown using extender 2.

5. To expose injuries of thawed stallion semen the CFDA/PI-staining method seems to be more sensitive than the spermac^R-staining method.