

Untersuchungen zur Kryokonservierung von Hengstsperma

A. Wöckener¹, F. O. Papa², H. Bader¹, H. Leps¹, und R. Schmitz¹

¹ Klinik für Andrologie und Besamung der Haustiere der Tierärztlichen Hochschule Hannover

² Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Botucatu, Brasilien

Einleitung

Während die Frischsamenübertragung beim Pferd aktuell stark zunimmt, ist bei der Anwendung von Tiefgefriersperma seit Jahren eine Stagnation zu beobachten. Die Ursache hierfür ist überwiegend in den bislang unbefriedigenden Trächtigkeitsraten zu suchen, die unabhängig von der Methode etwa 50 % betragen.

Die Problematik der Tiefgefrierung besteht in der Schädigung der Samenzellen durch Kristallisation und Lösungseffekte der Verdünnermedien während der Gefrier- und Auftauvorgänge. Diese Schädigungen werden entscheidend durch die Geschwindigkeit des Gefrierens und der Erwärmung der Samenproben beim Wiederauftauen beeinflusst. Dies gilt auch für das an und für sich bewährte Makrotüb-Verfahren (Martin et al., 1979), das vor allem durch seine Praktikabilität beim Auftauen und bei der Insemination besticht. Aufgrund des großen Durchmessers des Samentröhrchens (5,5 mm) ergeben sich jedoch starke Unterschiede in den Temperaturverläufen zwischen dem zentralen und peripheren Bereich der Probe (Delius, 1985; Leps, 1988).

Durch diese verpackungsbedingte Inhomogenität der Einfrier- und Auftaugeschwindigkeit wird die Einhaltung des optimalen Temperaturverlaufs erschwert. Besonders beim Auftauen im Wasserbad können durch Lösungseffekte und zu langsame Rekristallisation im Zentrum der Probe Zellschädigungen und an den in der Peripherie bereits aufgetauten Samenzellen Wärmeschäden hervorgerufen werden (Martin et al., 1979).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen, wurden Konservierungsversuche mit Hengstsperma in 0,5-ml-Pailletten (Delius, 1985) und mit einer Modifikation des Makrotübs (flachformatiges Behältnis) für die Tiefgefrierung von Ebersperma (Leps, 1988) vorgenommen.

In den vorliegenden orientierenden Untersuchungen sollte ein Vergleich zwischen diesem Flachtüb, der mittleren Paillette und dem Makrotüb angestellt werden.

Zusammenfassung

Von vier Hengsten wurden je fünf in gleichmäßigen Abständen gewonnene Ejakulate für einen Einfrierversuch mit folgenden Einfrier- und Auftaubedingungen verwendet: Einfrieren in 1. 0,5-ml-Paillette, Auftauen bei 40 °C – 30 Sek., 2. 4-ml-Makrotüb, Auftauen bei 50 °C – 40 Sek.; 3. 1,7-ml-Flachtüb, Auftauen bei 40 °C – 30 Sek.; 4. 1,7-ml-Flachtüb, Auftauen bei 50 °C – 10 Sek. Beurteilungskriterien waren die Spermienmotilität und -morphologie. Mit Ausnahme eines Hengstes direkt nach dem Auftauen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsverfahren. Die Hengste unterschieden sich zum Teil allerdings erheblich. Möglicherweise wurden durch den für alle Behandlungsverfahren einheitlichen Einfriermodus Einflüsse verdeckt. Umfangreichere Untersuchungen unter Variation der Einfriermethodik sind vorgesehen.

Freezing of stallion semen – influence of different packaging methods

Five ejaculates from each of four stallions were collected. Split samples were assigned to each of the following freezing and thawing methods. Freezing in 1. 0.5-ml straws, thawing at 40 °C for 30 sec., 2. 4-ml Makrotüb, thawing at 50 °C for 40 sec.; 3. 1.7-ml Flachtüb, thawing at 40 °C for 30 sec.; 4. 1.7-ml Flachtüb, thawing at 50 °C for 10 sec. After thawing sperm motility and morphology (acrosomal alterations and total amount of abnormal spermatozoa) were evaluated. Except of one case there was no statistically significant difference between treatments. However the results of different stallions varied considerably. Maybe that possible influences of packaging were superimposed by the uniform freezing conditions. Further investigations regarding different freezing procedures are necessary.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen standen zwei im Warmbluttyp stehende Hengste und je ein Vollblut- und Traberhengst (Alter 4 bis 10 Jahre) mit nachgewiesener Fruchtbarkeit zur Verfügung, von denen je fünf Ejakulate in 3- bis 4tägigen Abständen mittels künstlicher Scheide an einer rossenden Stute gewonnen wurden.

Nach Beurteilung der nativen Bewegungsaktivität (Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit) wurden die Ejakulate im Verhältnis 1:1 mit Merck-Verdünner I® vorverdünnt und nach 10minütiger Anpassungszeit 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zentrifugat mit Merck-Laktose-Verdünner resuspendiert (Martin et al., 1979), wobei gleichzeitig eine Konzentrationseinstellung des verdünnten Samens auf 100 Millionen Samenzellen pro ml vorgenommen wurde. Anschließend wurde der verdünnte Samen in drei verschiedene Behältnisse abgefüllt: 1. 0,5-ml-Kunststoffpailletten, 2. 4-ml-Makrotüb® und 3. 1,7-ml-Flachbehältnisse Typ 1 (im weiteren kurz „Flachtüb“ genannt), welche wie bei Leps (1988) beschrieben hergestellt wurden.

Der Einfriervorgang bestand für alle Konfektionierungsformen aus einer 20minütigen Lagerung des Einfriergutes bei –120 °C auf einem Gitterrost in der Stickstoffdampfzone sowie aus dem anschließenden Versenken und Lagern in Flüssig-Stickstoff.

Nach mehrwöchiger Lagerung wurden die verschiedenen Konfektionierungen wie folgt im Wasserbad aufgetaut:

0,5-ml-Pailletten bei 40 °C für 30 Sekunden, Makrotüb bei 50 °C für 40 Sekunden. Für die Flachbehältnisse wurden zwei Auftautemperaturen und -zeiten getestet: a) 40 °C für 30 Sekunden (im folgenden „Flachtüb 40/30“ genannt), b) 50 °C für 10 Sekunden („Flachtüb 50/10“). Insgesamt resultierten für die vorliegenden Untersuchungen also vier verschiedene Behandlungsverfahren.

Für alle Proben wurden direkt nach dem Auftauen die Bewegungsaktivitäten beurteilt (Gesamt- und Vorwärtsbeweglichkeit) sowie Objektträgerpräparate für die Spermac®-Färbung angefertigt und nach der von Oettle (1986) beschriebenen Methode ausgewertet.

Zudem wurden die Bewegungsaktivitäten des Samens 1, 2, 3 und 4 Stunden nach dem Auftauen und der zwischenzeitlichen Aufbewahrung bei Raumtemperatur erneut beurteilt. Bei der statistischen Bearbeitung wurde für jeden Hengst und jeden Zeitpunkt getrennt eine einfaktorielle Varianzanalyse vorgenommen. Des Weiteren wurden eine Zeitreihenanalyse und ein Vergleich der Hengste untereinander durchgeführt.

Ergebnisse

Die Motilitätsbefunde (Gesamtmotilität V+O sowie Vorwärtsbeweglichkeit V) für die vier Hengste und die ver-

schiedenen Untersuchungszeitpunkte sind in Tabelle 1 und graphisch in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt. In Tabelle 1 sind ferner für jeden Hengst getrennt die Motilitätsbefunde für den Nativsamens aufgeführt.

Die Auftaumotilitäten zeigen bei drei Hengsten (Hengst 1, 3 und 4) weitgehende Übereinstimmung, während sie bei Hengst 2 deutlich unter diesem Niveau liegen. Diese Unterschiede zwischen den Hengsten sind auch zu den späteren Untersuchungszeitpunkten vorhanden.

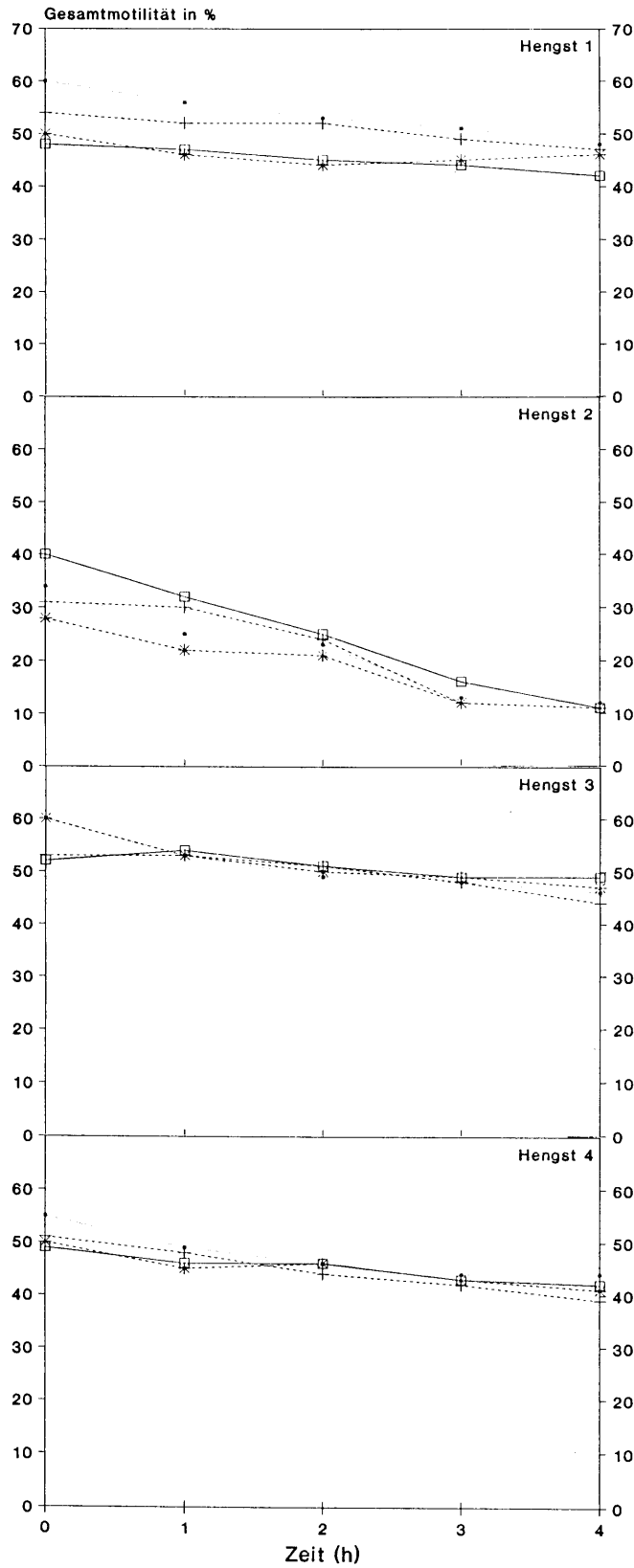
Bei drei Hengsten (Hengst 2, 3 und 4) bestehen zwischen den einzelnen Samenbehandlungen sowohl zum Zeitpunkt 0 als auch im Verlauf der weiteren Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede. Bei Hengst 1 war zum Zeitpunkt 0 die 0,5-ml-Paillette bezüglich der Gesamtmotilität signifikant besser als der Flachtüb 50/10.

Die durchgeführte Zeitreihenanalyse erbrachte die erwarteten, zum Teil hochsignifikanten Abfälle der Bewegungsaktivitäten während der 4stündigen Beobachtungszeit nach dem Auftauen. Die mittleren Prozentsätze morphologisch abweichender und akrosomgeschädigter Samenzellen für die verschiedenen Hengste sind in Abbildung 3 wiedergegeben. Bezüglich der Spermienmorphologie konnten beim Vergleich der vier Behandlungsverfahren keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Tab. 1: Spermienmotilität nach dem Auftauen ($\bar{x} \pm s$; V + O = Gesamtmotilität, V = Vorwärtsbeweglichkeit) von vier Hengsten bei der Anwendung von vier verschiedenen Tiefgefrieremethoden

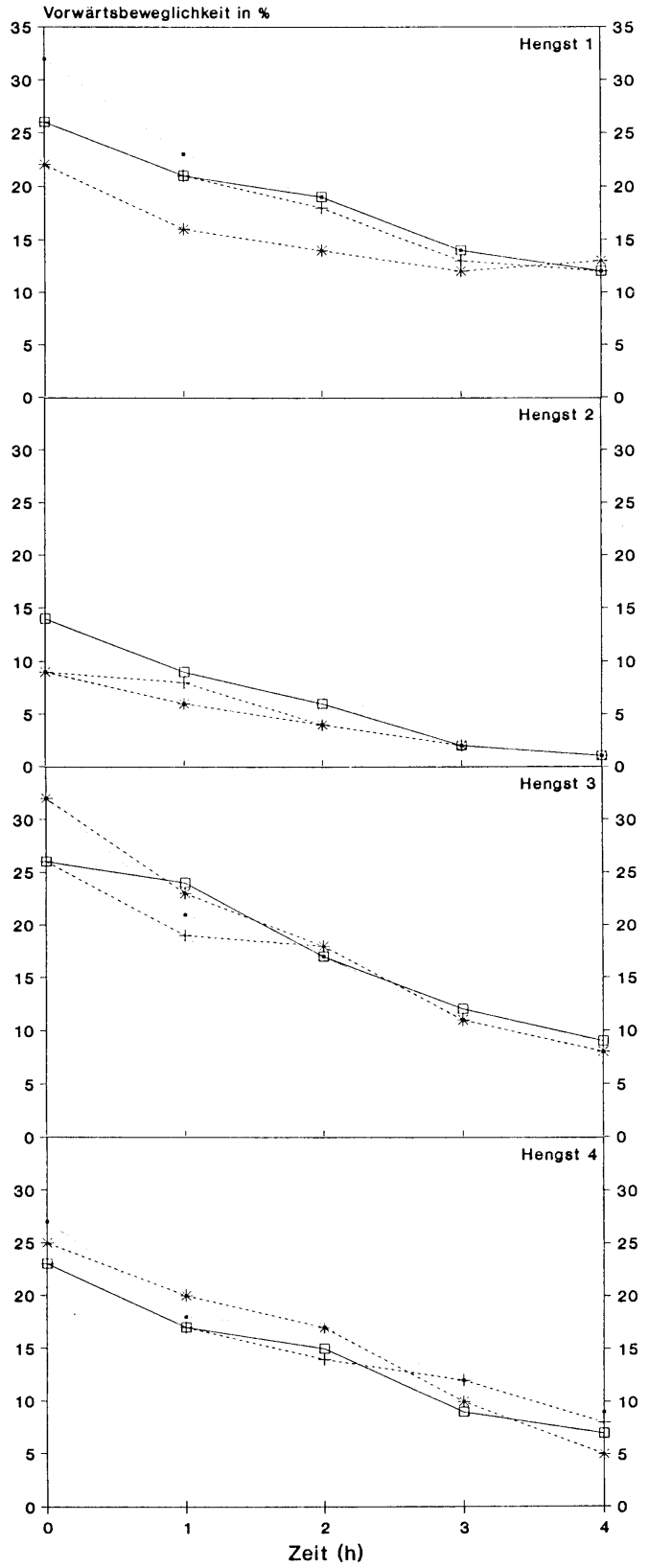
Zeit (h)	0		1		2		3		4	
	V + O (%)	V	V + O (%)	V	V + O (%)	V	V + O (%)	V	V + O (%)	V
Hengst 1 n = 5 (nativ: V + O 74 ± 9 V 19 ± 11)										
0,5-ml-Paillette	60 ± 0*	32 ± 4	56 ± 9	23 ± 4	53 ± 10	19 ± 2	51 ± 9	14 ± 4	48 ± 6	12 ± 3
Makrotüb	54 ± 5	26 ± 5	52 ± 6	21 ± 2	52 ± 4	18 ± 3	49 ± 7	13 ± 3	47 ± 4	12 ± 3
Flachtüb 40/30	50 ± 7	22 ± 4	46 ± 7	16 ± 4	44 ± 8	14 ± 4	45 ± 7	12 ± 4	46 ± 5	13 ± 4
Flachtüb 50/10	48 ± 9*	26 ± 10	47 ± 10	21 ± 7	45 ± 9	19 ± 5	44 ± 8	14 ± 4	42 ± 8	12 ± 3
Hengst 2 n = 5 (nativ: V + O 79 ± 6 V 27 ± 11)										
0,5-ml-Paillette	34 ± 12	9 ± 4	25 ± 15	6 ± 5	23 ± 15	4 ± 3	13 ± 7	2 ± 1	12 ± 6	1 ± 1
Makrotüb	31 ± 15	9 ± 8	30 ± 15	8 ± 9	24 ± 16	4 ± 3	12 ± 8	2 ± 1	11 ± 7	1 ± 1
Flachtüb 40/30	28 ± 14	9 ± 7	22 ± 17	6 ± 8	21 ± 17	4 ± 3	12 ± 6	2 ± 0	11 ± 4	1 ± 1
Flachtüb 50/10	40 ± 15	14 ± 7	32 ± 13	9 ± 7	25 ± 17	6 ± 5	16 ± 11	2 ± 0	11 ± 5	1 ± 1
Hengst 3 n = 5 (nativ: V + O 75 ± 5 V 24 ± 6)										
0,5-ml-Paillette	60 ± 7	32 ± 8	53 ± 4	21 ± 5	49 ± 7	17 ± 3	48 ± 8	11 ± 2	46 ± 8	8 ± 3
Makrotüb	53 ± 7	26 ± 5	53 ± 7	19 ± 2	51 ± 5	18 ± 4	48 ± 6	11 ± 2	44 ± 7	8 ± 3
Flachtüb 40/30	60 ± 9	32 ± 6	53 ± 8	23 ± 4	50 ± 7	18 ± 6	49 ± 9	11 ± 5	47 ± 8	8 ± 3
Flachtüb 50/10	52 ± 11	26 ± 5	54 ± 9	24 ± 5	51 ± 8	17 ± 7	49 ± 7	12 ± 3	49 ± 5	9 ± 2
Hengst 4 n = 5 (nativ: V + O 76 ± 11 V 22 ± 8)										
0,5-ml-Paillette	55 ± 5	27 ± 4	49 ± 7	18 ± 4	46 ± 7	17 ± 4	44 ± 4	12 ± 4	44 ± 4	9 ± 4
Makrotüb	51 ± 7	23 ± 8	48 ± 6	17 ± 7	44 ± 7	14 ± 7	42 ± 6	12 ± 6	39 ± 7	8 ± 7
Flachtüb 40/30	50 ± 6	25 ± 5	45 ± 5	20 ± 0	46 ± 7	17 ± 4	43 ± 6	10 ± 4	41 ± 7	5 ± 3
Flachtüb 50/10	49 ± 5	23 ± 4	46 ± 5	17 ± 4	46 ± 7	15 ± 5	43 ± 7	9 ± 2	42 ± 8	7 ± 4

Vergleich verschiedener Tiefgefrieremethoden ab = $p \leq 0,05$



— 0,5-ml-Paillette -+- Makrotüb
 -.- Flachtüb 40/30 -□- Flachtüb 50/10

Abb. 1: Gesamtmotilität (\bar{x} in %) von Hengstejakulaten im Vergleich der vier Tiefgefrierverfahren.



— 0,5-ml-Paillette -+- Makrotüb
 -.- Flachtüb 40/30 -□- Flachtüb 50/10

Abb. 2: Prozentsätze vorwärtsbeweglicher Samenzellen (\bar{x}) in Hengstejakulaten im Vergleich der vier Tiefgefrierverfahren.

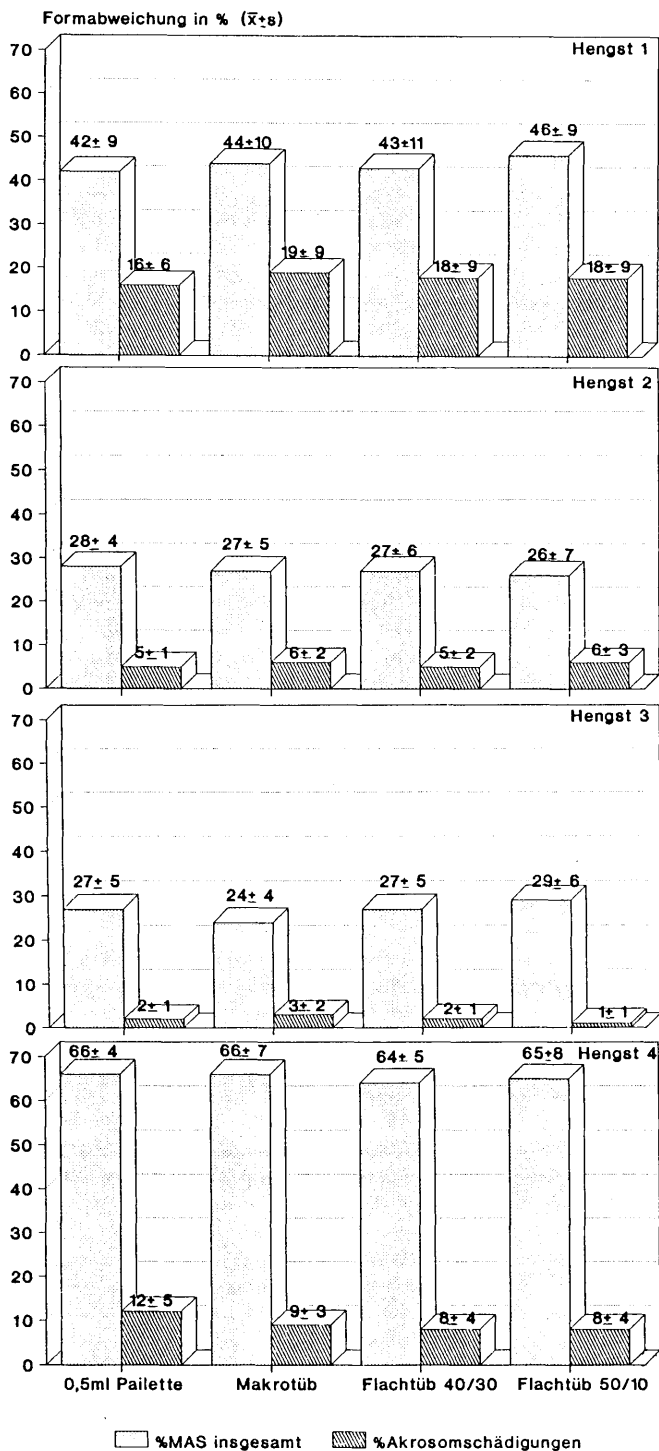


Abb. 3: Prozentsätze morphologisch abweichender Samenzellen (MAS) und akrosomgeschädigter Samenzellen im Vergleich der vier Tiefgefrierverfahren.

Diskussion

In den vorliegenden Untersuchungen sollte überprüft werden, ob durch eine Modifikation der Verpackungseinheit – insbesondere eine Verringerung des Durchmessers – eine Verbesserung der Tiefgefrierparameter von Hengstspenna zu erreichen ist. Untersuchungen von *Delius* (1985) unter

Verwendung von 0,5-ml-Kunststoffröhrchen hatten beim Hengst gleiche Ergebnisse wie das Makrotübverfahren ergeben. *Leps* (1988) erreichte bei Tiefgefrierung von Ebersperma durch Veränderung des Makrotüb zu einem Flachbehältnis (Typ 1) eine signifikante Verbesserung der Motilitäts- und Akrosombefunde. Dieser Effekt wird auf eine Verkürzung des Auftauprozesses, Verringerung der Wärmeexposition peripherer Bereiche der Samenportion und insgesamt homogene Einfrier- und Auftaubedingungen zurückgeführt. In den vorliegenden Experimenten mit Hengstspenna war ein derartiger Effekt durch Anwendung des Flachtüb nicht erkennbar. Lediglich bei einem Hengst ergab sich ein signifikanter Unterschied, der allerdings nur 0,5-ml-Paillette und Flachtüb 50/10 betraf. Ansonsten ergab sich jedoch weder eine Verschlechterung noch eine Verbesserung der Motilitäts- und Morphologieparameter. Eine Bewertung der erprobten Verfahren ist derzeit noch nicht möglich, was teilweise auf den zu geringen Probenumfang zurückzuführen ist. Möglicherweise wurden durch den in diesen Untersuchungen für alle Konfektionierungsarten angewandten einheitlichen Einfriermodus andere Einflüsse verdeckt. Geplante weitergehende Untersuchungen haben daher insbesondere auch optimierte Einfrierbedingungen für die unterschiedlichen Verpackungsformen zu berücksichtigen.

Literatur

- Delius, D.* (1985): Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Pferdesamen in 0,5-ml-Volumeneinheiten mit Hilfe computergesteuerter Einfrierprogramme. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Leps, H.-J.* (1988): Zur Kryokonservierung von Ebersperma – Einfluß verschiedener Konfektionierungsarten, insbesondere von Flachbehältnissen, auf Gefrier- und Auftauvorgänge sowie Auftauqualität. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- Martin, J. C., Klug, E., und Günzel, A.-R.* (1979): Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. J. Reprod. Fert., Suppl. 27, 47–51.
- Oettle, E.* (1986): Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. Vet. Med. 81, 263–266.

Dr. H. Bader
Klinik für Andrologie und
Besamung der Haustiere
Tierärztliche Hochschule Hannover
Bischofsholer Damm 15
D-3000 Hannover 1