

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Zugabe von ATP, Carnitin, Coffein und Kallikrein zu Samenverdünnern einen positiven Effekt auf die Haltbarkeit von flüssigkonserviertem Hengstisamen hat. Die Untersuchungen wurden mit einem Magermilchverdünner (MMV), einem Magermilch-Tyrode-Verdünner (KMT) und dem Verdünner INRA-82 unter Laborbedingungen durchgeführt.

In einem Vorversuch an insgesamt 16 Ejakulaten von 4 Hengsten wurden für jeden Zusatzstoff drei verschiedene, in Anlehnung an vorhandene Literatur ausgewählte Konzentrationen überprüft: 3,5, 5 und 7 mM ATP; 6, 12 und 18 mM Carnitin; 1, 5 und 7 mM Coffein sowie 5, 10 und 20 U/ml Kallikrein.

Die Hauptversuche wurden von April bis Juli 1997 nach dem split-sample-Verfahren an je 6 Ejakulaten von 5 Hengsten durchgeführt. Jedes Ejakulat wurde in drei Teile geteilt, die jeweils im Verhältnis 1:1 mit einem der drei verschiedenen Verdünnern (ohne Zusatzstoff) gemischt und 10 Minuten bei 710g zentrifugiert wurden. Nach Resuspension auf  $100 \times 10^6$  Spermien/ml und nochmaliger Teilung in vier Proben wurden durch Zugabe der Zusatzstoffe zu jedem Verdünner drei Proben mit Endkonzentrationen von 5,0 mM ATP, 5,0 mM Coffein und 6,0 mM Carnitin sowie eine Kontrollprobe ohne Zusatzstoff hergestellt. Kallikrein wurde nicht in die Hauptversuche einbezogen, da im Vorversuch keine der getesteten Konzentrationen einen Effekt auf die Spermienmotilität gezeigt hatte. Die Proben wurden bei 5°C auf einer Rollbank gelagert.

Als Beurteilungskriterien diente die Motilität direkt nach der Probenaufbereitung sowie nach 6, 24 und 48 Stunden. Die Spermienmorphologie und der Anteil lebender Spermien wurde anhand von Eosin-Nigrosin-gefärbten Ausstrichen in den für 24 Stunden konservierten Proben untersucht. Nach 24 Stunden wurde außerdem eine computergestützte Motilitätsanalyse (CMA) durchgeführt. Hierbei wurde der prozentuale Anteil motiler, der Anteil linear motiler Spermien sowie die Spurgeschwindigkeit motiler und linear motiler Spermien gemessen.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Nach den Ergebnissen der Vorversuche ließen die Konzentrationen von 5 mM ATP, 5 mM Coffein und 6 mM Carnitin einen günstigen Effekt auf die Spermienmotilität erwarten.
2. In der subjektiven Schätzung der Vorwärtsmotilität nach 0, 6, 24 und 48 Stunden zeigten die Spermien im INRA-82 die höchsten, im MMV die niedrigsten Werte. Nach 24 Stunden war bei den Spermien im Verdünner INRA-82 noch kein statistisch auffälliger Abfall der Vorwärtsmotilität zu verzeichnen. INRA-82 war zu jedem Zeitpunkt und nach jeder Behandlung den anderen Verdünnern hinsichtlich der Motilitätserhaltung der Spermien statistisch auffällig überlegen.
3. Von den Zusatzstoffen erhöhte Coffein den geschätzten prozentualen Anteil vorwärtsmotiler Spermien nach 6, 24 und 48 Stunden im MMV gegenüber den unbehandelten Proben. Durch ATP-Zugabe wurde die Vorwärtsmotilität im MMV und im KMT nach 6stündiger Lagerung gegenüber den Kontrollproben statistisch auffällig erhöht. Carnitin blieb in allen Verdünnern ohne Einfluß auf die geschätzte Vorwärtsmotilität. Im INRA-82 wurden die subjektiven Motilitätsparameter nicht von den zugesetzten Stoffen beeinflusst.
4. Die CMA-Analyse an den für 24 Stunden gelagerten Proben ergab im KMT deutlich, in den meisten Vergleichen statistisch auffällig niedrigere Anteile motiler und linear motiler Spermien, verglichen mit den unbehandelten Proben mit MMV und INRA-82. Der Prozentsatz linear motiler Spermien war mit ATP, Carnitin und Coffein statistisch auffällig höher als in den Kontrollproben im MMV und im KMT. Im INRA-82 wurden die objektiven Motilitätsparameter nicht von den zugesetzten Stoffen beeinflusst.
5. Coffein und ATP hatten einen entgegengesetzten Einfluß auf die Spurgeschwindigkeit. Die linear motilen Spermien in den Proben mit ATP zeigten eine gegenüber den Vergleichsproben erhöhte Geschwindigkeit. In den coffeinbehandelten Proben war die Geschwindigkeit der motilen Spermien herabgesetzt. Der Einfluß war unabhängig vom eingesetzten Verdünner.
6. Die Membranintegrität und die Morphologie der Spermien wurden durch die Art des eingesetzten Verdünners beeinflusst. Im KMT zeigten die Spermien die schlechteste Membranintegrität gegenüber den anderen Verdünnern. Im INRA-82 zeigten die Proben den höchsten Anteil membranintakter Spermien, jedoch auch den höchsten Anteil morphologisch veränderter Spermien.

## 6 SUMMARY

**Nicola Rosenkranz:**

### **Influence of ATP, carnitine, caffeine and kallikrein on chilled stallion semen.**

The aim of this study was to investigate the influence of ATP, carnitine, caffeine and kallikrein on chilled stallion semen, diluted in skim milk extender (MMV), a skim-milk-tyrode-medium (KMT) and the extender INRA-82, respectively.

In a first trial of the study using 16 ejaculates of 4 stallions three different concentrations of ATP, carnitine, caffeine and kallikrein were added to the samples to find out the most effective concentration to use in the main part of the study.

In the main part of the study six ejaculates of each of five stallions were used. The ejaculates were divided into three parts and diluted with an equal volume of each of the different extenders before centrifugation at 710g for 10 minutes. After resuspension and dilution to a sperm density of 100 million/ml each fraction was divided into four aliquots of which one served as a control. The different substances were added to a final concentration of 5,0 mM ATP, 5,0 mM caffeine and 6,0 mM carnitine, respectively. Kallikrein was not included in the main study because in the previous test none of the compared concentrations increased the sperm motility.

Motility was estimated microscopically immediately after preparation of the samples and after another 6, 24 and 48 hours of preservation at 5°C. Sperm morphology and the percentage of live sperm were checked by eosin-nigrosin-stained smears prepared from semen samples stored for 24 hours. At the same time computervideomicrography was performed to determine the percentage of progressively motile spermatozoa, linearity of motile sperm and velocity of motile spermatozoa.

The following results were obtained:

1. From the results of the first trial we expected the most positive effect on sperm motility at concentrations of 5 mM ATP, 5mM Caffeine and 6 mM carnitine. Kallikrein showed no effect on sperm motility parameters.
2. The estimation of sperm forward motility after all periods of incubation showed a superiority of INRA-82 to KMT, which again was superior to MMV. After storing for 24 hours at 5 °C there still was no significant decrease in progressive motility when the spermatozoa were suspended in INRA-82. After all periods of storing and with every added substance INRA-82 was significantly superior to the other extenders investigated.
3. In samples containing caffeine forward motility in MMV after 6, 24 and 48 hours was significantly higher than in the control samples. ATP was significantly superior to the control samples in KMT and MMV after 6 hours. Carnitine had no influence in any extender at any time. In INRA-82 forward motility was not influenced by the added substances at any time.
4. After 24 hours (CMA) the percentage of motile and linear motile spermatozoa was reduced in KMT. In samples containing ATP, carnitine or caffeine the percentage of linear motile spermatozoa was significantly increased in KMT and MMV according to the control samples. Parameters of motility in INRA-82 were not influenced by the added substances.
5. Caffeine and ATP had an opposite effect on sperm velocity. Linear motile semen in samples with ATP showed an increased VCL than the controls. VCL of motile semen in samples containing caffeine was decreased. This influence did not depend on the medium the sperms were suspended in.
6. Sperm integrity and morphology were influenced by the extenders. In KMT the spermatozoa showed the lowest percentage of membrane-intact spermatozoa. In the INRA-82 the spermatozoa showed the highest percentage of membrane-intact spermatozoa, but the highest proportion of morphologically abnormal spermatozoa.