

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Puffer Bikarbonat, HEPES und MOPS, der Antioxidantien Ascorbinsäure und Xanthurensture sowie von 2% Eigelb in einem Magermilch-Glukose Verdüner auf die Motilität und Vitalität flüssigkonservierter Pferdespermien untersucht. Weiterhin wurde der nach den Ergebnissen dieses ersten Versuchsabschnittes entwickelte modifizierte Magermilchverdünner (SKMGBA) unter besonderer Berücksichtigung verschiedener Lagerungstemperaturen (5°C, 15°C und 18°C) und aerober oder anaerober Bedingungen mit verschiedenen etablierten (Kenney-Verdüner, INRA-82 + 2% Eigelb, INRA 96) sowie mit für die Konservierung von Pferdesperma neuen Verdünnungsmedien bzw. -verfahren (Caprogen, AndroMed[®]) hinsichtlich der Erhaltung der Samenqualität über eine Lagerungsdauer von 48 bis 168 Stunden verglichen. Um den Einfluß der Sauerstoffverfügbarkeit weiter zu spezifizieren, wurden außerdem unterschiedliche Mengen des in dem modifizierten Magermilchverdünner suspendierten Spermias mit jeweils unterschiedlichen Mengen überstehender Luft in 20 ml-Spritzen horizontal bei 5°C und 15°C gelagert (20 ml Sperma ohne Luft, 15 ml Sperma + 5 ml Luft, 10 ml Sperma + 10 ml Luft, 5 ml Sperma + 15 ml Luft und 2.5 ml Sperma + 17.5 ml überstehender Luft) und über eine Lagerungsdauer von 48 Stunden untereinander und mit der Lagerung von 100 ml Spermiasuspension in einer 250 ml-Glasflasche bei 5°C verglichen. Abschließend wurde ein Besamungsversuch mit 24 Stunden in INRA 96 (aerob bei 15°C) und dem modifizierten MMV (aerob bei 15°C oder anaerob bei 5°C) gelagertem Sperma durchgeführt.

Für die im Split-Sample Verfahren durchgeführten Laborversuche standen in der Zeit von Oktober 1999 bis Juli 2000 insgesamt 54 Ejakulate von 31 Hengsten zur Verfügung. In den Besamungsversuch von Mai bis Juli 2000 wurden 10 Hengste und 128 Stuten einbezogen.

Als Untersuchungsparameter gingen die computervideomikrographische Motilitätsanalyse (CMA) mit Ermittlung der Vorwärts- und Gesamtmotilität sowie der Spermien-geschwindigkeit (VAP) und der Linearität der Bewegung, der hypoosmotische Schwellungstest mittels CASY[®]1 sowie fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Spermienmorphologie in die Beurteilung der Samenzellen ein. Zur Feststellung der

Membranintegrität wurde eine kombinierte Carboxyfluoresceindiazetat-Propidiumiodid-Färbung (CFDA-PI) eingesetzt. Der Kapazitionszustand wurde mit Hilfe der Chlortetracyclin-Färbung (CTC) beurteilt.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Im direkten Vergleich der Puffer HEPES und Bikarbonat waren bis zu einer Lagerungszeit von 48 Stunden bei 5°C keine Unterschiede in der Wirkung auf die Spermienmotilität untereinander und zur Kontrollprobe feststellbar. Nach 72 Stunden erhöhte Bikarbonat die Motilität signifikant gegenüber der HEPES- und der Kontrollprobe. Beim Vergleich der Mittelwerte über die Verdünnervariationen mit HEPES oder Bikarbonat war Bikarbonat schon nach 24 Stunden signifikant überlegen. MOPS wies zu allen Zeitpunkten die meist signifikant geringsten Motilitätswerte auf.
2. Ein Zusatz von 2% klarifiziertem Eigelb führte sowohl in MMV mit HEPES als auch mit Bikarbonat zu einer häufig signifikanten Verringerung der Motilität. Beim Vergleich der Gruppenmittelwerte war bis auf eine Ausnahme (Verringerung der Gesamtmotilität nach 48 Stunden) kein Einfluß des Eigelb-Zusatzes mehr feststellbar.
3. Ein Zusatz von 0,9 g/l Ascorbinsäure erhöhte die Vorwärts- und Gesamtmotilität nach 72 Stunden signifikant im Vergleich zur Kontrollprobe. Zu früheren Zeitpunkten und in einer Konzentration von 0,45 g/l hatte Ascorbinsäure keinen Einfluß auf die Spermienmotilität.
4. Xanthurensäure in einer Konzentration von 5 mM im mit Bikarbonat gepufferten MMV bei 5°C führte zu einer fast immer signifikanten Erhöhung der Motilität zu allen Meßzeitpunkten. Ein Zusatz von Xanthurensäure und 0,9 g/l Ascorbinsäure hatte keinen Einfluß auf die Motilität. Nach Vergleich der Gruppenmittelwerte führte der kombinierte Zusatz beider Antioxidantien zu einer signifikanten Verringerung der Motilitätswerte nach 24 und 48 Stunden.
5. Bei Verdünnung mit dem modifizierten MMV (SKMGBA) war bis 24 Stunden eine aerobe Lagerung bei 18°C einer Lagerung bei 5°C überlegen, ab 72 Stunden führte die gekühlte Lagerung zu besseren Motilitätswerten. Sowohl bei 5°C als auch bei 18°C waren zunächst die aeroben Proben überlegen, während ab 72 Stunden (18°C) bzw. ab 144 Stunden (5°C) die anaeroben Lagerungsformen signifikante Vorteile zeigten.
6. Bei 15°C stieg die Motilität und Geschwindigkeit der Spermien nach 24 Stunden Lagerung in SKMGBA mit zunehmender Sauerstoffverfügbarkeit bis zu einem ausgewogenen Verhältnis von Spermasuspension und Luft an und fiel danach wieder ab.

Bei 5°C war keine eindeutige Tendenz feststellbar. Auch hier wirkte sich jedoch die Anwesenheit von Luft (10 ml-Probe) positiv auf die Motilität aus, während der Anteil membranintakter Zellen in der anaeroben Probe größer war. Nach 48 Stunden kam es bei beiden Temperaturen mit zunehmendem Luftanteil und abnehmendem Probenvolumen zu einem tendenziellen Abfall der Motilität und der Spermengeschwindigkeit. Die morphologischen Parameter verhielten sich bei 15°C und bei 5°C nach 48 Stunden entsprechend der Motilität. Die Lagerungsformen hatten keinen Einfluß auf die hypoosmotische Belastbarkeit der Spermien

7. Bei Verdünnung mit SKMGBA führte die Lagerung in einer 250 ml-Glasflasche bei 5°C nach 24 Stunden zu signifikant schlechteren Motilitätswerten als die horizontale Lagerung einer 10 ml-Probe in einer 20 ml-Spritze bei 15°C und nach 48 Stunden im Vergleich zur anaeroben oder nur wenig Luft enthaltenen Probe bei 5°C
8. SKMGBA war hinsichtlich der Motilität, der Spermengeschwindigkeit, der Membranintegrität und des Kapazitationszustandes dem Kenney-Verdüner sowie dem französischen Verdüner INRA 96 überlegen. In Bezug auf die Membranintegrität wies der mit 2% Eigelb versetzte INRA-82 bessere Werte auf, war aber in der Motilität nach 1 Stunde und im Anteil nicht kapazitierter Samenzellen nach 24 Stunden dem SKMGBA bei 5°C sowie in der Motilität nach 48 Stunden dem SKMGBA bei 15°C unterlegen.
9. Die Verdüner Caprogen, aufgrund einer Agglutination der Spermienköpfe, und AndroMed®, aufgrund seiner Hyperosmolarität, eignen sich nicht als Verdüner für Frischsperma des Pferdes.
10. Nach Besamungen mit 24 Stunden in INRA 96 bei 15°C oder in SKMGBA bei 5°C oder 15°C gelagertem Sperma konnten keine signifikanten Unterschiede in den erzielten Trächtigkeitsraten pro Zyklus (47%, 52% und 42%) festgestellt werden. Es besteht jedoch ein auffälliger Vorteil für SKMGBA bei 5°C gegenüber der Lagerung bei 15°C im gleichen Verdüner.

7 SUMMARY

Hierichs, Vera:

Comparative studies for establishing a long term preservation method of liquid horse semen under special consideration of different extenders, storage temperatures and sperm packaging.

The aim of this study was to check the influence of buffers (sodium bicarbonate, HEPES and MOPS), antioxidants (ascorbic acid and xanthurenic acid) and 2% egg yolk in a skim milk-glucose extender on motility and vitality of liquid preserved stallion semen. Additionally, the modified skim milk extender (SKMGBA), the development of which based on the results of the first experiment, was compared with several established extenders (Kenney, INRA-82 + 2% egg yolk, INRA 96) or new media for liquid stallion semen preservation (Caprogen, AndroMed[®]) under the special consideration of different storage temperatures (5°C, 15°C and 18°C) and aerobic or anaerobic conditions with regard to the viability of semen during storage for 48 until 168 hours. To specify the influence of access to oxygen, the effect of different sperm packaging of semen samples diluted in SKMGBA, stored horizontally in 20 ml syringes at 5°C or 15°C (20 ml diluted sperm without air, 15 ml diluted sperm + 5 ml overlaid air, 10 ml diluted sperm + 10 ml overlaid air, 5 ml diluted sperm + 15 ml overlaid air and 2.5 ml diluted sperm + 17.5 ml overlaid air) was studied on sperm survival after 24 and 48 hours and compared with the storage of 100 ml diluted sperm in a 250 ml glass bottle at 5°C. Finally, an insemination trial was carried out, after 24 h sperm storage, using SKMGBA at 5°C or 15°C and INRA 96 at 15°C.

In the in vitro experiments, 54 ejaculates of a total of 31 stallions obtained between October 1999 and July 2000 were tested using split-sample procedures. 10 stallions and 128 mares were included in the insemination trial from May to July 2000.

Criteria for evaluation were percentage of progressively and total motile spermatozoa, linearity and velocity of motile sperm determined by computervideomicrography and the hypoosmotic swelling test using CASY[®]1. Membrane integrity was checked by combined carboxyfluoresceinediacetate-propidiumiodide staining (CFDA-PI). For evaluation of sperm capacitation status, chlortetracycline-staining (CTC) was used.

The following results were obtained:

1. There were no effects of the two buffers HEPES and bicarbonate on sperm motility in comparison to control samples up to a storage time of 48 hours at 5°C. After 72 hours the motility was significantly higher in samples containing bicarbonate. Comparing the mean values of the extender groups with HEPES or bicarbonate as buffer, the samples containing bicarbonate were significantly superior after 24 hours of storage. The sperm samples with MOPS showed lowest motility after all periods of incubation.
2. The addition of 2% clarified egg yolk significantly reduced the motility in skim milk extender with HEPES as well as with bicarbonate. There was no difference between the mean values of the two extender groups with or without egg yolk, except for a significant reduction of total sperm motility after 48 hours in the group with 2% egg yolk.
3. Ascorbic acid in a concentration of 0,9 g/l significantly increased the percentage of progressively and total motile spermatozoa after 72 hours compared to the control samples. After a shorter time of incubation or in a lower concentration, motility was not influenced by ascorbic acid.
4. Xanthurenic acid in a concentration of 5 mM as addition to a skim milk extender, buffered with bicarbonate at 5°C, led to a significant increase in motility in nearly all cases. The combined addition of xanthurenic acid and 0,9 g/l ascorbic acid did not influence the motility. After 24 and 48 hours of storage, motility in the group of extenders containing both antioxidants was significantly inferior to that without any antioxidants.
5. If semen was diluted in SKMGBA, the storage under aerobic conditions at 18 °C was superior to the storage at 5°C up to 24 hours. After a storage time of 72 hours or longer, cooling to 5°C caused a higher percentage of motile spermatozoa. First the samples stored under aerobic conditions showed the higher motility at any temperature, but after 72 hours (18°C) or 144 hours (5°C) the anaerobic samples were significantly superior.
6. After 24 hours in SKMGBA at a storage temperature of 15°C, the motility and velocity increased with higher access to oxygen up to a balanced relation of diluted sperm and air, and decreased in the samples with more air. At 5°C there was no clear tendency observed, although access to air seemed to be advantageous for motility, while there were more membrane-intact spermatozoa in the anaerobic samples. An increasing access to oxygen led to a decrease in motility and velocity after 48 hours at 5°C as well as at 15°C. Sperm

membrane integrity and capacitation status were influenced as well as motility at 5°C and 15°C. Sperm packaging had no influence on hypoosmotic swelling test.

7. Sperm samples diluted in SKMGBA and stored in a 250 ml glass bottle at 5°C showed significantly lower motility compared to the 10 ml-aliquots stored horizontally in 20 ml syringes under aerobic conditions after 24 hours at 15°C and compared to anaerobic samples or samples with small access to air after 48 hours at 5°C.
8. SKMGBA was significantly superior to Kenney-extender and INRA 96 concerning motility, sperm velocity, membrane integrity and status of capacitation. The lowest percentage of membrane damaged spermatozoa after 24 hours was observed in INRA-82 + 2% egg yolk, but regarding to motility after 1 hour and percentage of not capacitated spermatozoa after 24 hours, SKMGBA at 5°C was significantly superior, likewise motility after 48 hours in SKMGBA at 15°C.
9. The diluents Caprogen, due to an agglutination of the sperm heads, and AndroMed[®], because of hyperosmolarity, are not suitable as extenders for liquid preservation of stallion sperm.
10. The insemination with liquid semen stored 24 hours in INRA 96 at 15°C or in SKMGBA at 5°C or 15°C had no influence on pregnancy rates per cycle in this study (47%, 52% and 42%). There is a remarkable advantage for storage in SKMGBA at 5°C compared to storage at 15°C in the same extender, however, it may be that an insemination trial including more mares could lead to significant differences.