

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Antioxidantien Ascorbinsäure und Katalase als Zusätze zu verdünntem Hengstesperma in der Lage sind Spermatozoen vor einer Lipidperoxidation zu schützen und die Samenqualität während der Flüssigkonservierung zu erhalten. Die Lagerung des verdünnten Hengstespermas mit und ohne Antioxidanzienzusatz erfolgte über vier Tage bei 5°C.

Zur Durchführung der Vor- und Hauptversuche standen 7 Hengste einer zentralen Besamungsstation zur Verfügung. Die Hengstejakulate wurden mit Hilfe einer künstlichen Scheide gewonnen. Anschließend wurde das Sperma, nach Abtrennung der Schleimanteile, im Verhältnis 1:1 mit Magermilch- oder Glycinverdünner konserviert. Von jedem Hengst wurden für jede angewendete Kombination aus Sperma, Verdünner und Verdünnerzusatz 3 Ejakulate verwendet. Für die weitere Auswertung wurde für jeden Hengst der Mittelwert aus diesen drei Versuchsdurchgängen gebildet.

Im ersten Versuch (Hauptversuch A) wurde das mit Magermilchverdünner verdünnte Sperma ohne oder mit 0,45g/l bzw. 0,9 g/l Ascorbinsäure konserviert. Im Hauptversuch B wurde Glycinverdünner anstelle des Magermilchverdünners ohne oder mit Ascorbinsäure (0,45 g/l oder 0,9 g/l Ascorbinsäure) eingesetzt. In einem dritten Experiment (Hauptversuch C) erfolgte die Verdünnung mit Magermilchverdünner. Dem verdünnten Sperma wurde anschließend keine oder  $0,45 \times 10^6$  I.U./l oder  $1,8 \times 10^6$  I.U./l Katalase zugesetzt. Im Hauptversuch D wurde dem mit Glycinverdünner konservierten Sperma keine,  $0,45 \times 10^6$  I.U./l oder  $1,8 \times 10^6$  I.U./l Katalase zugesetzt.

Zur Untersuchung der Membranintegrität der Spermien wurde der Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluoresceindiacetat eingesetzt. Der Anteil an vorwärtsbeweglichen Spermien wurde mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops geschätzt. Die Beurteilung der Membranintegrität und Motilität der Spermien erfolgte eine Stunde nach Spermaverdünnung und nach 24-, 48- und 72-stündiger Lagerung bei 5°C.

Die Zugabe der Ascorbinsäure zu mit Magermilchverdünner verdünntem Sperma hatte einen Schutzeffekt auf die Membranintegrität der Spermien. Ascorbinsäure bewirkte einen signifikanten Anstieg des Anteils an membranintakten Spermien bei einer Lagerung von 48 Stunden. Bei der Kontrolle wurden  $14,8 \pm 2,0\%$ , bei dem Versuchsansatz mit 0,45 g/l Ascorbinsäure  $21,1 \pm 2,0\%$  ( $p < 0,05$ ) und mit 0,9 g/l Ascorbinsäure  $27,5 \pm 2,0\%$  ( $p < 0,05$ ) membranintakte Spermien ermittelt. Bei der Verdünnung des Spermas mit Magermilchverdünner hatte die Zugabe von Ascorbinsäure keinen signifikanten Effekt auf die Vorwärtsbeweglichkeit der Spermien.

Der Prozentsatz membranintakter Spermien wurde ebenfalls bei einer Sperma- verdünnung mit Glycinverdünner durch die Zugabe von Ascorbinsäure erhöht. Nach 24stündiger Lagerung betrug der Anteil membranintakter Spermien  $27,6 \pm 2,9\%$  bei dem Versuchsansatz ohne Ascorbinsäure und bei den Versuchsansätzen mit Ascorbinsäure  $39,3 \pm 2,2\%$  (0,45 g/l Ascorbinsäure;  $p < 0,05$ ), bzw.  $40,3 \pm 2,8\%$  (0,9 g/l Ascorbinsäure;  $p < 0,05$ ). Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien war 24 Stunden nach Spermaverdünnung mit Glycinverdünner in Versuchsansätzen mit 0,9 g/l Ascorbinsäure ( $14,4 \pm 2,8\%$ ) geringer, als in Versuchsansätzen ohne ( $34,0 \pm 3,2\%$ ) und mit 0,45 g/l Ascorbinsäure ( $35,5 \pm 2,9\%$ ).

Der Zusatz von Katalase hatte dagegen keinen positiven Effekt auf Motilität und Membranintegrität der Spermien. Beide Parameter wurden eine Stunde nach der Spermaverdünnung mit Magermilch- oder Glycinverdünner nicht signifikant beeinflusst. Auch nach 48stündiger Lagerung wurde der Anteil membranintakter Spermien durch die Zugabe von Katalase nicht beeinflusst.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß Ascorbinsäure einen Schutzeffekt auf die Membranintegrität der Spermien während der Flüssigkonservierung mit Magermilch- oder Glycinverdünner hat. Dieser Effekt ist mit der Reduzierung der Lipidperoxidation zu erklären. Es ist zu erwarten, daß Ascorbinsäure, neben diesem Laborparameter auch die Befruchtungsfähigkeit der Spermien in vivo erhöht.

## 6. Summary

Ute Schönherr (1996)

Effects of ascorbic acid and catalase on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen.

The aim of this study was to investigate if the antioxidants ascorbic acid and catalase, added to diluted stallion semen, protect spermatozoa against lipid peroxidation and thus preserve semen quality during cold storage. Diluted stallion semen with and without antioxidants added, was stored at 5°C for four days.

A total of seven stallions used for semen collection in an artificial insemination program were included into the study. Semen was collected with an artificial vagina. The gel-free semen was diluted with an equal volume of either skim milk extender or glycin extender. Each extender was used for three different ejaculates from each stallion and mean values for the three replicates from individual animals were calculated.

In a first experiment (experiment A), aliquots of gel-free semen were diluted with skim milk extender either without any substance added (control) or with ascorbic acid added at two different concentrations (0.45 g/l or 0.9 g/l). In a second experiment (experiment B) glycin extender was used instead of skim milk extender and either no antioxidant or 0.45 g/l ascorbic acid or 0.9 g/l ascorbic acid were added. In the third experiment (experiment C) skim milk extender and no antioxidant, with  $0.45 \times 10^6$  I.U./l catalase or with  $1.8 \times 10^6$  I.U./l catalase and in the fourth experiment (experiment D) glycin extender with no antioxidant

or with catalase ( $0.45 \times 10^6$  I.U./l and  $1.8 \times 10^6$  I.U./l after semen dilution) were used.

Carboxyfluorescein diacetate staining was used to assess membrane integrity of spermatozoa. The percentage of progressively motile spermatozoa was estimated by phase contrast microscopy. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa were determined one hour after semen dilution and after storage of the diluted semen for 24, 48 and 72 h at 5°C.

Addition of ascorbic acid to semen diluted with skim milk extender resulted in an increase in the percentage of membrane-intact spermatozoa after semen dilution with skim milk extender. Ascorbic acid significantly increased the percentage of membrane-intact spermatozoa at 48 h after semen dilution. While  $14.8 \pm 2.0\%$  of spermatozoa in control samples were classified as intact,  $21.1 \pm 2.0\%$  of spermatozoa in diluted semen containing 0.45 g/l ascorbic acid ( $p < 0.05$  vs. control) and  $27.5 \pm 2.0\%$  in diluted semen containing 0.9 g/l ascorbic acid ( $p < 0.05$  vs. control and vs. 0.45 g/l ascorbic acid) were classified as membrane-intact. Progressive motility was not significantly affected by addition of ascorbic acid to semen diluted in skim milk extender.

Ascorbic acid also significantly increased the percentage of membrane-intact spermatozoa at 24 h after semen dilution in glycin extender from  $27.6 \pm 2.9\%$  (control) to  $39.3 \pm 2.2\%$  (0.45 g/l ascorbic acid,  $p < 0.05$  vs. control) and  $40.3 \pm 2.8\%$  (0.9 g/l,  $p < 0.05$  vs. control). Progressive motility at 24 h after semen dilution was significantly ( $p < 0.05$ ) lower in samples containing 0.9 g/l ascorbic acid ( $14.5 \pm 2.8\%$ ), than in samples containing extender without ( $34.0 \pm 3.2\%$ ) or with 0.45 g/l ascorbic acid ( $35.5 \pm 2.9\%$ ).

In contrast to ascorbic acid, the antioxidant catalase did not have beneficial effects on sperm motility and membrane integrity. Both parameters were not effected 1 h after dilution of semen samples with either skim milk or glycin extender. After 48 h of chilled storage, the percentage of spermatozoa classified as membrane-intact was also not influenced by catalase, irrespective of the extender used. In semen containing  $0.9 \times 10^6$  I.U./l catalase after dilution, progressive motility was only  $2.6 \pm 1.1\%$  and was significantly ( $p < 0.05$ ) decreased when compared to control samples and samples containing 1.8 I.U./l catalase after dilution ( $11.0 \pm 2.0\%$ ;  $p < 0.05$ ).

It can be concluded that the addition of ascorbic acid to semen diluted either with skim milk extender or with glycin extender significantly improved the percentage of membrane intact equine spermatozoa during cold storage. This can be attributed to a decrease in lipid peroxidation. It can be expected that ascorbic acid not only affects laboratory parameter but also has beneficial effect on the fertilizing capacity of chilled-stored equine semen.