

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Durchführbarkeit der Filtration mit dem Leukozytenadsorptionsmembranfilter Leucosorb® L4 für die Selektion motiler und morphologisch intakter Hengstspermien sowie die Lagerungsfähigkeit und die Eignung dieses Verfahrens zur Tiefgefrierung überprüft. Der Einfluß der unterschiedlichen Methoden auf die Fertilität wurde in einem Besamungsversuch mit 101 Stuten getestet.

In die Untersuchungen gingen 101 Ejakulate von elf in der Frischsamenübertragung eingesetzten Warmbluthengsten ein. Nach der Verdünnung wurden die Ejakulate im split-sample Verfahren der Leucosorb® L4- Membranfiltration und der Zentrifugation ( 700g, 10 Minuten) unterzogen. Die Lagerung erfolgte bei +5° Celsius. Die Bewertung der Motilität erfolgte vor und direkt nach der Aufbereitung wie auch nach 24, 48 und 72 Stunden. Für die Morphologie wurden vor der Aufbereitung und nach 8 sowie nach 30 Stunden Ausstriche mittels der Dual-Stain-Färbemethode angefertigt.

Insgesamt 14 Ejakulate von sieben Hengsten wurden tiefgefroren. Proben aus dem verdünnten Zustand, nach der Filtration bzw. Zentrifugation und direkt nach der Kryokonservierung wurden mittels Carboxyfluoreszin-Diacetat (CFDA) und Propidiumjodid (PI) zur fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Membranintegrität angefärbt. Direkt nach dem Auftauen und zwei Stunden später wurde eine Bewertung der Motilität durchgeführt.

In dem Besamungsversuch wurden insgesamt 57 Stuten mit zentrifugierten Samen (400 Mio. vorwärtsbewegliche Spermien/ Portion) und 44 Stuten mit filtrierten Samen (200 Mio. vorwärtsbewegliche Spermien /Portion) inseminiert. Ausgewertet wurden die Trächtigkeitsquoten je Rosse und der Gesamtbesamungserfolg.

Folgende Ergebnisse sind festzuhalten:

1. Die L4-Membranfiltration und die Zentrifugation steigern im Vergleich zum Ausgangsmaterial die Vorwärtsmotilität und den Anteil an lebenden Samenzellen mit Akrosom signifikant. Die Filtration bewirkt außerdem eine Zunahme der Gesamtmotilität und eine Abnahme der Spermien mit geschädigten Köpfen oder sonstigen Defekten ( $p \leq 0,009$ ).

2. Der Vergleich beider Verfahren ergibt eine eindeutige Überlegenheit der Filtration gegenüber der Zentrifugation in den Bereichen Motilität, Vitalität und Morphologie zu allen gemessenen Zeitpunkten ( $p \leq 0,0218$ ). So ist die Vorwärtsmotilität und Gesamtmotilität und der Anteil an lebenden Spermien nach der Filtration zu jedem Meßzeitpunkt höher als bei der Zentrifugation. Der Anteil der Spermien mit defekten Köpfen, anderen Defekten, wie auch der Anteil an toten Samenzellen ist nach der L4-Membran-Filtration geringer als nach der Zentrifugation. Während bei der Zentrifugation der Anteil der Spermien mit Membranschäden zunahm ( $p=0,0041$ ), sank bei der Filtration dieser Anteil ( $p=0,004$ ). Der exakte Filtrationsmechanismus konnte nicht geklärt werden.

3. Die Rückgewinnungsraten für die vorwärts- und gesamtbeweglichen Spermien sowie für die Gesamtzahl aller Spermien sind bei der Zentrifugation signifikant ( $p=0,0016$ ) höher als bei der Filtration. Als Erklärung für die niedrigen Werte bei der Filtration kommt das fehlende Nachspülen des L4-Filters in Betracht.

4. Die Trächtigkeitsraten in der Stutengruppe, die filtrierte Samen erhielten, liegen mit 69,2 bzw. 80,6% (Hengst A bzw. B) über denen der Kontrollgruppe, die zentrifugierten Samen bekamen (47,6 bzw. 66,6% (Hengst A bzw. B)), obwohl die Besamungsdosis bei der Versuchsgruppe um 50% geringer war.

5. Durch die Kryokonservierung verschlechterten sich bei beiden Verfahren die Werte für Motilität und Morphologie signifikant ( $p=0,0001$ ). Zwischen den Ergebnissen bestand kein statistisch nachweisbarer Unterschied mehr. Möglicherweise war der Gehalt an Glycerin mit 1% zu gering. Das vollständige Belassen des Seminalplasmas bei dem filtrierte Samen hatte keine zusätzlichen Verringerung der Motilität zu Folge. Tendenziell sind die Werte der Motilität und Morphologie für die L4-Membranfiltration besser als für die Zentrifugation.

Der Leukozytenadsorptionsmembranfilter Leucosorb® L4 selektiert aus Hengst-sperma eine hochmotile und morphologisch intakte Samenzellpopulation. Im Rahmen der Frischsamenaufbereitung stellt sich diese Filtrationsmethode als ein praktisch durchführbares Verfahren dar.

Hans Reifenrath

Application of the leucocyte adsorption medium L4 in equine artificial insemination — fresh semen- and cryopreservation.

## 6. SUMMARY

In this study the feasibility of filtrating equine semen to select motile and morphological intact spermatozoa with the leucocyte adsorption membrane filter Leucosorb® L4 and the ability to store and freeze the filtrated semen was tested.

The influence of the different selection methods on fertility was assessed in an insemination trial with 101 mares.

Experiments were carried out with 101 ejaculates from 11 warmblood stallions, which were used for artificial insemination with fresh semen. After dilution the ejaculates were filtrated through the L4 membrane filter and centrifuged in the split-sample procedure. They were stored at +5°Celsius. The motility was evaluated before, immediatly after, as well as 24, 48 and 72 hours after the preparation. Slides for evaluation of the morphology were dual-stained before processing and after 8 and 30 hours.

14 ejaculates from seven stallions were cryopreserved. Before and after filtration as well as centrifugation and after cryopreservation samples were stained with Carboxyfluoresceindiacetate (CFDA) and Propidiumiodid (PI). The membrane integrity was evaluated by fluorescensmicroscopy. Immediatly after thawing and two hours later motility was examined.

Within the insemination trial centrifugated semen (400 Mio. progressive motile spermatozoa / portion) was used for 57 mares and filtrated semen for 44 mares (200 Mio. progressive motile spermatozoa / portion). Pregnancy rates per oestrus and seasonal fertility were analyzed.

The following results were obtained:

1. There was a significant increase in viable sperm with stained acrosome and in progressive motility after L4 membrane filtration and centrifugation. Additionally total motility improved and there were less spermatozoa with damaged heads or other morphological alterations ( $p < 0,009$ ) after filtration.
2. Altogether filtration resulted at all times in better values for motility, viability and morphology than centrifugation ( $p < 0,0218$ ). Progressive motility, total motility and amount of living spermatozoa was higher. Damaged heads and other defects and also the amount of dead spermatozoa were lower after filtration than centrifugation. During centrifugation the amount of spermatozoa with membrane defects increased ( $p = 0,0041$ ). Compared with the results of diluted sperm after filtration the number of membrane defects decreased ( $p = 0,004$ ). The exact filtration mechanism is unknown.
3. After centrifugation the recovery rate of motile and total sperm was significantly higher ( $p = 0,0016$ ) than after filtration. A possible reason for this fact might be that the filter was not rinsed subsequently.
4. Pregnancy rates of the mares inseminated with the filtrated semen were 69,2% (stallion A) and 80,6% (stallion B). Using the centrifugated semen pregnancy rates of 47,6% (A) and 66,6% (B) were obtained. It ought to be emphasized that the insemination dose of progressively motile spermatozoa was twice as high in comparison to the filtrated semen.
5. Cryopreservation had a significantly negative effect on motility and morphology ( $p < 0,0001$ ). Values from L4 membrane filtration were only slightly better than from centrifugation. The concentration of glycerine (1%) in both procedures was probably too low. Leaving the seminal plasma with the filtrated spermatozoa had no additionally negative effect on the motility after thawing.

The leucocyte membrane filter Leucosorb<sup>®</sup> L4 selects spermatozoa with high motility and intact morphology. This method could be applicated in the preparation of fresh semen for artificial insemination in horses.