

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Von 12 Hengsten des Landgestüts Celle wurden jeweils 3 Ejakulate im split-sample-Verfahren einer Glaswollsephadexfiltration und der üblichen Aufbereitung zur Kryokonservierung unterzogen. Zur Verdünnung der Ejakulate wurde Glycin-Verdünner eingesetzt. Das Nachspülen der Säule erfolgte immer zu gleichen Teilen zuerst mit dem Glycinverdünner und danach mit dem MERCK-Lactose-Gefrierverdünner. Aus den verschiedenen Stadien einschließlich des Zustandes nach dem Auftauen wurden Proben hinsichtlich der biologischen Samenqualität untersucht. Dabei erfolgt die Bestimmung der Motilität und Vitalität mit dem Phasenkontrastmikroskop während die Morphologie fluoreszenzmikroskopisch nach Färbung mit Carboxyfluoresceindiacetat und Propidiumjodid dargestellt wurde.

Es konnten folgende Ergebnisse erzielt werden :

- Als Säulen für ein Samenvolumen von 30 ml geeignet ist eine 50ml-Einwegspritze gefüllt mit 15 ml Glaswolle und 25 ml 20%igem Sephadexgel. Auf das Einfüllen der Glaswolle folgte eine Spülung mit 15 ml EDTA-Verdünner. Nachdem der Samen in die Säule eingedrungen war, wurde bei allen Versuchen zunächst mit 7,5 ml Glycin- und direkt danach mit 7,5 ml Gefrierverdünner gespült.
- Die durch Glaswollsephadexfiltration selektierte Population ist vor dem Einfrieren der verdünnten oder zentrifugierten signifikant überlegen. Für den praktischen Einsatz in der Frischsamenübertragung ist sie eine Alternative, wobei die niedrigere Dichte des Filtrats berücksichtigt werden muß.
- Die fluoreszenzmikroskopischen Farbstoffe Carboxyfluoresceindiacetat und Propidiumjodid eignen sich sehr gut zur differenzierten Beurteilung von Membranschäden. Darüberhinaus wurde eine hochsignifikante Korrelation mit den Motilitätsergebnissen ermittelt.

- Das filtrierte Sperma übersteht den Tiefgefrierprozeß mit erheblichen Schäden, so daß der Selektionsvorteil aufgehoben ist. Als Ursache wird die Retention des Seminalplasmas im Filtrat diskutiert.
- Eine an die Filtration sich anschließende Zentrifugation führt zu verbesserten Resultaten nach dem Auftauen. Insofern scheint die Zentrifugation bisher bei der Tiefgefrierkonservierung von schlechtkonzentrierten Ejakulaten des Hengstes unverzichtbar.

Ina Spreckels

Examinations concerning glass-wool-sephadex-filtration to select stallion spermatozoa including cryopreservation

## 7. SUMMARY

Using 36 ejaculates of 12 stallions the glass-wool-sephadex-filtration and the common preparation for cryopreservation was examined comparatively.

After diluting the ejaculates with glycin-extender the semen was filtrated. Post-washing was carried out in equal parts (7,5 ml) with glycin- and the MERCK-Lactose-extender. Specimens were taken in every stage of the preservation and after 48 hours at 5°C. Motility (estimations) and plasma membrane integrity (Carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide staining) served as test parameters.

The following results were obtained :

- A column for volumes of 30 ml equine semen has been developed consisting of a 50 ml one-way-syringe with 15 ml glasswool and 25 ml sephadex gel. The glasswool has been washed with 15 ml of EDTA-extender before adding the 20% sephadex gel.
- The glass-wool-sephadex-filtration leads to a statistically significant increase in the percentage of progressive and total motility of viable spermatozoa with better morphological appearance.
- The recovery rate has been 73.4% for progressively motile spermatozoa and 61.1% for all spermatozoa. Diluted and centrifugated semen has shown lower motility and worse morphological appearance. So the glass-wool-sephadex-filtration could be used in the common preservation of fresh semen to try to improve pregnancy results.

- The fluorescence stainings allow to evaluate the integrity of the different membranes. Also a highly significant correlation was seen between the results of fluorescence stainings and the subjective estimates of motility.
- After cryopreservation the filtrated semen has lost its advantage compared to a centrifugated, a centrifugated and diluted and to a filtrated and then centrifugated specimen after thawing. As a reason it has been suggested that the seminal plasma stays in the filtrate and leads to worse results.
- Centrifugation of the filtrate before cryopreservation increases the results after thawing regarding to the filtrate. But it is not recommended because of the membrane defects following the centrifugation and the time and work necessary to do it. Nevertheless centrifugation seems to be necessary for cryopreservation of low concentrated ejaculates.