

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Routineverfahren (Verdünnung, Zentrifugation) mit spermienselektiven Aufbereitungsverfahren (Glaswollsephadex-GWS-, Leukosorb<sup>®</sup>-Filtration) hinsichtlich ihrer Eignung bei der Flüssig- und Tiefgefriersamenkonservierung equiner Ejakulate überprüft. Im split-sample-Verfahren wurden jeweils 3 Ejakulate von 8 Warmbluthengsten in die Untersuchungen einbezogen.

Zunächst wurden Vorversuche zur Optimierung der Filtrationstechniken, zur Ermittlung der osmotischen Belastung mittels Glycerol und Färbungen zur Prüfung des Einflusses von Suspensionsmedien auf den Kapazitionszustand der Spermien durchgeführt.

Die Motilität wurde mikroskopisch im Nativ-, aufbereiteten Samen inklusive Halteproben (24h, 48h, +5 °C.) und aufgetautem Samen geschätzt.

Die Membranintegrität wurde mittels kombinierter Carboxyfluoresceindiacetat-(CFDA) Propidiumiodid- (PI)-Färbung überprüft. Zur Beurteilung des Kapazitionszustandes fand die Chlortetracyclin-(CTC)-Färbung Anwendung.

Zur Bestimmung des Zellvolumens wurde ein formunabhängiges Meßsystem basierend auf einer elektronischen Volumenanalyse eingesetzt (Cell-Analyzer-CASY1-System).

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Bei der GWS-Filtration bestand der optimale Versuchsaufbau aus 1,5g Glaswolle zu 20 ml 20 %-iges Sephadex-G15-Gel in einem 50 ml Spritzenkörper. Bei der Leukosorb-Filtration wurden 7 Leukosorb-Typ B Filterscheiben eingesetzt.
2. Eine osmotische Belastung der Spermien durch Glycerol wird von Spermienpopulationen mit guter Motilität signifikant besser kompensiert als bei schlechter Ausgangsmotilität.
3. Der Zusatz unterschiedlicher Suspensionsmedien führte zu prägnanten Veränderungen des Kapazitionszustandes ( $p > 0,01$ ). Mögliche Ursachen werden diskutiert.

4. Verdünnung und Filtration des Samens führten zu einer statistisch bedeutsamen Verbesserung der Motilität im Vergleich zum Nativsamens; während nach Zentrifugation die Motilität beeinträchtigt war.
5. Bei Langzeitlagerung erwies sich der filtrierte Samen den anderen Verfahren gegenüber als deutlich überlegen.
6. Die vergleichsweise größten Rückgewinnungsraten wurden durch Zentrifugation des Samens erreicht.
7. Filtrierte Spermienpopulationen sind volumetrisch durch ein kleines mittleres Volumen in isotonen Lösungen charakterisiert.
8. Der Quotient aus mittlerem hypotonem zum mittlerem isotonem Zellvolumen, sowie der Quotient aus hypotonem zu isotonem Maximum der gemessenen Verteilungskurve, unterscheidet sich signifikant zwischen filtrierte zu zentrifugiertem Samen. Filtrierte Spermien verfügen somit über bessere volumenregulatorische Eigenschaften.
9. Nach der Kryokonservierung konnte der Selektionsvorteil der filtrierten Spermienpopulationen hinsichtlich der Auftaumotilität erstmalig erhalten werden ( $p < 0,001$ ).
10. Verfahrensunterschiede konnten bei der Kryokonservierung durch Fluoreszenzfärbungen nicht dargestellt werden.

Gunilla Martinsson

Morpho-functional and volumetric characterisation of stallion sperm prepared in different ways.

## 7. SUMMARY

In the context of this study, routine procedures (dilution, centrifugation) were checked with sperm-selective preparation procedures (glass woll sephadex- GWS Leukosorb<sup>®</sup> filtration) with regard to their suitability for the liquid and deep-frozen semen preservation of equine ejaculates. In the split-sample procedure, 3 ejaculates from each of 8 warmblood stallions were included in the study.

First, preliminary trials were carried out to optimise filtration techniques, to determine the osmotic change using glycerol and staining to test the effect of suspension media on the capacitation state of the sperm.

Motility was estimated microscopically in the native prepared semen inclusive of control sampels (24h, 48h, +5 °C) and thawed semen.

Membrane integrity was checked by combined carboxyfluoresceindiacetate-(CFDA) propidiumiodide-(PI) staining. Chlortetracycline (CTC) staining was used to evaluate the capacitation state. A shape-independent measuring system based on elektronik volume analysis was used (Cell Analyser CASY 1 System ) to determine cell volume.

The following results were obtained:

1. With GWS filtration, the optimum test arrangement was 1,5 g glass wool to 20 ml 20% Sephadex G15<sup>®</sup> gel in a 50 ml syringe. With Leukosorb<sup>®</sup> filtration, 7 Leukosorb type B filter discs were used.
2. An osmotic sperm charge using glycerol is significantly better compensated by sperm populations which good motility than those with poor initial motility.
3. The addition of different suspension media led to significant changes of capacitation state ( $p > 0,01$ ). Possible causes are under discussion.

4. Semen dilution and filtration led to a statistically significant improvement in motility in comparison with native semen, whereas after centrifugation motility was impaired.
5. Following long-term storage, the filtered semen proved to be clearly superior in comparison with other procedures.
6. The comparatively highest recovery rates were obtained by centrifugation of the semen.
7. Filtered sperm populations are characterised in terms of volume by a low average volume in isotonic solutions.
8. The quotient from average hypotonic to average isotonic cell volume, and the quotient from hypotonic to isotonic maximum of the distribution curve measured differs significantly between the filtered and the centrifuged semen, with filtered sperm therefore having better volumeregulation properties.
9. Following cryo-preservation, it was possible for the first time to maintain the selection advantage of the filtered sperm populations with regard to thawing motility ( $p < 0,001$ ).
10. No procedural differences in cryo-preservation could be identified by fluorescence staining.