

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

---

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Anwendung von Polyesterkapillarporenmembranen, sowie die Anwendung von Crossflow Filtrationsmodulen in der Frischsamenkonservierung equiner Spermatozoen geprüft werden. Eingesetzt wurden Polyesterkapillarporenmembranen (Thomapore<sup>®</sup>) verschiedener Porengrößen (1µm, 2µm, 3µm, 5µm) und Crossflow-Module (XAMPLER<sup>®</sup>, Modul 1, Modul 2), wobei letztere sich hinsichtlich ihrer Filtrationsfläche unterschieden.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war der bisher nicht verfolgte Ansatz, durch die genannten Separationsverfahren über eine selektive, quantitative Reduktion des Seminalplasmaanteils eine Konzentrierung des biologischen Ausgangsmaterials bei Erhalt ihrer Vitalität und Befruchtungskompetenz zu erzielen.

In den Untersuchungen wurden 47 Ejakulate von 37 Hengsten verwendet, hierbei wurden 30 Warmblut- und 7 Vollbluthengste eingesetzt. Die Datenerfassung erfolgte innerhalb von sechs aufeinander aufbauenden Abschnitten.

Die Verfahren wurden mit in praxi etablierten Aufbereitungsverfahren wie der Zentrifugation und der Verdünnung von Ejakulaten (1:1, 1:3, 1:6, 1:9), sowie der Leukosorb<sup>®</sup>-Filtration verglichen.

Als Parameter der Untersuchung gingen die Motilitätsschätzung (phasenkontrastmikroskopisch), die Rückgewinnungsraten nach Verfahrensdurchführung, sowie fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Spermienmorphologie in die Untersuchungen ein. Zur Beurteilung der Membranintegrität wurde eine kombinierte Carboxyfluoreszeindiazetat-Propidiumiodid-Färbung (CFDA-PI) eingesetzt. Der Kapazitationszustand wurde mittels der Chlortetracyclin-Färbung (CTC) beurteilt.

Es konnte festgestellt werden, daß mit Hilfe der Crossflow-Filtration eine, den praktischen Anforderungen entsprechende, Volumenreduktion des Ausgangsmaterials zu erzielen war.

Der Erfolg der Methode war dabei umgekehrt proportional abhängig von der Filtrationsdauer, welche über die Größe des Filtrationsmoduls und die eingesetzten Volumina beeinflusst werden konnte. Die Konzentrierung des Ejakulates ging, abhängig von der mechanischen Belastung, mit einer Vitalitätssteigerung einher.

Bei der Kapillarporenmembran-Filtration erwies sich die Vakuum- im Vergleich zur Druckfiltration als praktikablere Methode. Die erwünschte Volumenreduktion war infolge Stagnation des Filtrationsflusses nicht immer erreichbar. Die Verwendung von 2µm- und 3µm-Membranen erwies sich als signifikant den vergleichend getesteten Membranen (1µm, 5µm) überlegen.

Eine Vitalitätssteigerung konnte durch Leukosorb®-Filtration in Abhängigkeit vom eingesetzten Volumen und durch hohe Verdünnungsstufen erreicht werden. Im Vergleich zur Zentrifugation konnten durch hohe Ausverdünnung der Ejakulate, Leukosorb®-Filtration, Polyesterkapillarporenmembranen (3µm) und durch den Einsatz der Crossflow-Filtration (Modul 2) höhere Motilitätsraten erzielt werden.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Samenzellen ließ erkennen, daß jede Form der Aufbereitung eine signifikante Zunahme morphologischer Veränderungen an den Samenzellen nach sich zog. Nach Verdünnung kam es im Vergleich zu den Separationsverfahren und der Zentrifugation zu geringeren Veränderungen der Spermienintegrität. Innerhalb der geprüften Separationsverfahren und der Zentrifugation zeichnete sich eine signifikante Überlegenheit ausgewählter Porengrößen der Polyesterkapillarporenmembranen (2µm, 3µm) und der Crossflow-Filtration (Modul 2) hinsichtlich des Erhalts des akrosomalen Zustands gegenüber der Zentrifugation und der Leukosorb®-Filtration ab.

Hinsichtlich der Rückgewinnungsraten konnten durch ausgewählte Porengrößen der Polyesterkapillarporenmembranen (1µm, 2µm, 3µm), sowie in einem Fall durch Leukosorb®-Filtration eine der Zentrifugation entsprechende Konzentrierung der Ejakulate erzielt werden. Die Crossflow-Filtration zeichnete sich durch einen nahezu spermienverlustfreien Selektionsmechanismus aus.

## SUMMARY

---

Linke Voß

Reduction of seminal plasma by new separation techniques -  
polyestercapillareporemembranes, crossflow-filtration -  
in liquid semen preservation of equine spermatozoa

In the present study the use of polyestercapillarepore-membranes, as also crossflow-filtration technique was tested in liquid preservation of stallion semen. The used polyestercapillarepore-membranes (Thomapore<sup>®</sup>) differed in their porosity (1µm, 2µm, 3µm, 5µm). Crossflow-filtration systems (Xampler<sup>®</sup> Modul 1, Modul 2) were distinguished by the different size of their filtration area.

The main object was to check if a selective and quantitative reduction of seminal plasma with no detrimental effect on vitality and fertilizing capacity of spermatozoa by using these new separation-techniques is possible.

In total 47 ejaculates of 37 stallions, 30 Warmblood and 7 Thoroughbred stallions were included into the experiments. This study was split into six trials.

Results of experiments were compared to centrifugation different dilution rates (1:1, 1:3, 1:6, 1:9) and the Leukosorb<sup>®</sup>-filtration technique.

Criteria for evaluation were subjective estimation of sperm motility and recovery rates. Membrane integrity was checked by combined carboxyfluorescein diacetate- (CFDA) propidium iodide (PI) staining. For evaluation of sperm capacitation status chlortetracycline-staining (CTC) was used.

The following findings were observed: crossflow-filtration techniques enable a practical reduction of volume of the samples. Volume of samples as also the size of the filtration area influenced the success of this technique. Depending on mechanic charge during the filtration process further concentration of the semen samples caused an increase of vitality.

Using the capillareporemembranes it was needed to force the filtration by vacuum or pressure. It was found that the use of vacuum was technically easier to carry out.

Nevertheless due to stagnation of the filtration flux reduction of the volume varied. Use of 2 $\mu$ m- and 3 $\mu$ m- membranes showed significant better results in comparison to 1 $\mu$ m- and 5 $\mu$ m-membranes.

Aliquots of high dilution ratios, as also Leukosorb<sup>®</sup>-Filtration (depending on the used volume) increased sperm vitality. Compared to centrifugation an increase of motility was ascertained by using polyester-capillary-pore-membranes (3 $\mu$ m), crossflow-filtration (Modul 2), Leukosorb<sup>®</sup>-Filtration and highly diluted semen samples.

One of the main results of this study was that every mode of processing of semen resulted in a significant increase of damage on sperm membranes integrity. It was obvious that dilution of spermatozoa caused less damage on membrane integrity as centrifugation or the other separation techniques. Compared to centrifugation and Leukosorb<sup>®</sup>-filtration significant less acrosomal damage was caused by use of polyester-capillary-pore-membranes (2 $\mu$ m, 3 $\mu$ m) as also using crossflow-filtration (Modul 2).

Recovery rates of centrifugated samples were equal to polyester-capillary-pore-membranes (1 $\mu$ m, 2 $\mu$ m, 3 $\mu$ m) and in one case Leukosorb<sup>®</sup>-filtration technique. Crossflow-filtration technique enables recovery of nearly all the input of spermatozoa by its specially selective filtration mechanism.