

# Anwendung der L4-Membranfiltration in der Frischsamenübertragung beim Pferd

H. Reifenrath\*, H. Sieme\*\* und E. Klug\*

\* Klinik für Pferde, Tierärztliche Hochschule Hannover

\*\* Niedersächsisches Landgestüt Celle

## Zusammenfassung

Anhand von 101 Hengstejakulaten von 11 Warmbluthengsten wurde die Eignung des Leukozytenadsorptionsfilter Leucosorb L4 zur Selektion einer hochmotilen und vitalen Spermienpopulation geprüft. In einem angeschlossenen orientierenden Besamungsversuch wurde die Befruchtungsfähigkeit von filtiertem und zentrifugiertem Samen verglichen.

Spermien, die durch die Filtration selektiert wurden, erwiesen sich gegenüber zentrifugiertem Samen in bezug auf Motilität, Morphologie, Vitalität und Befruchtungsfähigkeit als überlegen.

**Schlüsselwörter:** Hengste, Samenaufbereitung, Filtration, Zentrifugation, L4-Leukozytenadsorptionsfilter

## The use of L 4 membrane filter in filtrating equine semen

In this study the feasibility of filtrating equine semen to select motile and morphological intact spermatozoa with the leucocyte adsorption membrane filter Leucosorb L4 was tested by 101 ejaculates from 11 warmblood stallions. The results were compared with these of centrifugation.

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.

Before and after filtration as well as centrifugation samples were stained with Carboxyfluoresceindiacetate (CFDA) and Propidiumiodid (PI). The membrane integrity was evaluated by fluorescensmicroscopy.

The influence of the different selection methods on fertility was assessed in an insemination trial. Within these 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 immediatly 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.
- Altogether the leucocyte Leucosorb® membrane filter L4 filtration resulted at all times in better values for motility, morphology, viability and fertility. This method could be applicated in the preparation of fresh semen for artificial insemination in horses.

**Keywords:** stallion, semen preparation, filtration, centrifugation, L4-Leucozyte membrane filter

## Einleitung

In der equinen Frischsamenübertragung ist man aus technologischen und ökonomischen Gründen bestrebt, eine möglichst vitale und befruchtungsfähige Samenzellpopulation in hoher Konzentration in einem oder aus einem Ejakulat zu erhalten. Dazu wurden in den letzten Jahren verschiedene Laborverfahren wie etwa die Glas-

woll-(Sephadex-)Filtration, Percoll®-Filtration, Dichtegradienten-Zentrifugation, Swim-Up oder Swim-Down Verfahren, deren Ursprung in der In-vitro-Fertilisation der Humanmedizin liegen, auf ihre Eignung für equinen Samen untersucht (Übersicht WALTER 1992). Neben der fraktionierten Samenentnahme (KNEISSL 1993), bei der die spermienreiche Phase von der spermienarmen bereits bei der Gewinnung getrennt wird, konnte sich bis-

lang jedoch nur die Zentrifugation durchsetzen, da die o.g. Aufbereitungsverfahren entweder für die sehr empfindlichen Hengstspemien ungeeignet sind oder aufgrund mangelnder Effektivität ein praktischer Einsatz in der Samenübertragung beim Pferd bisher auszuschließen ist.

Ein neues Verfahren, welches ebenfalls aus der Humanmedizin stammt, wird von AGARWAL et al. (1991) beschrieben. Sie erhielten aus Samen subfertiler Männer durch die Filtration mit dem Leukozytenadsorptionsfilter LeucosorbL4® eine hochmotile, morphologisch intakte Spermienpopulation, die weitgehend frei von Zelldetritus und Leukozyten war.

### Eigene Untersuchungen Material und Methode

Von elf in der Frischsamenübertragung eingesetzten Warmbluthengsten wurden insgesamt 101 Ejakulate (Vol.: 20-120ml) im split-sample Verfahren der Filtration bzw. der Zentrifugation unterzogen und über einen Zeitraum von 72 Stunden die Morphologie und die Motilität der Spermien untersucht. Die Filtration erfolgte durch zwei übereinandergelegte Scheiben des Membranfilters Leucosorb L4(Fa. Pall GmbH, Dreieich, Best.Nr. RD 196031). Dieser etwa zwei Millimeter starke Filter besteht aus einer Trägerkonstruktion, die mit einem faserförmigen Polyestermedium beschichtet ist. Originäre Anwendung findet dieser Filter im Bereich der Hämatologie und Onkologie der Humanmedizin. Die Oberflächeneigenschaften des faserförmigen Polyestermediums sind für die Abscheidung von Leukozyten optimiert (>99% werden zurückgehalten), andere Blutbestandteile können den Filter passieren.

In eine 60ml Einmalspritze (Fa. Becton-Dickinson, Plastikpak, Innendurchmesser 26mm) wurden zwei L4-Filter-scheiben (27mm) unmittelbar übereinander eingelegt. Als stabilisierende Unterlage diente eine perforierte Kunststoffscheibe (siehe Abb. 1). Die erste Hälfte des mit Magermilchverdünner (KENNEY et al. 1975) im Verhältnis 1:1 versetzten Samens wurde langsam durch den Filter gedrückt, wobei mit dem Spritzenkolben der Druck manuell so geregelt wurde, daß die Filtrationsrate 10ml/Minute (3 Tropfen/ Sekunde) betrug. Das Seminalplasma verblieb dabei vollständig in der Probe.

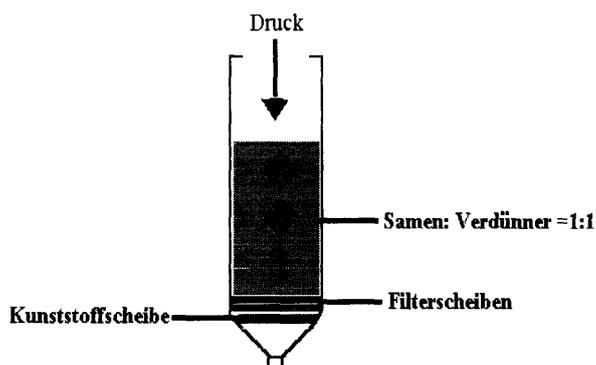


Abb. 1 Filtrationsaufbau

Die andere Hälfte des verdünnten Spermas wurde 10 Minuten mit 700g zentrifugiert; der Überstand, und somit ein Großteil des Seminalplasmas, dekantiert und verworfen. Das Zentrifugat (Samenpellet) wurde mittels Rüttler (Modell KS 10, Fa. E. Bühler, Tübingen) resuspendiert und mit Magermilchverdünner auf eine Samenzelldichte von 400 Millionen progressiv motile Spermien pro zehn Milliliter eingestellt.

Die anschließende Lagerung der so aufbereiteten Samenfraktionen erfolgte bei 5°Celsius.

Die Ermittlung der Motilität erfolgte durch phasenkontrastmikroskopische Schätzung und geschah unmittelbar vor und nach der Aufbereitung sowie nach 24, 48 und 72 Stunden. Der Vergleich dieses Schätzverfahrens mit einer computervideographischen Messung an equinen Sperma weist eine sehr hohe Korrelation ( $p < 0,001$ ) der beiden Methoden auf, so daß nach wie vor die visuelle Schätzung eine probate Beurteilungsmöglichkeit der Motilität darstellt (RÖBBELEN, 1993). Zur Beurteilung der Morphologie wurde das von WALTER (1992) modifizierte Dual-Stain Verfahren angewandt. An einem Teil der Samenproben ( $n = 14$ ) wurde mittels einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung mit Carboxyfluoreszindiacetat (CFDA) bzw. Propidiumiodid (PI) die Membranintegrität bzw. Vitalität überprüft (Technik siehe KNEISSL 1993).

Für den orientierenden Besamungsversuch wurden 101 gesunde, zuchtaktive Stuten, die zwei ausgesuchten Hengsten zugeführt wurden, in zwei zufällige Gruppen geteilt und mit zentrifugiertem Sperma (400 Mio. progressiv motile Spermien/ 10 ml Besamungsportion) oder mit filtriertem Samen (200 Mio. progressiv motile Spermien/ 20ml Besamungsportion) ggf. in einem Intervall von 48 Stunden besamt. Ausgewertet wurde das Ergebnis von maximal drei Rossen. Die Trächtigkeitsuntersuchungen wurden durch betreuende Tierärzte zwischen den 17. und 25. Tag der Gravidität durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SAS®-Software.

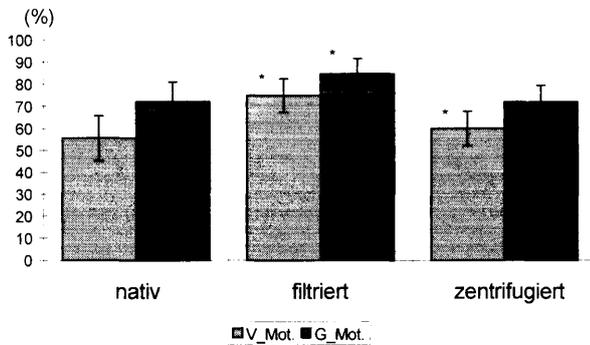
Für den Vergleich der Verfahren untereinander fand eine zweifaktorielle Varianzanalyse für Versuche mit Meßwiederholungen (F- Test mit Korrektur nach Greenhouse und Geisser) Anwendung. Innerhalb der Verfahren wurde der gepaarte T-Test für abhängige Stichproben verwendet.

Die Korrelationsanalysen wurden unter Verwendung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman durchgeführt (Rangkorrelation für nicht normal verteilte Werte). Hierbei handelt es sich um ein Nicht-Parametrisches Verfahren.

Es wurden folgende Korrelationen berechnet:

1. Analyseparameter der Ausgangsproben zu den Parametern der selektierten Samenzellpopulationen
2. Parameter der Ausgangsproben zu den Rückgewinnungsraten der selektierten Populationen.

Für die Beurteilung der Befruchtungsraten wurde der Chi-Quadrat-Homogenitätstest unter Verwendung des Fischer's Exact Tests angewendet. Bei der Bestimmung



**Abb. 2:** Vorwärts(V)- und Gesamtmotilität(G) vor und unmittelbar nach Aufbereitung  
\*-signifikante Differenz zwischen nativem und aufbereitetem Samen, ( $p \leq 0,05$ )

dieser Raten gingen nur Stuten in die Berechnung ein, die nachweislich auf Trächtigkeit untersucht worden waren.

## Ergebnisse

Folgende statistisch abgesicherte Resultate ( $p \leq 5\%$ ;  $\pm$  SD) wurden erzielt:

- Die L4-Membranfiltration und die Zentrifugation steigern im Vergleich zum Ausgangsmaterial den Anteil der vorwärtsmotilen als auch den Anteil an lebenden Samenzellen mit Akrosom signifikant (Tab.1u. Abb.2). Die Filtration bewirkt außerdem eine Zunahme des Anteils der motilen Samenzellen und eine Abnahme der Spermien mit Kopfkappendefekten oder sonstigen Defekten. Gegenüber dem nativen Sperma stieg durch die Zentrifugation jedoch der Anteil an Samenzellen mit sublichtmikroskopischen Membrandefekten. Im Gegensatz dazu verringerte sich diese Fraktion deutlich durch die Filtration (Tab.1).
- Der Vergleich beider Verfahren ergibt eine eindeutige Überlegenheit der Filtration mit dem Leucosorb® L4-Membranfilter gegenüber der Zentrifugation in den Bereichen Motilität, Vitalität und Morphologie zu allen gemessenen Zeitpunkten. In den Merkmalen Kopfddefekte und der Summe aller Defekte weist die Filtration einen geringeren Anteil an geschädigten Samenzellen auf (Tab. 2 & 3).
- Die Rückgewinnungsraten für die vorwärts- und gesamtbeweglichen Spermien sowie für die Gesamtzahl aller Spermien unterscheiden sich signifikant ( $p \leq 0,0016$ ). Mit Hilfe der Zentrifugation konnten 20-30% Spermien mehr als mit der Filtration zurückgewonnen werden (Tab. 4). Dabei besteht zwischen den Rückgewinnungsraten und dem eingesetzten Volumen eine positive Korrelation ( $r = 0,43$ ).
- In dem orientierenden Besamungsversuch mit zwei Hengsten lagen die Trächtigkeitsraten in den Stutengruppen, die filtrierten Samen erhielten, über denen der Kontrollgruppe, die zentrifugierten Samen bekamen. Dabei war die Anzahl der Spermien je Besamungsdosis bei der Versuchsgruppe um 50% geringer als bei der Kontrollgruppe (Tab. 5)

Merkmal (in%)	nativ	L4-Membranfilter	Zentrifuge
Vorwärtsmotilität	55,5 ± 10,14	74,9 ± 7,48*	59,9 ± 8,03*
Gesamtmotilität	72,1 ± 8,81	84,6 ± 6,87*	71,9 ± 7,59
Kopfkappendefekte	3,87 ± 2,7	1,80 ± 0,9*	3,67 ± 2,7
Kopfddefekte	1,12 ± 0,7	0,82 ± 0,9	1,13 ± 0,7
Halsdefekte	5,85 ± 3,1	4,78 ± 2,7	3,82 ± 1,9*
Verbindungsstückdefekte	2,93 ± 2,7	1,46 ± 1,2	2,64 ± 1,84
Haupt-u. Endstückdefekte	8,73 ± 5,5	5,04 ± 4,1*	12,77 ± 9,8
Doppelmißbildungen	0,10 ± 0,2	0,12 ± 0,3	0,21 ± 0,3
Σ defekte Spermien	22,6 ± 11,2	14,0 ± 7,3*	24,2 ± 14,0
lebend mit Akrosom	73,8 ± 24,7	78,4 ± 26,0*	75,6 ± 25,5*
lebend ohne Akrosom	0,9 ± 0,6	0,2 ± 0,2	0,9 ± 0,99
tot mit Akrosom	9,3 ± 4,8	7,1 ± 3,9	10,1 ± 4,6
tot ohne Akrosom	2,7 ± 2,1	1,2 ± 0,6	2,4 ± 1,4
Membran intakt (CFDA)	58,7 ± 12,3	72,4 ± 15,16*	50,4 ± 10,73*
lebende Spermien (PI)	66,4 ± 13,6	78,7 ± 12,64*	53,1 ± 17,37*

**Tab. 1:** Motilität und morphologische Merkmale vor und unmittelbar nach Aufbereitung  
\*-signifikante Differenz zwischen nativem und aufbereitetem Samen ( $p \leq 0,05$ )  
Motility and morphology before and immediately after preparation  
\*significant difference between native and prepared semen, ( $p \leq 0,05$ )

Im Verfahrensvergleich wurden bei Auswertung aller bekannten Besamungsergebnisse mit filtriertem Samen der Hengste A und B insgesamt 34 von 40 Stuten (85,0%) tragend, mit dem zentrifugiertem Samen 34 von 52 Stuten tragend (65,4%). Die Irrtumswahrscheinlichkeit hierfür beträgt  $p = 0,027$ . Verkaufte oder eingegangene Stuten sowie Tiere, bei denen aus anderen Gründen kein Ergebnis zu ermitteln war ( $\Sigma$  9 Stuten), bleiben hierbei unberücksichtigt.

Verfahren	Merkmal (%)	0 h*	24h*	48h*	72h*
Filtration	Vorwärtsmotilität	74,9 ± 7,5	59,4 ± 14,9	45,9 ± 16,9	29,4 ± 9,8
	Gesamtmotilität	84,6 ± 6,9	74,8 ± 9,7	62,0 ± 14,0	47,4 ± 11,5
Zentrifugation	Vorwärtsmotilität	59,9 ± 8,0	45,4 ± 20,4	36,3 ± 19,7	25,9 ± 16,4
	Gesamtmotilität	71,9 ± 7,6	60,6 ± 17,2	52,2 ± 19,1	38,7 ± 17,9

**Tab. 2:** Vorwärts(V)- und Gesamtmotilität(G) unmittelbar nach Aufbereitung(t0) nach 24(t1), 48(t2) und 72(t3) Stunden  
\*-signifikanter Verfahrensunterschied zu allen Zeitpunkten

Progressive(V) and total(G) motility immediately after preparation(t0), after 24(t1), 48(t2) and 72(t3) hours.

\*-significant differences between both methods at all times

## Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Leucosorb® L4-Membranfiltration als ein neues Verfahren zur Selektion motiler und morphologisch intakter Spermienpopulationen auf seine Anwendbarkeit bei Hengstesperma zu überprüfen und die Ergebnisse mit denen der Zentrifugation zu vergleichen. Anhand eines orientierenden Besamungsversuches wurde der Einfluß beider Verfahren auf die Fertilität überprüft.

Gegenüber anderen untersuchten Selektionsverfahren

Merkmals	Verfahren	m1	m2
defekte Sperm.(%)	Filter Zentrifuge	14,0 ± 7,27 24,2 ± 14,01	16,4 ± 8,2 27,6 ± 15,48
ΣKopffdefekte (%)	Filter Zentrifuge	2,6 ± 1,43 4,8 ± 2,79	2,8 ± 2,00 4,6 ± 2,40
lebend mit Akrosom(%)	Filter Zentrifuge	78,4 ± 26,05 75,6 ± 25,44	77,5 ± 26,1 73,3 ± 24,8
lebend ohne Akrosom(%)	Filter Zentrifuge	0,2 ± 0,21 0,9 ± 0,99	0,4 ± 0,45 0,9 ± 0,71
tot m. Akrosom(%)	Filter Zentrifuge	7,1 ± 3,97 8,0 ± 3,54	7,7 ± 4,29 10,1 ± 4,57
tot o. Akrosom(%)	Filter Zentrifuge	1,2 ± 0,65 2,4 ± 1,42	1,3 ± 1,04 2,6 ± 1,65

**Tab. 3:** Morphologische Merkmale 8 (m1) und 30 (m2) Stunden nach Aufbereitung

Morphology 8 (m1) and 30 (m2) hours after preparation

Verfahren	RGR V*	RGR B*	RGR G*
Filtration	51,24 ± 13,49%	58,98 ± 12,6%	43,01 ± 13,75%
Zentrifugation	72,89 ± 9,89%	78,70 ± 8,21%	72,15 ± 6,59%

**Tab. 4:** Rückgewinnungsraten (in R) an vorwärtsmotilen ((RGRV), an motilen (RGR B)) und der Gesamtzahl aller Spermien (RGRG)) nach Zentrifugation und Filtration  
\*-signifikanter Verfahrensunterschied, ( $p \leq 0,05$ )

Recovery rates (in %) of progressive motile (RGRV), motile (RGRB) and total sperm number (RGRG) after preparation  
\*significant difference between preparation methods, ( $p \leq 0,05$ )

Verfahren	L4-Membranfiltration		Zentrifugation	
	Hengst A	Hengst B	Hengst A	Hengst B
Stutenanzahl	13	31	21	36
tragend (pregnant)	9 (69,2%)	25 (80,6%)	10 (47,6%)	24 (66,6%)
nicht tragend	4 (30,8%)	2 (6,5%)	10 (47,6%)	8 (22,2%)
unbekannt (unknown)	0	4 (12,9%)	1 (4,8%)	4 (11,1%)

**Tab. 5:** Trächtigkeitsraten des Besamungsversuches zweier Hengste (A,B)

Pregnancy rates of insemination trial by two stallions (A,B)

zeichnet sich die L4-Membran Filtration durch den geringen Arbeitsaufwand beim Aufbau, durch die außerordentlich einfache Handhabung und besonders durch die Schnelligkeit der Filtration aus (z.B. 30ml in 3 Minuten). Bei der Glaswoll-Sephadex Filtration dauert dieser Vorgang etwa 20 Minuten (SPRECKELS, 1994). Ebenso lange dauert das Zentrifugieren und Resuspendieren einer Samenprobe. Das Swim-Up Verfahren braucht, mit entsprechender Vorbereitung über eine Stunde (PARRISH u. FOOTE 1987; KRÖGER 1991). Auch größere Hengstsamenvolumina (max. 120ml verdünnter Samen) konnten effizient filtriert werden. Somit ist die Praktikabilität eines der herausragenden Merkmale der L4-Membran Filtration.

Eine sinnvolle Modifikation des Versuchsaufbaues wäre,

mittels Unterdruck den Samen zu filtrieren, um das oben offene System nachzuspülen zu können. Möglicherweise könnten so die Rückgewinnungsraten, die bei der Filtration um 20%-30% niedriger als bei der Vergleichsmethode waren, gesteigert werden. Bei dem verwendeten Aufbau ist ein Nachspülen des Filters nicht möglich, da sich beim Herausziehen des Spritzenstempels die Filterscheiben von deren Unterlage lösen. In einer neueren Arbeit, die mit der hier vorgestellten Technik und dem Nachfolgemodell des L4-Leukozytenadsorptionsfilters, dem Leucosorb Typ B® durchgeführt wurde, konnten etwa zehn Prozent höhere Rückgewinnungsraten (53%) erzielt werden (MARTINSSON 1995).

In den Bereichen Motilität, Vitalität und Morphologie war die durch L4-Filtration selektierte Samenzellpopulation der durch Zentrifugation gewonnenen zu jedem gemessenen Zeitpunkt signifikant überlegen. Dieses zeigt, daß die Aussage verschiedener Autoren, wonach eine Reduzierung des Seminalplasmas einer verlängerten Lagerungsfähigkeit gleichkommt zu pauschal gefaßt ist (PIK-KETT et al. 1975; AHLEMEYER 1991; JASKO et al. 1992). Vielmehr scheinen nur bestimmte Substanzen des Seminalplasmas, die durch die Zentrifugation abgetrennt werden, bzw. deren Konzentration durch einen hohen Anteil an Verdüner herabgesetzt wird, die Lagerungsfähigkeit negativ zu beeinflussen. Da auch nach 72 Stunden der filtrierte Samen dem zentrifugierten überlegen war, bewirkt anscheinend die L4-Membranfiltration einen ähnlichen „Waschvorgang“ wie die Zentrifugation. Als Bestandteile, die wahrscheinlich durch den Leukozytenadsorptionsfilter abgetrennt wurden, kommen Leukozyten oder Rundzellen in Betracht, die hier jedoch weder qualitativ noch quantitativ ausgewertet wurden.

Auf welche Weise eine Selektion der Spermien stattfindet, konnte nicht geklärt werden. Bei der Filtration von Blut kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Filtermembran- und Leukozytenoberfläche. Eine Selektion durch die Größe der Blutzellen findet nicht statt. Da Samenzellen kleiner als Erythrozyten sind, ist auch hier eine Selektion nach Größe unwahrscheinlich. Ein ähnlicher Mechanismus wie er für die Glaswoll-Sephadex-Filtration beschrieben wurde, wo es zu einer Wechselwirkung zwischen Zelloberfläche toter und membrangeschädigter Spermien und dem Sephadex kommt (HEUER 1980; SAMPER et al. 1994), wäre auch zwischen der L4-Membran und Samenzelloberfläche denkbar. Zur Klärung, ob Leukozyten und defekte bzw. tote Spermatozoen ähnliche oder gleiche Oberflächenproteinstrukturen besitzen, die an den Polyestermedium anhaften, bedarf es weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse des Besamungsversuches zeigen einen deutlichen Vorsprung des Filtrationsverfahren gegenüber dem Zentrifugationsverfahren ( $p = 0,027$ ). Dieser Unterschied ist nur für die beiden, in dem Besamungsversuch eingesetzten Hengste, statistisch abgesichert. Eine allgemeingültige Aussage kann erst bei einer größeren Anzahl von Hengsten getroffen werden.

Berücksichtigt man die Versuchsergebnisse von BÜT-

TELMANN (1988) und WITTE (1989), die bei kleineren Besamungsdosen als 250 Mio. vorwärtsmotilen Spermien signifikant schlechtere Ergebnisse erhielten, so müssen die hier erzielten Resultate als günstig bewertet werden. Für die Versuchsgruppe wurde eine Dosis von 200 Mio. vorwärtsmotile Spermien / Besamungsportion gewählt, um das Vermögen des Filters, eine hochmotile und befruchtungsfähige Samenzellpopulation zu selektieren, darzustellen. In dieser Gruppe liegt die Trächtigkeitsrate nicht unter der Gruppe der Stuten, die 400 Mio. zentrifugierte Spermien / Portion erhielten, sondern sie liegt sogar über dieser. Ein Einfluß der unterschiedlichen Volumina der Besamungsdosen (10ml bzw. 20ml) ist unwahrscheinlich. Zwar wirken sich große Volumina negativ auf den Besamungserfolg aus, doch werden gerade in dem Bereich von 10 -20 ml sehr gute Fruchtbarkeits-ergebnisse erzielt. Eine deutliche Verschlechterung wird erst bei Besamungsvolumina von mehr als 50ml beobachtet (BÜTTELMANN 1988; ROWLEY et al. 1990; JASKO et al. 1992).

Für dieses Ergebnis sind möglicherweise besondere anatomische Verhältnisse im Bereich des Überganges Uterus / Tuba uterina der Stute verantwortlich. Die Aufgabe der utero-tubalen Verbindung könnte die eines Filters sein, der selektiv intakte, motile Spermien in den Eileiter gelangen läßt (BADER 1982). Auf diese Weise wird die Passage einer zu großen Spermienzahl verhindert und so das Risiko einer Polyspermie vermindert (BOYLE et al. 1987). Daraus ergibt sich, daß nicht die Gesamtzahl der Spermien für einen Befruchtungserfolg entscheidend ist, sondern die Anzahl der intakten Samenzellen, die in den Eileiter gelangen. Dieses würde den überlegenen Besamungserfolg des filtrierten Samens erklären, denn gerade dieser verfügt über eine hochmotile, morphologisch intakte Samenzellpopulation. Der zentrifugierte Samen weist auch einen hohen Anteil an motilen und lichtmikroskopisch unversehrten Spermien auf, wovon jedoch ein großer Teil ultrastrukturelle Membranschäden hat. Diese gelangen möglicherweise noch in den Eileiter, können aber letztlich nicht die Eizelle befruchten.

Der Leukozytenadsorptionsmembranfilter Leucosorb® L4 selektiert aus Hengstsperma eine hochmotile und morphologisch intakte Samenzellpopulation. Im Rahmen der Frischsamenaufbereitung stellt sich diese Filtrationsmethode als ein praktisch durchführbares Verfahren dar. Die niedrigen Rückgewinnungsraten werden durch die hohe Fruchtbarkeit der so gewonnenen Spermien mehr als kompensiert.

## Literatur

- AGARWAL, A., A. MANGLONA u. K.R. LOUGHLIN (1991): Filtration of spermatozoa through L4 membrane: a new method. *Fertil. Steril.* 56, 1162-1165
- AHLEMEYER, B. (1991): Tiefgefrierung von Hengstsperma; Einfluß des Seminalplasmas auf Motilität und Kopfkappenintegrität. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- BADER, H. (1982): Investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 32, 59-64
- BOYLE, M.S. D.G. CRAN, W.R. ALLEN U. R.H.F. HUNTER (1987): Distribution of spermatozoa in the mares oviduct. *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 35, 79-86
- BÜTTELMANN, A. (1988): Auswertung der Daten einer Pferdebesamungs-Großstation. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- HEUER, C. (1980): Versuche zur Tiefgefrierkonservierung von Wasserbüffelsperma unter Anwendung des Filtertestes zur Samenbeurteilung. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- JASKO, D. J., B. W. PICKETT u. R. P. AMANN (1992): Effects of extenders and dilution rates on motility and fertility of cooled semen. in: *Techniques for handling and utilization of transported equine spermatozoa and embryos.* Colorado State Univ., Proceedings 1992, p. 17 - 32
- KENNEY, R.M., R.V. BERGMANN, W.L. COOPER u. G.W. MORSE (1975): Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings *Proc. of the Ann. Con. Am. Assoc. Equine Pract.* 21, 327-336
- KNEISSL, S. (1993): Tiefgefrierkonservierung von Pferdesperma: Einfluß der Samenentnahmetechnik, Zentrifugation, Konfektionierungsform und Einfriermethode auf Motilität und Membranintegrität der Samenzellen. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- KRÖGER, B. (1991): Das Swim-up-Verfahren als Beurteilungskriterium für Hengstsamen. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- MARTINSSON, G. (1995): Morphofunktionelle und volumetrische Charakterisierung von unterschiedlich aufbereitetem Hengstsperma Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- PARRISH, J.J. u. R.H. FOOTE (1987): Quantification of bovine sperm separation by a swim-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *J. Androl.* 8, 259-266
- PICKETT, B.W., J.J. SULLIVAN, W.W. BYERS, M.M. PACE u. E.E. REMMENA (1975): Effects of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil. Steril.* 26, 167-174
- RÖBBELEN, I. (1993): Vergleichende Untersuchungen an unterschiedlich aufbereitetem Pferdetiefgefriersamen- Einfluß verschiedener Tiefgefrierverdünner, der Anpassungszeit sowie variierender Einfriergeschwindigkeiten auf Motilität und Membranintegrität der Samenzellen. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- ROWLEY, H.S, E.L. SQUIRES U. B.W. PICKETT (1990): Effect of insemination volume on embryo recovery in mares. *Equine Vet. Sci.* 10, 298-300
- SAMPER J.C., D.W. HAMILTON, J.L. PRYOR, J.K. LOSETH, M.H.T. TROEDSSON u. B.G. CRABO (1994): Mechanism of sephadex trapping of capacitated spermatozoa. In: *6th Int. Sym. of Equine Repr.*, Caxambu 1994, (in Druck)
- SPRECKELS, I. (1994): Untersuchungen zur Samenzell-Selektion mittels Glaswollsephadexfiltration bei Hengstsperma unter besonderer Berücksichtigung der Kryokonservierung. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- WALTER, K. (1992): Einfluß verschiedener Verfahren zur Spermatozoenselektion auf Motilität, Vitalität und Morphologie von Hengstspermien sowie deren diagnostische Bedeutung. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.
- WITTE, A. (1989): Untersuchungen zur Flüssigkonservierung von Pferdesperma unter Verwendung verschiedener Verdünnermethoden. - Labor und Feldversuch -. Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

Dr. H. Reiferrath  
Klinik für Pferde  
Tierärztliche Hochschule  
Bischofsholer Damm 15

30173 Hannover