

Ein herkömmlicher, bei der Aufbereitung von Hengstsamen für die Tiefgefrierkonservierung zur Zentrifugation eingesetzter Elektrolyt-EDTA-Verdünner, wurde durch Zusatz der Membranprotektiva Lecithin und Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) modifiziert.

Im split-sample Verfahren wurden 36 Ejakulate von 6 Hengsten des Niedersächsischen Landgestütes Celle nach dem von MARTIN u. KLUG (1979) entwickelten Makrotüb^R-Verfahren, mit dem Original Verdünner Merck I und mit drei weiteren Verdünnervarianten aufbereitet. Deren Einfluß auf Motilität und insbesondere Akrosomintegrität, sowohl nach der Zentrifugation und anschließenden Resuspension, als auch nach dem Auftauen, wurde beurteilt und verglichen.

Die morphologische Untersuchung der Kopfkappenveränderungen erfolgte mittels der Spermac^R-Färbung.

Darüberhinaus wurden die aufgetauten Proben mit dem 1988 von BLACH et al. entwickelten, monoklonalen Antikörper F79.3E2 und der indirekten Immunfluoreszenz untersucht. Eine Schädigung von Plasma- und akrosomaler Membran stellt sich bei dieser Methode durch eine leuchtend hellgrüne Fluoreszenz der Kopfkappe dar.

Die praktische Anwendung des Verfahrens sollte überprüft werden, und es wurde versucht, die so gewonnenen Ergebnisse zu denen der Spermac^R-Färbung in Beziehung zu setzen, die an der Tierärztlichen Hochschule Hannover routinemäßig zur Beurteilung von Hengstsamen angewendet wird .

Bezüglich der Gesamtmotilität nach der Zentrifugation, war der Originalverdünner Merck I, sowie die Variante II mit 5 mM PMSF den beiden Verdünnervarianten mit Zusatz von 1.5 g Lecithin leicht überlegen.

Im aufgetauten Samen zeigte jedoch keiner der Verdünner hinsichtlich der Motilität einen Vorteil.

Weder für den Zusatz von Lecthin, noch für PMSF oder beider Substanzen zum Zentrifugationsverdünner, konnte im Vergleich zum Originalverdünner ein günstiger Einfluß auf die Kopfkappenintegrität des resuspendierten oder aufgetauten Samens festgestellt werden.

Dies Ergebnis wurde auch durch die Untersuchung der Proben mittels der indirekten Immunfluoreszenz bestätigt.

Der Mittelwert der durch dieses Verfahren gewonnenen Daten für die akrosomalen Veränderungen im aufgetauten Samen lag mit 24.7% deutlich unter dem der Spermac^R-Färbung mit 30.9%. Außerdem ergab sich eine erhebliche Differenz zwischen dem Prozentsatz isolierter, fluoreszierender Akrosome mit 1.0% zu den 6.4% Spermien mit abgelöster Kopfkappe in der Spermac^R-Färbung. Es zeigten sich jedoch starke, individuelle Schwankungen für die einzelnen Hengste.

Ein Ansatz zur Erklärung der Differenzen ergab sich aus der Annahme, daß einerseits nicht alle lichtmikroskopisch erfaßbaren Veränderungen im Kopfkappenbereich der Samenzelle notwendigerweise auch mit einem Verlust der Integrität der Akrosommembran einhergehen, andererseits ein Großteil der abgelösten Kopfkappen während des Konfektionierungsvorganges zerstört werden, und daher über die indirekte Immunfluoreszenz nicht mehr nachweisbar sind.

Der Vergleich der Mittelwerte abzüglich der entsprechenden Prozentsätze für die jeweiligen Veränderungen scheint diese Hypothese zu bestätigen, es bedarf jedoch der Abklärung durch weitere, eventuell elektronenmikroskopische Untersuchungen. Die Methode selbst ist in der Durchführung problemlos, und im Unterschied zum Ergebnis der Färbung, daß häufig durch Verdünnerkomponenten und subjektive Interpretation des Untersuchenden beeinflusst ist, sicher und objektiv auswertbar.

Schrop, Helga

The Membrane Protective Influence of Lecithine and Phenylmethansulfonyl Fluoride on Motility and Acrosomal Integrity of the Frozen-thawed Equine Semen;
Evaluation by Indirect Immunofluorescence Compared to the Spermac^R Acrosomal Staining.

7

SUMMARY

The present work should test the membrane protective influence of Lecithine and Phenylmethansulfonyl Fluoride added to a common electrolyte-EDTA extender that is used in centrifugation with the Makrotüb^R method for cryopreservation of stallion semen by MARTIN and KLUG (1979).

To a total of 36 ejaculates of six stallions of the Landgestüt Celle the split-sample method was applied to compare the 3 extender variations to the original Merck I diluent. The quality of the semen was evaluated by observation of sperm motility and the even more important acrosomal integrity, first after centrifugation and resuspension, second after freezing and thawing.

Spermac^R-staining was applied to determine the acrosomal damage.

A new method of monoclonal antibody labelling of acrosomal aberrations by indirect immunofluorescence developed by BLACH et al. (1988) was also used to examine the frozen-thawed samples.

As soon as the outer acrosomal membrane is damaged the antibody is attached to the antigen and the acrosome will show a bright, light-green fluorescence.

The results of this examination method should be evaluated by comparing them to those of the Spermac^R-staining that is presently used in Hannover.

The following results were received:

Evaluating the acrosomal integrity of the samples by Spermac^R-staining the addition of the membrane-protective agents Lecithine and PMSF to the centrifugal extender did not yield any advantages over the sole use of the original Merck I.

As well as the total motility after centrifugation seemed to be higher in the original diluent and the variation containing 5 mM PMSF than in those samples including 1.5 g Lecithine, this results could not be repeated after thawing.

According to this the indirect immunofluorescent labelling of acrosomal damage of the thawed semen did not lead to any significant differences of the four extender variations.

Comparing the means of acrosomal damage for both methods, the Spermac^R results of 30.9% appear to be significantly higher than 24.7% of the indirect immunofluorescence.

Another remarkable difference occurs between the high percentage of 6.4% sperms without acrosomes, so called "detached acrosomes", detected by Spermac^R in relation to only 1.0% of isolated, fluorescing acrosomes.

Trying to explain these differences one can suspect that some of the acrosomal aberrations as "swollen, apical ridge" and "deformed acrosome" determined by staining are not necessarily connected with the destruction of the acrosomal membrane.

Concerning the detached acrosomes most of them might be completely destroyed during the preparation and freezing procedure so monoclonal antibody cannot identify the antigen to become attached.

Calculating the means of the Spermac^R examination referring to this hypothesis the values corresponded with the one obtained by the immunofluorescence method.

Because of this results the final evaluation considering

the effectivity of using the monoclonal antibody labelling of acrosomal damage is not yet possible. Further examinations probably by electron-microscope scanning should be useful.

The method itself seems distinctly less prone to mishaps and to yield more objective results when compared to the staining, that is more or less influenced by extender components and the subjective interpretation of the examiner.