

The purpose of this study was to test the suitability of three fluorescent stains, Hoechst 33258 (H33258), propidium iodide (PI), and carboxyfluorescein diacetate (CFDA), in showing damage to the plasma membrane of boar semen during storage at 17°C for five days (d1-d5) in two extenders (Androhep and BTS). In addition, motility measured with the Strömberg-Mika Cell Motion Analyser (SM-CMA) was examined as a parameter for showing in vitro aging of spermatozoa. An orientational insemination trial using stored semen was performed under controlled conditions with 61 gilts.

The following results were obtained using 13 ejaculates from six boars:

With PI a significant reduction in plasma membrane integrity was shown between d1-d2, d3-d5, and d4-d5. H33258 only showed a reduction between d1-d4, and no reductions were seen with CFDA. All three stains had an effect on the membrane, as shown by the significant reduction in the NAR of the samples, compared to the unstained control.

No significant differences were seen in overall motility between computer-estimated and subjective measurements. The progressive motility fell between d1-d3, and no significant changes in the velocity of the spermatozoa were seen.

In comparing Androhep and BTS extenders, significantly higher percentages of plasma membrane integrity were registered with PI in the Androhep samples on d3 and d5. Significantly higher percentages of progressive motility were seen in samples extended with Androhep on d2 and d4. The velocity of spermatozoa tended to be higher in BTS, the difference being significant on d5.

In the AI trial fertilization rates fell significantly between d1-d3, d2-d3, d3-d4, and d4-d5. The numbers of accessory spermatozoa showed significant decreases between all days, which means that the use of aged semen leads to a reduction in the number of fertilization-competent spermatozoa in the oviduct. No significant correlations were seen between spermatological parameters and fertilization results.

It can be concluded that in contrast to H33258 and CFDA, staining with PI is a useful indicator of plasma membrane damage due to in vitro aging of boar spermatozoa. With the computer settings used here, motility measurements made with the SM-CMA do not indicate damage to boar spermatozoa due to in vitro aging sensitively enough. Fluorescence staining with PI and both the progressive motility and velocity of boar spermatozoa might be useful for showing preservation differences between extenders.

The drops in fertilization rates due to storage over five days confirm the poor conservability of liquid boar semen, which is manifested less by changes in the spermatological in vitro parameters examined, than by the significant reductions in the fertilization-competent sperm population (accessory spermatozoa) in the oviduct.

Erweiterte deutsche Zusammenfassung

Timothy John Baltes

Beurteilung der Plasmamembran mittels Fluoreszenzfärbung und computergestützte Motilitätsbestimmung als Indikatoren für die in-vitro-Alterung von Eberspermien

Zielsetzung

Die Plasmamembran von Eberspermien ist besonders temperaturempfindlich. Schon bei Abkühlung auf +15 °C können Schäden auftreten (BOENDER 1968; BUHR 1990; DE LEEUW et al. 1990; KOEHLER 1985), die mit dem Verlust der Motilität und der Akrosomintegrität einhergehen. Fluoreszenzfarbstoffe bieten eine über die konventionelle phasenkontrastmikroskopische Untersuchung hinausgehende Möglichkeit, die Integrität der Plasmamembran zu überprüfen. Es war deshalb das Ziel dieser Arbeit, die Eignung dreier Fluoreszenzfarbstoffe [Hoechst 33258 (H33258), Propidiumjodid (PI) sowie Carboxyfluoresceindiacetat (CFDA)] zur Darstellung von Plasmamembranschäden bei Eberspermien vergleichend zu prüfen, die für fünf Tage bei +17 °C gelagert wurden. Aufgrund ihrer Membranpermeabilität dringen H33258 und PI nur in Zellen mit defekten Plasmamembranen ein, in denen sie einen fluoreszierenden Komplex mit der DNA bilden. Der Farbstoff CFDA penetriert alle Spermatozoen und wird in der Zelle zu einem nichtmembrangängigen Spaltprodukt abgebaut. Das fluoreszierende Spaltprodukt Carboxyfluorescein wird daher nur von Spermien mit intakten Plasmamembranen zurückgehalten. Weiterhin wurde die Eignung der mit dem "Strömberg-Mika Cell Motion AnalyserTM" (SM-CMA) bestimmten Motilität als Parameter für die in-vitro-Alterung beurteilt. Die subjektiv geschätzte Motilität und der phasenkontrastmikroskopisch beurteilte apikale Rand der Akrosomen (NAR) dienten als Vergleichsparameter. Auf der Basis von geteilten Ejakulaten der Versuchseber wurde ein orientierender Besamungsversuch durchgeführt, um den lagerungsbedingten Abfall der Befruchtungskapazität zu erfassen.

Material und Methoden

Die Labor- und Besamungsversuche wurden mit flüssigkonserviertem Ebersperma durchgeführt, das bis zu fünf Tagen bei +17 °C gelagert wurde. Für die Samengewinnung standen sechs Eber verschiedener Rassen im Alter zwischen 1½ und 3 Jahren zur Verfügung. Die orientierenden Besamungsversuche erfolgten an 61 unter Versuchsbedingungen gehaltenen Jungsauen, die zweimal täglich einer Brunstkontrolle mit dem Sucheber und einer sonographischen Ovarkontrolle zur Ovulationsfeststellung unterzogen wurden. Gewinnung, Verarbeitung und Lagerung erfolgten entsprechend den in der Schweinebesamung gültigen Richtlinien. Jedes Ejakulat wurde routinemäßig hinsichtlich Volumen, Aussehen und Dichte sowie Motilität und Akrosommorphologie der Spermien beurteilt. Als Konservierungsmedien dienten die in der Schweinebesamung gebräuchlichen Verdüner Androhep und BTS (WABERSKI 1988, PURSEL UND JOHNSON 1975). Alle Versuche erfolgten auf der Basis von geteilten Ejakulaten.

Von den spermatologischen Daten wurden Durchschnitte und Standardabweichungen errechnet. Verglichen wurde mit dem gepaarten t-Test oder gegebenenfalls mit einem t-Test für unabhängige Stichproben unterschiedlicher Stichprobengrößen. Befruchtungsraten wurden mit den spermatologischen Daten durch Errechnen ihrer Regression verglichen. Zur Berechnung der Häufigkeitsverteilungen der akzessorischen Spermien in der Zona pellucida diente der Chi-Quadrat-Test. Kendall-tau-b-Korrelationen wurden für die spermatologischen Daten errechnet.

-Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Anwendung kamen Hoechst 33258 (H33258), Propidiumjodid (PI) und Carboxyfluoresceindiacetat (CFDA).

Der Farbstoff H33258 (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) dringt nur in plasmamembran-defekte Spermien ein, bindet an DNA und bildet einen Komplex, der fluoreszenz-

mikroskopisch als blaue Anfärbung des Zellkerns (Spermienkopf) sichtbar wird. Wegen fehlender Angaben für den Einsatz bei Eberspermien wurde der Farbstoff vergleichend in Konzentrationen von 1, 10 und 25 µg/ml Samen mit Einwirkzeiten von 5 bzw. 10 Min. eingesetzt. Zur Fixation wurden Formalinzitratlösungen von 1,7 und 50,3 mM verglichen. Die Samenproben wurden als fixierte Naßpräparate untersucht. Für den Hauptversuch kamen 1 µg H33258 pro ml Samen mit einer Einwirkzeit von 5 Min. und 1,7 mM Formalin als Fixativ zur Anwendung. An einem Präparat erfolgten nacheinander die phasenkontrastmikroskopische Beurteilung des apikalen Randes (NAR) und die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung. Letztere wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

A. ungefärbt (Plasmamembran intakt); B. gefärbt (Plasmamembran defekt) I. gesamter Spermienkopf fluoresziert, II. postakrosomaler Bereich fluoresziert, III. schmaler Streifen zwischen Kopf und Mittelstück fluoresziert.

PI penetriert Samenzellen mit defekter Plasmamembran, bindet an DNA und bildet einen rotfluoreszierenden Komplex. 0,5 mg PI (Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen) wurden in 1 ml Aqua dest. gelöst und als Gebrauchslösung bei -20 °C tiefgefroren bis zur Anwendung dunkel aufbewahrt. 970 µl Samen wurden mit 10 µl PI und 20 µl einer 1,7 mM Formalinzitratlösung versetzt. Die Inkubation erfolgte für 8 Min. bei 38 °C unter Lichtabschluß. Die Untersuchung (Phasenkontrast + Fluoreszenz) erfolgte am Naßpräparat. Das Beurteilungsschema entspricht dem von H33258.

CFDA penetriert intakte Membranen und wird von zelleigenen Esterasen zu membranimpermeablen Carboxyfluorescein gespalten. Die verwendete Gebrauchslösung (0,46 mg 6-CFDA (Calbiochem GmbH, Bad Soden) gelöst in 1 ml Dimethylsulfoxyd) wurde bis zur Verwendung bei -20 °C dunkel aufbewahrt. 960 µl Samen wurden mit 20 µl CFDA-Lösung und 20 µl einer 1,7 mM Formalinlösung unter Lichtabschluß für 8 Min. bei 38 °C inkubiert und als Naßpräparat entsprechend den vorhergehenden Angaben phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Fluoreszenzfärbung wurde folgendermaßen beurteilt: A. das gesamte Spermium fluoresziert (Plasmamembran intakt); B. Spermium ungefärbt oder nur teilweise gefärbt (Plasmamembran defekt), I. keine Fluoreszenz, II. Kopf

gefärbt, III. Kopf und Mittelstück gefärbt, IV. Mittelstück gefärbt, V. Akrosom gefärbt, VI. Akrosom und Mittelstück gefärbt.

-Mikroskopische Untersuchungen

Alle gefärbten und ungefärbten Samenproben wurden als Naßpräparate mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Standard mit IV Fl Auflichtfluoreszenzkondensator, Carl Zeiss AG, Oberkochen) mit Phasenkontrasteinrichtung und Ölimmersion bei 1000-facher Vergrößerung hinsichtlich Akrosommorphologie und Fluoreszenzanfärbung untersucht. Zur Verwendung kamen folgende Filtersätze: Excitationsfilter G365, Strahlenteiler FT395, Emissionsfilter LP420 (H33258); Rhodaminfiltersatz (PI); Fluoresceinfiltersatz (CFDA). Jeweils 200 Samenzellen von zufällig ausgewählten Blickfeldern wurden hinsichtlich Akrosommorphologie und Fluoreszenzanfärbung.

Die Motilitätsbestimmung erfolgte sowohl subjektiv durch Schätzung als auch computervideomikrographisch mit Hilfe eines Strömberg-Mika Cell Motion Analysers™ (SM-CMA). In beiden Fällen wurde dasselbe Präparat in derselben mikroskopischen Einstellung (Mikroskop Olympus BH2, Okular 10fach, Objektiv SPlan 20 NH) beurteilt. Für die computergestützte Bewegungsmessung wurden mindestens 200 Spermien berücksichtigt, die je nach Präparatdichte in fünf bis zehn Einstellungen erfaßt wurden. Die subjektive Motilitätsschätzung erfolgte entsprechend, wobei der jeweils höchste Schätzwert für die Auswertung berücksichtigt wurde.

-Besamungsversuch

Die Rauschekontrolle erfolgte zweimal täglich mittels Sucheber jeweils um 8 und um 20 Uhr. Zeitgleich wurde die sonographische Ovarkontrolle zur Ovulationsfeststellung durchgeführt. 61 Jungsaunen wurden mit Androhep-verdünnten (32) bzw. BTS-verdünnten Samen (29) 24 Stunden nach Duldungsbeginn mit 2 Mrd. Spermien inseminiert. Zwei bis fünf

Tage post inseminationem wurden Embryonen bzw. Eizellen durch Spülung aus den Schlachtorganen gewonnen und hinsichtlich des Anteiles normal entwickelter Embryonen morphologisch eingestuft und der Befruchtungsprozentsatz bestimmt. Als Maß für die befruchtungskompetenten Spermien im Eileiter wurde die Anzahl akzessorischer Spermien ermittelt, die nach Zonalysis mikroskopisch ausgezählt wurde.

Ergebnisse und Diskussion

-Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Membrandefekten

Vorversuche zur Bestimmung geeigneter H33258-Gebrauchskonzentrationen sowie Färbezeiten ergaben zwischen den unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen (1, 10 und 25 µg/ml Samen) sowie Inkubationszeiten (5, 10 Min.) keine signifikanten Unterschiede der Membranintegrität (Tab. 3, 4), so daß in allen weiteren Versuchen die geringste Farbstoffkonzentration und Inkubationszeit (1 µg/ml Samen bzw. 5 Min.) verwendet wurde. Die ermittelten hohen Prozentsätze ungefärbter Spermien sprechen gegen die von HAUGLAND (1992) postulierte vollständige Membranpermeabilität von H33258. Spermien, die phasenkontrastmikroskopisch intakte Akrosomen aufwiesen, deuten auf eine begrenzte Permeabilität durch intakte Plasmamembranen hin, die bereits von MORTIMER (1990) beschrieben wurde. Wie HARRISON und VICKERS (1990) postulieren, könnte auch eine größere Stabilität der Akrosommembran im Vergleich zur Plasmamembran vorliegen.

Die für die Fixierung verwendeten unterschiedlichen Formalinkonzentrationen (1,7 vs. 50,3 mM) zeigten im Gegensatz zu HARRISON und VICKERS (1990) keinen Einfluß auf Membranintegrität und Akrosommorphologie (Tab. 3, 4). Zwischen Kontrollen und gefärbten Proben wurden bei beiden Formalinkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Akrosommorphologie (NAR) ermittelt, obwohl die Werte der gefärbten Proben durchschnittlich niedriger lagen, was ein Hinweis auf eine geringe Membrantoxizität von H33258 ist. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurden in den

weiteren Versuchen neben der niedrigsten Farbstoffkonzentration und Inkubationsdauer die geringste Formalinkonzentration von 1,7 mM gewählt.

Hinsichtlich Plasmamembranintegrität, Akrosommorphologie und Motilität über die Lagerzeit ergaben sich folgende Zusammenhänge. PI scheint der sensitivste Indikator der Plasmamembranintegrität zu sein, da mit PI eine signifikante Verringerung der Werte zwischen Tag 1 und Tag 2, Tag 3 und Tag 5 sowie Tag 4 und Tag 5 festzustellen war, die bei Verwendung von H33258 erst zwischen Tag 1 und Tag 4 auftrat, während nach Anwendung von CFDA keine signifikante Abnahme ermittelt werden konnte (Abb. 4, Tab. 13 im Anhang). HARRISON und VICKERS (1990) berichten von guter Übereinstimmung der Werte nach Verwendung von PI und CFDA, sowohl nach alleiniger als auch kombinierter Anwendung, während in der vorliegenden Arbeit der Anteil intakter Membranen nach Verwendung von PI signifikant höher lag als nach Verwendung von CFDA.

Ein möglicher Grund für die vorliegenden Unterschiede ist das unterschiedliche Wirkprinzip, das der Plasmamembranbeurteilung mittels CFDA zugrunde liegt. Während H33258 und PI nur Zellen mit defekter Spermienkopfflasmamembran anfärben, weist CFDA Plasmamembrandefekte in allen Abschnitten des Spermiums nach. Da nur Spermien mit CFDA-Fluoreszenz über die gesamte Zelllänge als membranintakt angesehen werden, wurden höhere Prozentsätze defekter Zellen in Vergleich zu H33258 und PI ermittelt. Desweiteren ist zu erwähnen, daß die Spermienplasmamembran offenbar empfindlich gegenüber Kontakt mit Glasoberflächen ist. Es wurden gelegentlich Präparate untersucht, die eine sehr unterschiedliche zonale Verteilung CFDA-gefärbter und -ungefärbter Spermien aufwiesen, so daß nicht auszuschließen ist, daß durch Glaskontakt bedingte Schäden (sticking effect) zu einer Entfärbung führten.

Alle drei Farbstoffe zeigten einen Membraneffekt, der sich gegenüber der Kontrolle durch eine Verminderung des Anteiles an Spermien mit intaktem Akrosom (NAR) manifestierte (Abb. 5, Tab. 14 im Anhang). Es ist daher fraglich, ob bei einem schädigenden Effekt der Farbstoffe selbst eine Beurteilung von Membranschäden infolge von Lagerungseffekten möglich ist. Lediglich PI scheint dafür geeignet zu sein, da nur hiermit eine zunehmende Schädigung der Plasmamembran über die gesamte Lagerzeit von 5 Tagen nachzuweisen war,

die mit abnehmender Motilität und ansteigender Rate morphologisch feststellbarer Akrosomschäden übereinstimmt, während H33258 und CFDA offenbar nicht ausreichend sensibel sind.

Unterschiede in der Membrantoxizität reflektieren die unterschiedlichen Penetrationsfähigkeiten der Farbstoffe, wobei die Membrantoxizität von H33258 und PI vergleichbar erscheint, da eine signifikante Differenz zwischen beiden nur am Tag 5 gesehen wurde. Über den Untersuchungszeitraum blieben die beobachteten Färbungsmuster der mit den drei Farbstoffen behandelten Spermien konstant (Tab. 7-9). Allein in den mit CFDA gefärbten Proben wurde erkennbar, daß die Plasmamembran des Mittelstückes am stabilsten gegenüber Lagerungsschäden ist. Nur 3-4% der als membrandefekt eingestuften Spermien fluoreszierten nicht im Mittelstück. Dieses bestätigt die Ergebnisse von DE LEEUW et al. (1990) über die Reorganisation der Plasmamembran des Kopfes und Schwanzes beim Abkühlen.

NAR als phasenkontrastmikroskopisch erfaßbarer Akrosomparameter ist ein häufig verwendeter Indikator für lagerungsbedingte Schäden an Spermien (PURSEL et al. 1974). Sowohl bei den in-vitro-Versuchen als auch bei den Samenproben für den Besamungsversuch nahm mit zunehmender Lagerungszeit der Anteil der Samenzellen mit NAR kontinuierlich ab. LIETMANN (1992) berichtet über einen Rückgang des Spermienanteils mit NAR zwischen Tag 1 und Tag 3 sowie zwischen Tag 3 und Tag 4. LÜBBERT ZUR LAGE (1991) und MEDING (1992) wiesen andererseits bei bis zu 6 Tagen gelagertem, Androhep-verdünnten Sperma keinen signifikanten Abfall der NAR-Rate nach.

Ähnlich wie bei SIMMET (1992) bestand eine gute Übereinstimmung zwischen den computervideomikrographisch bestimmten Werten für die Gesamtmotilität und den subjektiven Motilitätsschätzungen. In den vorliegenden Untersuchungen blieben Gesamtmotilität und die Geschwindigkeit der Spermien über den gesamten Lagerungszeitraum von fünf Tagen ohne signifikanten Abfall, während der Anteil vorwärtsbeweglicher Samenzellen bereits zwischen Tag 1 und Tag 3 signifikant abfiel (Abb.6). Die Ergebnisse stimmen mit anderen Studien über die Verwendbarkeit von Androhep-Sperma nicht überein, da sie eine signifikante Abnahme der Gesamtmotilität zwischen Tag 2 und Tag 3 (LIETMANN 1992) sowie zwischen Tag 3 und Tag 5 (DIRKSEN 1991) ergaben.

-Verdünnervergleich

In Übereinstimmung mit LIETMANN (1992) konnte eine Überlegenheit von Androhep gegenüber BTS bezüglich Motilität der Spermien und Akrosommorphologie nicht gezeigt werden (Abb. 11 bzw. 10 sowie Tab. 20 bzw. 19 im Anhang). Hingegen lag die mit PI ermittelte Plasmamembranintegrität der mit Androhep verdünnten Spermien am Tag 3 und Tag 5 signifikant höher als in den mit BTS verdünnten Proben (Abb. 8, Tab. 17 im Anhang). Hinsichtlich der Gesamtmotilität der Spermien bestanden zwischen den Verdünnern keine Unterschiede; die Anzahl der vorwärtsbeweglichen Spermien war hingegen in den mit Androhep verdünnten Proben am Tag 2 und Tag 4 signifikant höher. Die Geschwindigkeit der Spermien lag in den mit BTS verdünnten Proben tendenziell höher, ohne die Signifikanzgrenze zu erreichen.

-Besamungsversuch

Zur Charakterisierung der von der Lagerungsdauer abhängigen Fertilisationskapazität gepoolter Spermaproben der Eber des in-vitro-Versuches wurde ein orientierender Besamungsversuch durchgeführt. Die durchschnittliche Befruchtungsrate lag für den mit Androhep verdünnten Samen bei 63,6%, für den mit BTS verdünnten Samen bei 61,3%. Die Unterschiede sind nicht signifikant. Aus statistischen Gründen wurden die Besamungsversuche bei weitgehend gleicher Sauenzahl in den Verdünnergruppen unabhängig vom jeweils verwendeten Verdünner ausgewertet. Die Befruchtungsraten fielen zwischen Tag 1 und Tag 3, Tag 2 und Tag 3, Tag 3 und Tag 4 sowie zwischen Tag 3 und Tag 5 signifikant ab (Tab. 10). Signifikante Rückgänge der Anzahl akzessorischer Spermien in der Zona pellucida wurden zwischen allen Tagen registriert (Tab. 11). Ein die Befruchtungsergebnisse stark beeinflussender Faktor ist die große zeitliche Variation zwischen Rauschebeginn und Ovulation (LÜBBERT ZUR LAGE 1992; GLEUMES 1992). Da die Versuchssauen der vorliegenden Arbeit zwischen 12 und 24 Stunden vor der Ovulation besamt wurden (Tab. 12), ist zwar ein vom unterschiedlichen Besamungszeitpunkt

verursachter Einfluß auf die Befruchtungsrate nicht auszuschließen, dürfte jedoch primär auf eine lagerungsbedingte Abnahme der Samenqualität zurückzuführen sein, da ein lagerungsbedingter Abfall der Befruchtungsraten zwischen Tag 2- und Tag 4-Sperma auch von anderen Autoren ermittelt werden konnte (LÜBBERT ZUR LAGE 1991; LIETMANN 1992).

Zwischen den spermatologischen Parametern (Plasmamembranintegrität, NAR, computergestützte Gesamtmotilität, Vorwärtsbeweglichkeit und Geschwindigkeit der Spermien sowie subjektiv geschätzte Gesamtmotilität der Spermien) und den Befruchtungsergebnissen konnten keine signifikanten Korrelationen gefunden werden.

Schlußfolgerungen:

- Von den eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffen ist eine Färbung mit Propidiumjodid am besten geeignet, lagerungsbedingte Schäden an der Plasmamembran von Eberspermien darzustellen.
- Die mit Hilfe des Strömberg-Mika Cell Motion Analysers ermittelten Meßgrößen Gesamtmotilität, Vorwärtsbeweglichkeit und Geschwindigkeit der Spermien waren nicht geeignet, Schäden an Eberspermien in Abhängigkeit von der fünftägigen Lagerungsdauer aufzuzeigen.
- Ausgehend vom spermatologischen Vergleich der Verdünnermedien können Fluoreszenzfärbungen mit PI sowie die computergestützte Beurteilung der Vorwärtsbeweglichkeit und Geschwindigkeit der Spermien Vorteile bei der Analyse von Konservierungsunterschieden haben.
- Der lagerungsbedingte Abfall der Befruchtungsraten im Verlauf des fünftägigen Untersuchungszeitraumes bestätigt die geringe Konservierbarkeit von Eberfrischsperma, die sich weniger in der Veränderung der überprüften spermatologischen in-vitro-Parameter als in dem signifikanten Rückgang der befruchtungskompetenten Spermienpopulation im Eileiter (akzessorische Spermien) manifestiert.