

In der vorliegenden Arbeit wurde das osmotische Verhalten von Hengstpermatozoen unter hypertonen Bedingungen und bei drei verschiedenen Temperaturen (+38, +22, +4°C.) untersucht. Das Ziel dabei war, die Möglichkeit zu prüfen die Spermatozoen bis zu einem minimalen, reversiblen Zellvolumen zu führen.

Ejakulate von 22 Warmbluthengsten wurden in die Studie einbezogen. Der native Samen wurde zunächst in einem mittels Tyrodemedium modifizierten Magermilchverdünner verdünnt. Zu Versuchsbeginn wurde die verdünnte Samenprobe einem Waschvorgang mit einer isotonen Elektrolytlösung (Tyrodemedium) unterworfen.

Zur Reduzierung des intrazellulären Wassergehaltes mittels hyperosmotischer Belastung wurde mit Sucroslösungen eine osmolale Reihe von 400 bis 1450 mosmol/kg erstellt. Die gewaschenen Spermienproben wurden in diesen hypertonen Lösungen 15 Minuten lang suspendiert. Die anschließende Rückführung zur Isotonie sollte die Reversibilität der hypertonen Belastung dokumentieren und erfolgte durch Resuspension in hypotonen Lösungen.

Die Zellvolumetrie, die Morphologie und die Motilität wurden als Beurteilungsparameter berücksichtigt. Zur Beurteilung des Zellvolumens wurde ein formunabhängiges Meßsystem basierend auf einer elektronischen Volumenanalyse („Cell Analyser CASY 1 System“) benutzt. Die Membranintegrität wurde durch die CDFA-PI Fluoreszenzfärbung überprüft. Die Spermienmotilität wurde mikroskopisch geschätzt.

Versuchsabschnitt I erfolgte bei Raumtemperatur bei allen Osmolalitätsstufen der erstellten osmotischen Reihe. Nach der Auswertung der Ergebnisse erfolgte der zweite Versuchsabschnitt bei +38°C, +22 und +4°C. bei zwei ausgewählten Osmolalitätsstufen (670 und 890 mosmol/kg).

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Die maximale Reduzierung des Zellvolumens wurde bei einer Osmolalität von 890 mosmol/kg und einer Temperatur von +22°C. erreicht. Mit der Rückführung zur Isotonie zeigte sich bei dieser Temperatur und den Osmolalitätsstufen bis 670, 890 mosmol/kg eine gute Reversibilität zur Ausgangssituation.

In Relation dazu war bei höheren Osmolalitätsstufen unter hypertoner Belastung die Volumenabnahme geringer, während nach Resuspension zur Isotonie die Volumenreaktion deutlich über dem isotonen Ausgangsmaß lag. Ursächlich wird hierfür eine Veränderung der Membranpermeabilität diskutiert.

In den Verteilungskurven der zellvolumetrischen Messungen tauchte eine Zweigipfligkeit auf, die weniger deutlich bei +38°C. und besonders bei +4°C. sichtbar wurde. Die Zweigipfligkeit weist auf das Bestehen von zwei Spermienpopulationen hin.

Unabhängig von anderen Faktoren übte die Temperatur einen Einfluß auf das Volumen der Spermatozoen aus. Beachtlich waren die Auswirkungen der Abkühlung auf +4°C.. Bei dieser Temperatur war eine osmotisch reagierende und eine osmotisch nicht reagierende Subpopulation zu differenzieren, die den beiden Gipfeln der gemessenen Verteilungskurven entsprachen. Die Ursachen für die „besondere“ osmotische Reaktion der Samenzellen bei +4°C. werden dem Phänomen des Kälteschocks zugeschrieben.

Die hypertone Belastung ergab eine offenbare Verschlechterung hinsichtlich der Motilität. Mit der Rückführung zur Isotonie erfolgte eine Reaktivierung der Spermienbeweglichkeit, die besonders deutlich bei 670 mosmol/kg ausfiel. Die besten Motilitätswerte tauchten bei +4°C. Lagerung auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei +38°C. ein besonders starker Motilitätsverlust der auf eine Energiemangelsituation infolge Ressourcenverbrauch (ATP) schließen läßt.

Durch die CFDA-PI Färbung zeigte sich, daß die Membranintegrität bei der hypertonen Belastung weitestgehend erhalten bleibt und erst bei der Resuspension zur Isotonie Schäden auftauchen. Dieses Phänomen wird als „posthypertone Spermioolyse“ charakterisiert.

Die Schäden waren hauptsächlich an der Plasmamembran des Spermienkopfes zu sehen. Lediglich bei den +38°C. gelagerten Probenansätzen war eine beachtliche Schädigung der Akrosommembran erkennbar die mit der Auslösung reaktiver Prozesse im Akrosom assoziiert sein könnte.

Die vergleichsweise geringsten Läsionen der Membran traten bei +22°C. auf, während die meisten Permeabilitätsänderungen der Membran bei +4°C. gemessen wurden. Diese Ergebnisse könnten ebenfalls mit Auswirkungen des Kälteschocks verbunden sein.

Die Ergebnisse werden im Hinblick auf eine Anwendung bei der Kryokonservierung von Hengstspermatozoen diskutiert.

Sibila Kapp

Analyses to determine the minimum cellular water content with regard to the cryopreservation of equine spermatozoa.

The osmotic reaction of stallion spermatozoa under hypertonic conditions and at three different temperatures (+38, +22, +4°C.) was studied to test the possibility of reducing the spermatozoa to a minimum reversible cell volume.

The study included the ejaculates from 22 warmblood stallions. The native semen was first diluted in a skimmed milk extender modified with tyrode medium. At the start of the trial, the dilute semen sample was washed with an isotonic electrolyte solution (tyrode medium).

An osmolal series from 400 to 1450 mosmol/kg was made with sucrose solutions to reduce the intracellular water content by hyperosmotic charge. The washed sperm samples were suspended in these hypertonic solutions for 15 minutes. The subsequent return to the isotonic state was to document the reversibility of the hypertonic charge and was carried out by resuspension in hypotonic solutions. The evaluation parameters were cell volumetry, morphology and motility. A shape-independent measuring system based on electronic volume analysis (Cell Analyser CASY 1 System) was used to evaluate cell volume. Membrane integrity was checked by CFDA-PI fluorescence staining. Sperm motility was estimated microscopically.

The first stage in the trials was carried out at room temperature for all the osmolality stages of the osmotic series produced. Once the results had been analysed, the second stage was carried out at +38, +22 and +4°C. for two selected osmolality levels (670 and 890 mosmol/kg).

The following results were obtained:

The maximum reduction in cell volume was reached at an osmolality of 890 mosmol/kg and a temperature of +22°C.. With a return to the isotonic state, a good reversibility to the initial situation was observed at this temperature and these osmolality levels (670 and 890 mosmol/kg).

In comparison, at higher osmolalities under hypertonic charge, the volume reduction was lower while, following resuspension to the isotonic state, the volume reaction lay clearly above the initial isotonic measurement. The reason suggested for this was a change in membrane permeability.

There were two peaks in the distribution curves of the cell volume measurements, being clearly visible at +4°C. but less so at +38°C.. These two peaks indicate the existence of two sperm subpopulations.

Regardless of other factors, the temperature had an effect on spermatozoa volume, with the impact of cooling to +4°C. being significant. At this temperature, one osmotically reacting and one osmotically non-reacting subpopulation could be distinguished which correspond to the two peaks in the distribution curves measured. The phenomenon of cold shock is regarded as the reason for the "particular" osmotic reaction of the semen cells at +4°C..

The hypertonic charge produced a clear deterioration with regard to motility. With the return to the isotonic state, sperm motility was reactivated, particularly clearly at 670 mosmol/kg. The best motility values occurred at storage at +4°C.. In contrast, a particularly heavy loss of motility occurred at +38°C. which appeared to point towards an energy deficiency situation as a result of resource consumption (ATP).

The CFDA-PI staining revealed that membrane integrity remained largely intact under hypertonic charge, with damage only occurring upon resuspension to the isotonic state. This phenomenon is called "posthypertonic spermolysis".

Damage was found primarily in the plasma membrane of the sperm head. Only with the sample preparations stored at +38°C. was any significant damage to the acrosome membrane detectable, which could be associated with the triggering of reactive processes in the acrosome.

The comparatively fewest lesions to the membrane occurred at +22°C., and the most permeability changes in the membrane were measured at +4°C.. These results could likewise be connected to the effects of cold shock.

The results were discussed with regard to application for cryopreservation of stallion spermatozoa.