

Eine spezifische Mittelstück-Färbung von Spermien und ihre mögliche Anwendung

R. Weilenmann

F. Hoffmann-La Roche AG, Basel

Zusammenfassung

Es wird der Einsatz einer speziellen Färbetechnik des Spermien-Mittelstückes bei verschiedenen Tierarten beschrieben (Rind, Pferd, Schaf, Ziege, Schwein). Die Färbung wurde sowohl bei frisch gewonnenen wie auch aufgetauten Spermien durchgeführt. Die Mitochondrien im Mittelstück färbten sich unterschiedlich stark an. Bei 600facher Vergrößerung konnten bei frisch gewonnenen und sofort abgefärbten Spermien verschiedene Untereinheiten des Mittelstückes festgestellt werden. Nach Lagerung von mehr als drei Tagen im Kühlschrank war die Färbung verblasst. Eine positive Korrelation zwischen der Färbintensität und der Enzymaktivität könnte Aufschluss geben über den Grad der Motilität einzelner Spermien und damit auch deren Befruchtungsfähigkeit.

Schlüsselwörter: Samenzellen – Mittelstück – Färbetechnik – Abnormitäten – Befruchtungsfähigkeit

Specific middle piece staining of sperms and possible applications

A special staining technique for the middle piece of sperms is described in different species (cow, horse, sheep, goat, pig). Staining was performed with frozen or fresh semen. The mitochondria in the middle piece could not always be stained with the same intensity. Using 600-fold magnification, subunits of the middle-piece could be observed, but only on fresh collected and immediately stained sperms. When kept in the refrigerator for more than 3 days, the observed subunits disappeared. A positive correlation between staining intensity and enzyme activity could be indicative for sperm motility and also fertilizing capacity.

Key words: spermatozoa – middle-piece – staining technique – abnormalities – fertility

Einleitung

Das Thema Fortpflanzung beschäftigt die Menschheit seit ihrer Entstehung, denn ohne sie wäre eine Entwicklung von Leben auf Erden nicht möglich gewesen. Heute interessiert vor allem die sexuelle Fortpflanzung, bei der nur zwei funktionstüchtige Geschlechtszellen – die Samenzelle und die Eizelle – nach deren Verschmelzung (Karyogamie) die Aussicht auf Nachkommen garantieren. Störungen des Befruchtungsprozesses können vielerlei Ursachen haben, unter anderem auch Mängel in der Samenqualität. Deshalb spielen Beweglichkeit und Morphologie der Spermien (Kopf, Mittelstück und Schwanz) eine wichtige Rolle, wobei der Kopf an der Akrosomreaktion beteiligt ist, das Mittelstück (Ort der Mitochondrien) die Energie liefert und der Schwanzteil für die Bewegung notwendig ist.

Zur detaillierten morphologischen Darstellung von Spermien eignen sich verschiedene Färbemethoden, welche Auskunft geben über den Zustand von Zell-

kern, Akrosom oder Spermienmembran (Vitalität). Die Tripel-Färbung mit Bismarck-Braun, Bengal-Rosa und Tripfan-Blau wird bei Spermien von Maus, Ziege, Schwein, Pferd und auch Mensch mit Erfolg angewendet. Weitere Möglichkeiten sind die Karris- und Giemsa-Färbung, die vor allem zur Darstellung von Akrosom und postakrosomaler Region geeignet sind. Ein grosser Teil der Färbungen von Spermien steht im Zusammenhang mit der Akrosom-Reaktion, welche für die Befruchtungsfähigkeit entscheidend ist (Talbot et al., 1981; Thompson et al., 1985; Didion et al., 1986). Heute werden vermehrt Färbetechniken mit Fluoreszenzfarbstoffen bevorzugt und die Auswertung erfolgt vor allem mit Hilfe des Computers (Gago et al., 1998). Ein weiteres Gebiet der SpermatoLOGIE betrifft die Identifizierung verschiedener wichtiger Enzyme in Spermien. So untersuchte schon Wallimann et al. (1986) mittels indirekter Immunfluoreszenz Kreatin-Kinase Isoenzyme bei Geflügel-

spermien. Da in einer Samenzelle alle Enzyme gleichhäufig auftreten, lässt sich der Ort einzelner Enzyme in Verbindung mit speziellen Farbreaktionen bestimmen und deren Aktivität messen. Bei Mäusen wurde eine spezifische Färbetechnik entwickelt, um die Enzymaktivität in Mitochondrien zu bestimmen (Binkert et al., 1982). Damit lässt sich das Mittelstück rein optisch vom Hals und Hauptstück des Schwanzes gut abgrenzen. Ausser beim Geflügel stimmt bei Rind, Schaf, Ziege, Schwein und Pferd der Sitz der Mitochondrien mit dem Mittelstück überein. Ziel dieser Arbeit war es, die Färbung des Mittelstückes bei obigen Tierarten auf ihre Genauigkeit hin zu prüfen und mögliche Anwendungen zu diskutieren. So interessierte auch die Frage, ob bei Rinder-Verpaarungen zwischen Original Braunvieh (OBV) und Brown Swiss (BS) die Anfärbung der Spermienmittelstücke beeinträchtigt würde und ob sich defekte Spermienmittelstücke anfärben lassen.

Tiere, Material und Methoden

Tiere

Zur Verfügung standen frisch gewonnene sowie tiefgefrorene bzw. aufgetaute Spermien von Original Braunvieh- und Brown Swiss-Stieren sowie deren Kreuzungsprodukte. Auch wurden Spermien anderer Tierarten wie Schaf (Weisses Alpenschaf), Schwein (Veredeltes Landschwein VLS, Edelschwein ES, Duroc), Pferd (Isländer), und Ziege (Toggenburger Ziege) untersucht.

Färbetechnik

Die tiefgefrorenen Spermien wurden in einem Wärmebad bei 38°C während 25 Sekunden aufgetaut. Anschliessend wurden aufgetaute und frischgewonnene Spermien gleichermaßen behandelt. Der Methode von Binkert et al. (1982) folgend, wurde die Spermienkonzentration mittels Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) auf drei bis sechs Mio. Spermien/ml eingestellt. Anschliessend wurde mit einer Pasteur-Pipette ein Tropfen auf einen Objektträger gebracht und bei Zimmertemperatur getrocknet. Darauf folgte die Behandlung in einem Reaktionsbad von 37°C mit einer Nitro-Blau-Tetrazolium (NBT), Phenazin-Metho-Sulfat (PMS) – und Triton x-100-Lösung im Verhältnis 1:1:3. Die anschliessende Fixierung erfolgte in drei Stufen vorerst mit Formaldehyd und P-Puffer im Verhältnis 1:9, danach mit Methanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1 und abschliessend mit Methanol. Nach Trocknen der Objektträger wurden diese nochmals in eine 0.2%ige Eosinlösung eingetaucht und die Spermien unter dem Mikroskop mit einem Immersionsöl-Objektiv betrachtet und beurteilt.

Ergebnisse

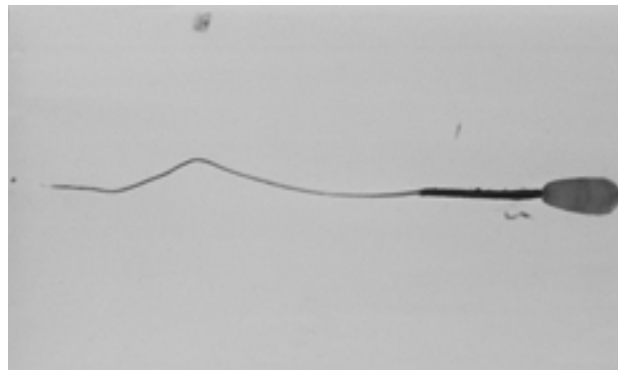


Abbildung 1: Rinderspermium mit Mittelstückfärbung (Original Braunvieh).

Mit der beschriebenen Färbemethode war es möglich, die Mitochondrien selektiv anzufärben. Dies gelang bei Spermien von Rind, Pferd, Schwein, Ziege und Schaf (Abb. 1). Die Mittelstücke der drei untersuchten Schweinerassen Veredeltes Landschwein (VLS), Edelschwein (ES) und Duroc konnten mit dieser Färbetechnik gut dargestellt werden, wobei es keine Rolle spielte, ob die Samenzellen aufgetaut (VLS, ES) oder frisch zur Verfügung standen. Zwischen den einzelnen Schweinerassen konnten aufgrund von Färbeeigenschaften der Spermien keine Unterschiede beobachtet werden. Tiefgefrorene Spermien konnten auch von Rind und Schaf spezifisch angefärbt werden.

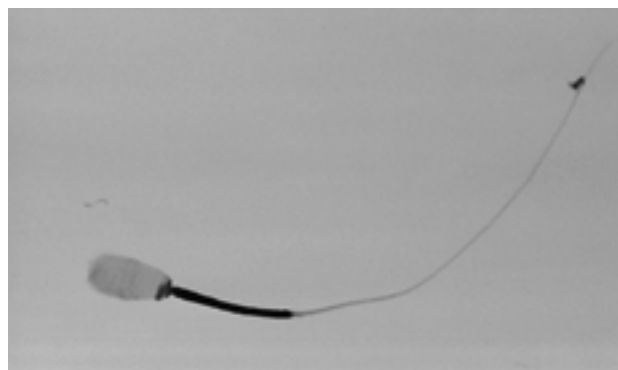


Abbildung 2: Rinderspermium mit Mittelstückfärbung (Original Braunvieh x Brown Swiss).

Die Spermienmittelstücke von Stieren aus Verpaarungen zwischen Original Braunvieh (OBV) und Brown Swiss (BS) liessen sich ebenfalls gut anfärben (Abb. 2). Diese spezifische Färbung war auch bei anormalen Spermien möglich und erlaubte durch die optische Abgrenzung ein schnelles Erfassen von veränderten Mittelstücken. In den folgenden Abbildungen sind einige festgestellte Abnormalitäten erkennbar, wie zum Beispiel ein doppelt angelegtes (Abb. 3) bzw. teilweise aufgetrenntes Mittelstück (Abb. 4). Auch war es möglich, dass in der gleichen Probe gefärbte und nicht-angefärbte Mittelstücke beobachtet werden konnten (Abb. 5).

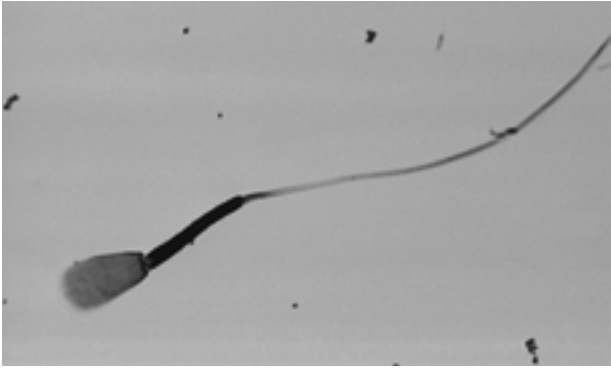


Abbildung 3: Rinderspermium mit doppelt angelegtem Mittelstück.

Wenn frisch gewonnene Spermien zur Verfügung standen und sogleich spezifisch angefärbt wurden, waren bei einer 600fachen Vergrößerung oft kleinere Einheiten auf den einzelnen Mittelstücken zu beobachten. Wurden die Spermien länger als drei Tage im Kühlschrank aufbewahrt, waren die Strukturen nicht mehr festzustellen.

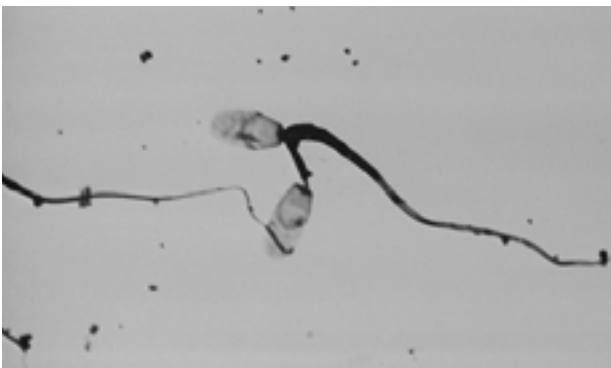


Abbildung 4: Rinderspermium mit teilweise aufgetrenntem Mittelstück.

Die besten Resultate, bezüglich optischer Abgrenzung des Mittelstückes gegenüber dem Rest des Spermiums, wurden von frisch gewonnenen bzw. aufgetauten und anschliessend sofort verarbeiteten Spermien erzielt.

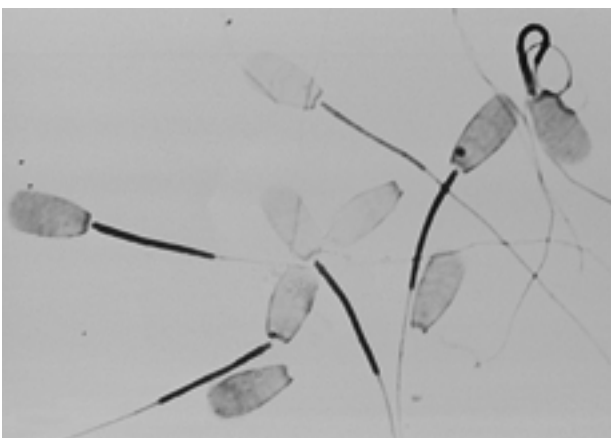


Abbildung 5: Rinderspermien mit angefärbten und nicht-angefärbten Mittelstücken.

Diskussion

Die von Binkert et al. (1982) beschriebene Methode zur Messung von Enzymaktivitäten bei Mausspermien eignet sich ebenfalls zur optischen Abgrenzung des Mittelstückes gegenüber dem Rest des Spermiums bei Rind, Pferd, Schaf, Ziege und Schwein. Eine mögliche Erklärung, warum die bei frischen Spermien beobachteten Untereinheiten nach einer Lagerung von mehr als drei Tagen nicht mehr sichtbar sind, könnte in einer Substrat-Abnahme in den Mitochondrien liegen. Bei fehlendem Substrat sind die Mitochondrien nicht mehr in der Lage für das Spermium genügend Energie zu liefern und dies scheint, wie unsere Ergebnisse zeigen, nach rund 3 Tagen der Fall zu sein. Als Folge davon kann der Mittelstückbereich mit den vorhandenen Mitochondrien färberisch nicht mehr dargestellt werden (Binkert et al., 1982).

Der Anteil von gefärbten und nicht-gefärbten Mittelstücken lässt sich schnell zählen und könnte so im weiteren Sinne einen Hinweis auf die Enzymaktivität bzw. Beweglichkeit der Spermien geben und im weiteren Sinne auch auf deren Befruchtungsfähigkeit. Warum in der gleichen Probe einzelne Mittelstücke sich anfärben liessen andere jedoch nicht, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die in den Mitochondrien enthaltenen Enzyme stark abgenommen haben. Ein weiterer Vorteil der beschriebenen Färbetechnik zur Beurteilung der Enzymaktivität in den Mitochondrien besteht darin, dass keine aufwändigen Labor-einrichtungen notwendig sind.

Dank der selektiven Anfärbung und damit Abgrenzung des Mittelstückes könnten Spermien auch vermessen werden und die Ergebnisse anschliessend für Vergleiche innerhalb und zwischen verschiedenen Tierarten verwendet werden. Würden signifikante Unterschiede auftreten, könnten sie für eine Qualitätskontrolle herangezogen werden. Ein Betrug durch Mischen von Spermien unterschiedlicher Tierarten könnte festgestellt werden, indem spezifisch angefärbte Spermien vermessen und mit den tierartspezifischen Normalwerten verglichen würden. Interessant wäre auch der Vergleich zwischen Spermien von Stieren mit unterschiedlichem Genanteil aus Paarungen, wie zum Beispiel Original Braunvieh mit Brown Swiss. Das Verhalten von Spermien unterschiedlicher Tierarten beim Tiefgefrieren bzw. Wiederauftauen könnte festgehalten und mit unterschiedlichen Konfektionierungsmethoden verglichen und gewertet werden. Bei Selektion auf gewisse Leistungsparameter wie Milch- oder Fleischleistung könnten auch mögliche Umweltseinflüsse auf die Spermien festgestellt und dokumentiert werden. Falls Untersuchungen bei Geflügelspermien vorgenom-

men würden, müssten deren morphologische Eigenschaften berücksichtigt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Mitochondrien in Geflügelspermien im Vergleich zu den oben untersuchten Tierarten, dehnt sich der anfärbbare Bereich über ein wesentlich längeres Teilstück des Spermiums aus.

In der Arbeit von Weilenmann (1987) wurde ein entsprechender Ansatz zur Beantwortung dieser Fragen aufgezeigt. Zur statistischen Absicherung müsste jedoch ein Versuch in grösserem Umfange durchgeführt werden.

Literatur

Binkert F., Burkhart J.G., Malling H.V.: A new sperm abnormality test using enzymatic staining. *Environ Mutagen.* 1982, 4:324.

Gago C., Perez-Sanchez F., Yeung C.H., Tablado L., Cooper T.G., Soler C.: Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) using computer-assisted image analysis. *Internat. J. Androl.* 1998, 21:169–176.

Didion B.A., Graves C.N.: In vivo capacitation and acrosome reaction of bovine sperm in estrous and diestrous cows. *J. Anim. Sci.* 1986, 62:1029–1033.

Talbot P., Chacon R.S.: A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.* 1981, 215:201–208.

Thompson J.G.E., Cummins J.M.: The effects of washing and protein supplementation on the acrosome reaction of ram spermatozoa in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 1985, 9:75–86.

Weilenmann R.: Spermafärbeuntersuchungen bei landwirtschaftlichen Nutztieren mit besonderer Berücksichtigung des Kreuzungseinflusses von Brown Swiss beim schweizerischen Braunvieh. Dissertation, Universität Zürich, 1987.

Wallimann Th., Moser H., Zurbriggen B., Wegmann G., Eppenberger H.M.: Creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *Research and Cell Mobility.* 1986, 7:25–34.

Korrespondenzadresse

Dr. R. Weilenmann, F. Hoffmann-La Roche AG, Pharma-Forschung, Versuchstierdienste, CH-4070 Basel
Tel. 061 688 73 97; Fax 061 687 08 17
e-mail: richard.weilenmann@roche.com

Manuskripteingang: 24. April 2002

In vorliegender Form angenommen: 27. Februar 2003