

INVRIEZEN VAN SPERMA BIJ DE HOND

A. Van Soom, T. Rijsselaere, W. Van Den Broeck, A. de Kruif

Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde
Faculteit Diergeneeskunde, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
ann.vansoom@rug.ac.be

SAMENVATTING

Sperma dat wordt ingevroren in vloeibare stikstof is onbeperkt houdbaar, kan op gelijk welk ogenblik ontdooid worden en heeft naast economische en foktechnische ook genetische voordelen. Een belangrijk onderdeel is dat de membraan van ontdooid hondensperma zeer gevoelig is, waardoor het slechts een korte tijd overleeft en waardoor het op het juiste tijdstip en bij voorkeur intra-uterien moet geïnsemineerd worden.

Voor en tijdens het invriezen moet het sperma in een gepaste verdunner met cryoprotectiva gebracht worden, zodat het tijdens het afkoelen, het invriezen en het ontdooien beschermd is. Verschillende verdunners werden reeds getest met wisselende resultaten: de Tris-eidooier-citraatverdunner is momenteel de meest gebruikte en de meest succesvolle verdunner.

Bij hondensperma blijkt een concentratie van 20 % eidooier in de verdunner optimaal te zijn om de membraan te stabiliseren. Hoewel er nog een hele reeks andere cryoprotectiva bestaan die worden uitgetest, is glycerol momenteel het meest gebruikte cryoprotectant. De beste resultaten worden verkregen met glycerolconcentraties tussen 4 en 8 %.

Ideale invriessnelheden zijn moeilijk vast te stellen, aangezien hondensperma blijkt te overleven bij een hele reeks van invriessnelheden. Ontdooing van het sperma gebeurt bij 37°C gedurende 1 minuut of bij 70°C gedurende 8 seconden.

INLEIDING

Kunstmatige inseminatie (KI) is een techniek waarbij sperma van een mannelijk dier wordt afgenomen en in de geslachtstractus van een vrouwelijk dier geplaatst wordt. KI wordt sinds de tweede helft van de 20ste eeuw veelvuldig toegepast bij verschillende diersoorten, zoals het rund, het paard, het schaap, de geit, het varken, de hond en de mens. De techniek wordt niet bij elke diersoort evenveel toegepast. Dit komt omdat verschillende zaken de toepassingsmogelijkheden kunnen beperken (Tabel 1). Bij het varken bijvoorbeeld beïnvloedt de gevoeligheid van het sperma voor afkoeling het invriesproces erg nadelig, waardoor het sperma vers gebruikt wordt. Bij de hond geeft ingevroren en ontdooid sperma goede resultaten als het met een katheter via een rigide endoscoop door de cervix rechtstreeks in de uterus wordt gebracht (Watts en Wright, 1995; Watts *et al.*, 1997; Wilson, 1993). Een alternatief is het sperma laparoscopisch in de uterus brengen. Ethisch gezien is dit echter een omstreden methode.

Ondanks de moeilijke toegankelijkheid van de uterus heeft ook bij de hond KI de laatste jaren aan popu-

lariteit gewonnen, voornamelijk voor zoötechnische en economische toepassingen (Linde-Forsberg en Forsberg, 1993). Als men KI wil toepassen, is het noodzakelijk goed op de hoogte te zijn van de verschillende aspecten van KI bij de hond en van de bewaring van het sperma. De houdbaarheid van hondensperma is in sterke mate afhankelijk van de gekozen bewaarmethode: vers sperma dat afgekoeld is tot kamertemperatuur, is ongeveer vier uur houdbaar. Als het verdund wordt in een geschikte verdunner en afgekoeld wordt tot 5°C, is de houdbaarheid vier dagen. Sperma dat ingevroren wordt in vloeibare stikstof (-196°C) is in principe onbeperkt houdbaar en kan op eender welk tijdstip ontdooid worden en gebruikt worden voor KI (England, 1998).

Bij de hond is het invriezen van sperma nog niet zo wijd verbreid als bij het rund. In 1954 werd hondensperma voor de eerste maal met succes ingevroren (Rowson, 1954). Pas vijftien jaar later werd de eerste dracht tot stand gebracht met ingevroren en ontdooid hondensperma (Seager, 1969). In de Scandinavische landen is sinds de jaren zeventig veel onderzoek verricht naar KI bij hondachtigen. Het betreft zowel de hond als de verschillende soorten vossen. Vossen

Tabel 1. Bewaarmogelijkheden en toepassingsmogelijkheden van sperma en KI bij de huisdieren.

	Paard	Rund	Schaap/Geit	Varken	Hond
Afkoelen en invriezen van sperma	±	+++	++	±	±
Bewaren van vers verdund sperma	++	++	++	+++	+++
Vruchtbaarheid van sperma na ontdoeien	±	++	±	±	-
Bereikbaarheid van de cervix of de uterus	+++	+++	-	+	+
Synchronisatie van de cyclus bij het vrouwelijk dier	+	+++	+++	+	-

worden in Scandinavië immers veelvuldig gekweekt voor hun pels. Daarbij is het noodzakelijk om gebruik te maken van KI om bepaalde geëerde kruisingen tot stand te brengen tussen subspecies die normaliter niet met elkaar paren, zoals bijvoorbeeld de blauwvos en de zilvros (Farstad, 1996).

In dit overzichtsartikel zal dieper ingegaan worden op de mogelijke toepassingen van KI bij de hond, de huidige methoden voor het invriezen van hondensperma en op mebraankarakterisatie als hulpmiddel bij het invriezen van sperma.

MOGELIJKE VOORDELEN VAN KI MET INGEVROREN SPERMA

Invriezen van hondensperma biedt tal van mogelijkheden voor de professionele hondenfokker. Doordat de teef maar 1 tot 2 maal per jaar gedekt of geïnsemineerd kan worden (Hoffman *et al.*, 1996; Verstegen *et al.* 1997), betekent een mislukte dekking of een slecht getimed inseminatie een groot verlies voor de fokker (Muylaert, 1998). Indien een bepaalde teef met een buitenlandse reu gekoppeld moet worden, is dit het eenvoudigst te bewerkstelligen door ingevroren sperma van de betreffende reu aan te kopen. Een goede invriesmethode en een aangepaste inseminatietechniek in combinatie met een goede foktechnische achtergrond zijn vereist voor het welslagen van de procedure.

Ingevroren sperma is gemakkelijk en goedkoop te transporteren. Het vereenvoudigt de uitwisseling van genetisch materiaal tussen verschillende fokkers, zowel nationaal als internationaal. Quarantainemaatregelen zijn bij spermaexport niet nodig, alleen een attest dat de spermadonor vrij is van bepaalde infec-

tieuze agentia (rabies, leptospirose) of venerische ziekten (*Brucella canis*) is voldoende. Verder kan, als een reu gestorven is of als zijn vruchtbaarheid of deklust door ouderdom of ziekte afgenomen is, het sperma nog gebruikt worden indien het werd ingevroren (Loncke, 1998, England, 1998). Ook kan bij een tijdelijk bezoek van een buitenlandse fokreus (bijvoorbeeld tijdens een tentoonstelling) het sperma in het betreffende land ingevroren worden om op een later tijdstip geïnsemineerd te worden. Bij een eventuele verkoop van een dekruus is het noodzakelijk duidelijk te bepalen wie de eigenaar van het ingevroren sperma wordt.

Naast deze economische, sanitaire en foktechnische toepassingsmogelijkheden verdient ook het genetisch aspect aandacht. In de toekomst zal het misschien mogelijk worden het invriezen van sperma te combineren met het in kaart brengen van de erfelijke ziekten van de betreffende hond. Zoals bekend is er bij het fokken van de verschillende hondenrassen onoordeelkundig gebruik gemaakt van bepaalde "founderdieren", die achteraf drager bleken te zijn van bepaalde erfelijke aandoeningen. Hierdoor hebben veel rassen te kampen met bepaalde erfelijke gebreken, zoals progressieve retina-atrofie en verschillende typen van bloederziekten (onder andere Duitse herder, golden retriever). Veel van deze aandoeningen zijn recessief en/of komen pas op latere leeftijd tot uiting, zodat er al met eventuele dragers van de ziekten gefokt werd vóór de afwijking gediagnosticeerd wordt (Peelman *et al.*, 1996). Het zou daarom zeer gewenst zijn dat voor bepaalde erfelijke ziekten, waarvoor de mutatie bekend is, uitsluitend sperma van gezonde reuen gebruikt wordt voor het aanleggen van een spermabank. Vanwege dit laatste punt wordt KI met

ingevroren sperma sinds 1981 toegestaan door de kennelclub van de USA. Het Belgische stamboek, Koninklijke Vereniging Sint Hubertus, volgde in 1987 dit voorbeeld (Loncke, 1998).

De resultaten verkregen uit onderzoek naar het invriezen van hondensperma en KI bij de hond, kunnen ook gebruikt worden ter bescherming van wilde canidae. Deze behoren soms tot de bedreigde diersoorten, zoals de rode wolf, de coyote, de fenek of woestijnvos en de grijze wolf (Koehler *et al.*, 1998; Goodrowe *et al.*, 1998). Een genenbank van een bedreigde diersoort kan helpen bij het blijven voortbestaan van de betreffende species, doordat de genetische variatie wordt verbreid. Dit geldt trouwens evenzeer voor bepaalde zeldzame hondenrassen.

SPERMAFUNCTIE

De taak van spermacellen is het transporteren van DNA naar een rijpe eicel. Daartoe hebben ze een zeer gespecialiseerde bouw (Figuur 1): de spermakop bevat maar heel weinig cytoplasma en bestaat voornamelijk uit gecondenseerd DNA. De kop is bedekt met een acrosoom of kopkap. Deze kopkap is eigenlijk een gemodificeerd lysosoom vol enzymen, die moeten helpen bij de penetratie van de eicel (Allison en Hartree, 1970). Verder bestaat de spermacel uit een mitochondriënschede, die energie levert voor de beweging van de flagel of spermastaart. Een goede spermacel moet dus een goede progressieve motiliteit vertonen om de oviduct te kunnen bereiken en om de omhulsels van de eicel te kunnen penetreren. Verder moet de spermacel een intacte plasmamembraan bezitten en mag de acrosoom ook niet beschadigd zijn, omdat de acrosomale enzymen nodig zijn voor de penetratie van de zona pellucida en de versmelting met de eicel (Rota *et al.*, 1995). Capacitatie (waarbij de membraan van de spermacel wordt voorbereid op de versmelting) en acrosoomreactie mogen dus pas geruime tijd na de inseminatie plaatsvinden, omdat een acrosoomgereageerde zaadcel niet lang overleeft. Bij het bewaren van de spermacellen mogen deze drie functies, namelijk motiliteit, membraanintactheid en acrosoomintactheid niet te veel aangetast worden. Het behoud van deze functies is in belangrijke mate afhankelijk van de toestand van de spermacelmembraan.

SPERMACELMEMBRAAN

Spermatozoa worden omgeven door een plasmamembraan, die van cruciaal belang is tijdens de be-

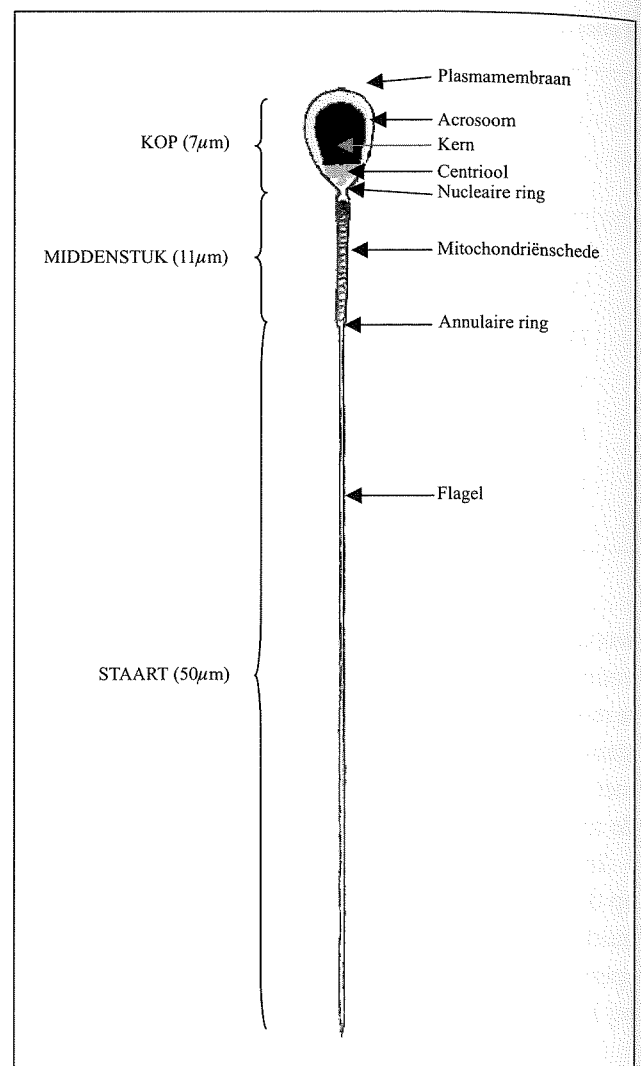


Fig. 1. Bouw van een hondenspermacel.

vruchting. Deze membraan wordt oorspronkelijk gevormd bij de spermatocyt in de testikel maar wordt tijdens de spermiogenese, de epididymale rijping en de capacitatie continu gemodificeerd. Structureel bestaat de spermacelmembraan uit een bilaag van lipiden (Singer en Nicolson, 1972). Fosfolipiden vormen hierin de belangrijkste groep (Parks en Lynch, 1992). Membraanlipiden bevinden zich in een vloeibare kristallijne toestand bij temperaturen boven de fase-transitietemperatuur en kunnen dan bewegen binnen de membraanbilaag (Gadella, 1996). De snelste beweging is een rotatie van het lipide rond zijn as, gevolgd door laterale diffusie. Een tragere beweging is de flipflopbeweging, waarbij het lipide van de ene laag van de bilayer naar de andere springt. Een rechtstreeks gevolg hiervan is dat de vetsamenstelling van de twee lipidemonolagen in de plasmamembraan erg van elkaar verschilt (lipide asymmetrie) (Parks en Lynch, 1992). Als de temperatuur van de omgeving daalt onder de fase-transitietemperatuur, dan stollen

de lipiden in de zogenaamde gelfase en zijn ze niet meer mobiel. Elke lipide heeft een andere transitie-temperatuur waardoor in theorie de membraan bestaat uit een mozaïek van lipiden in gel- (vaste) en fluïde- (vloeibare) fase (laterale fase segregatie) (De Leeuw *et al.*, 1990).

Een andere belangrijke component van de membraan is eiwit. Transmembraanproteïnen overbruggen de volledige bilaag. Ze zijn integrale componenten van de celmembraan en kunnen met detergenten opgelost worden. Daarnaast zijn er ook nog perifere membraanproteïnen die met zwakke elektrostatische krachten verbonden zijn met de buitenkant van de bilaag en er kunnen worden afgehaald door hypertone zoutoplossingen of door media met extreme pH-waarden. Verder zijn er nog carbohydraten aanwezig op de buitenkant van de membraan, de glycocalyx.

De plasmamembraan van de spermacel is typisch opgedeeld in laterale domeinen (kop, middenstuk en staart) en in subdomeinen binnen deze regio's. Laterale diffusie van membraanmoleculen tussen de domeinen wordt verhinderd door twee ringvormige structuren (transmembraanproteïnen) die de annulaire en de nucleaire ring genoemd worden, en respectievelijk een afgrenzing vormen van het middenstuk met de staart en de kop. Door de specifieke eigenschappen van deze membraandomeinen komt het dat het apicale subdomein van de plasmamembraan wel kan versmelten met de uitwendige acrosoommembraan (acrosoomreactie) maar dat er geen fusie optreedt ter hoogte van het equatoriaal subdomein, terwijl dit subdomein dan wel specifiek versmelt met de eicelmembraan (bevruchting).

Uit het voorgaande blijkt duidelijk dat de spermaplasmamembraan een dynamische structuur is met gespecialiseerde functies, die aangetast kunnen worden door veranderende omgevingsfactoren.

CRYOBIOLOGIE VAN SPERMA

Als het sperma bewaard moet worden, wordt het metabolisme op reversibele wijze stilgelegd. Dit kan door de zaadcellen af te koelen, zoals reeds in 1776 aangetoond werd door Spallanzani. Dit afkoelingsproces, van de fysiologische temperatuur van ongeveer 37°C tot aan het vriespunt, kan schade toebrengen aan de spermacellen en wordt koudeshock genoemd. Spermacellen van het paard, de hond, de kat en de mens zijn relatief ongevoelig voor koudeshock, die van de herkauwers zijn matig gevoelig en bij het varken is het sperma extreem gevoelig voor

koudeshock (Watson, 1981). Koudeshock induceert vooral schade aan de plasmamembraan (Buhr *et al.*, 1994) en uit zich in een vermindering van de spermamotiliteit. Dit verlies aan motiliteit wordt niet teruggewonnen wanneer het sperma weer opgewarmd wordt (White, 1993). Ook wordt de membraan na afkoeling meer permeabel (Ortman en Rodriguez-Martinez, 1994). Mogelijk zijn faseveranderingen van de lipiden hiervoor verantwoordelijk (Watson, 1981). Een temperatuurdaling kan immers een uitgebreide gelfasevorming van de lipiden induceren, waardoor membraaneiwitten geclusterd worden. Dit proces is niet volledig reversibel en daarom kan het koelen van membranen resulteren in membraanschade (Gadella, 1996). Deze verhoogde permeabiliteit kan zichtbaar gemaakt worden door kleurstoffen te gebruiken, zoals eosine of propidium jodide, die alleen door beschadigde zaadcellen worden opgenomen (De Pauw *et al.*, 1999). Bij de hond zou afkoeling of koudeshock van minder groot belang zijn om schade aan de spermacellen te verklaren.

Als het sperma verder afgekoeld wordt tot beneden het vriespunt, kan er ijsvorming optreden in het extracellulair medium. Door de omvorming van water tot ijskristallen worden de stoffen die initieel in dit water opgelost werden, geconcentreerd. De spermacelmembraan belet dat de ijskristallen zich ook in de cel vormen, waardoor het intracellulaire vocht gesuperkoeld wordt. Door het relatieve overwicht aan water in de cel wordt een osmotische gradiënt gevormd, waardoor er water aan de spermacel onttrokken wordt. Als het sperma traag afgekoeld wordt en de cel permeabel is voor water, dehydrateert de cel geleidelijk aan. Deze cel kan haar functionaliteit behouden als ze weer ontdooid wordt. Als daarentegen het afkoelen te snel gebeurt, wordt het intracellulaire vocht niet snel genoeg uit de cel verwijderd en kan er intracellulair ijsvorming ontstaan (Mazur, 1965). Na het ontdooiden blijken veel van deze cellen afgestorven te zijn. De grootte van de gevormde ijskristallen is van belang om uit te maken of de cel al dan niet zal overleven. Deze grootte is dan weer afhankelijk van de snelheid van invriezen. Hoe sneller ingevroren wordt, hoe kleiner de ijskristalvorming en omgekeerd. De schade die door het invriesproces wordt veroorzaakt uit zich dus enerzijds in "freezing injury" en anderzijds in "solution injury".

Het is duidelijk dat het invries- en ontdooiproces een grote tolerantie van de spermacellen vereist voor extreme omstandigheden. Het is dan ook niet verwonderlijk dat gemiddeld slechts 50% van de spermacel-

Tabel 2. Motiliteit van tot 5°C gekoelde spermastalen op dag 0 en dag 4 na verdunning in autoloog zaadplasma of in 3 verschillende verdunners (Rota *et al.*, 1995).

Verdunner	Motiliteit D0	Motiliteit D4
Zaadplasma	67 %	0 %
Tris-eidooier	77 %	54 %
Eidooier-melk	75 %	30 %
Eidooier-room	77 %	14 %

len het invries- en ontdooiproces overleeft (Leibo en Bradley, 1999). Een speciale aanpak kan mogelijk een oplossing bieden voor enkele problemen, die optreden bij het invriezen van hondensperma.

INVRIEZEN VAN HONDENSPERMA

De voornaamste problemen bij het invriezen van hondensperma bevinden zich op twee vlakken. Ten eerste overleeft het sperma niet lang na het ontdooien, waardoor het noodzakelijk is om op het juiste tijdstip te insemineren en dan nog het liefst zo dicht mogelijk bij de eicellen, i.e. intra-uterien. Verder vertonen spermacellen van de hond vaak spontaan de acrosoomreactie na het invriezen en ontdooien. Deze reactie mag pas plaatsvinden als ze zich in de nabijheid van de eicel bevinden. Een verbetering van de invries-techniek voor hondensperma moet er dus op gericht zijn om de overlevingsduur te verlengen door het voorkomen van de acrosoomreactie. Tot voor kort werd hondensperma min of meer op dezelfde manier ingevroren als rundersperma (England, 1993).

DE HUIDIGE METHODE VOOR HET INVRIEZEN VAN HONDENSPERMA

Verdunners, cryoprotectiva en membraanstabilisatoren

Net zoals bij andere huisdieren blijkt ook bij de hond dat zaadplasma geen optimale verdunner is om sperma in te bewaren (England en Allen, 1992; Rota *et al.*, 1995). Bij de afname van hondensperma wordt daar trouwens al rekening mee gehouden: alleen de tweede spermarijke fractie wordt opgevangen. Zowel sperma dat vers (gekoeld) enige tijd bewaard dient te worden, als sperma dat ingevroren dient te worden,

moeten in een aangepaste spermaverdunner gebracht worden. De functie van de spermaverdunner is het sperma te beschermen tijdens het afkoelen, invriezen en ontdooien. Tevens moet het sperma van energie-substraten voorzien worden en moeten de pH en de osmolariteit van het sperma op peil (England, 1993) gehouden worden. Zo kan hondensperma dat gekoeld en bewaard wordt in verdunner gedurende enkele dagen zijn beweeglijkheid behouden (Tabel 2).

Hondensperma is reeds met succes ingevroren in verschillende buffers waaronder Krebs-Ringer fosfaat (Martin, 1963), Tris-eidooier-citraat (Foote, 1964) en Pipes buffer (Smith en Graham, 1984). Alhoewel deze laatste buffer goede resultaten gaf wat de motiliteit van het sperma na het ontdooien betreft, bleken de drachtigheidsresultaten teleurstellend (Battista *et al.*, 1988) Trilaadyl, Pipes, IMV Universal en Tris-fructose-citraatverdunner geven alle vier goede resultaten bij traag invriezen (Dobrinski *et al.*, 1993). Momenteel zijn de meest succesvolle invries-protocols deze die goede drachtigheidsresultaten geven, gebaseerd op Tris-eidooier-citraatverdunner met fructose of glucose (Fontbonne en Badinand, 1993; Wilson, 1993, Rota *et al.*, 1999).

Om het sperma tijdens het invriesproces te beschermen, moeten er cryoprotectiva aan de verdunner toegevoegd worden. Cryoprotectiva worden gemakshalve ingedeeld in twee groepen: zij (voornamelijk alcoholen) die penetreren in cellen (glycerol, dime-thylsulfoxide, ethyleenglycol) en zij die buiten de cel blijven (proteïnen, suikers, polyvinylpyrrolidone). Penetreerbare cryoprotectiva binden water in de cel, waardoor er minder schade optreedt. Niet-penetreerbare cryoprotectiva hebben een osmotisch effect op de cel waardoor de cel beter ontwaterd wordt tijdens het invriesproces. Glycerol is het meest gebruikte cryoprotectant (Polge *et al.*, 1949) De gebruikelijke concentratie varieert van 3 % tot 11 % (England, 1933). Omdat glycerol echter ook een toxische invloed kan hebben op spermacellen, werden verscheidene experimenten verricht om de optimale glycerolconcentratie voor het invriezen van hondensperma te bepalen. De beste drachtigheidsresultaten worden verkregen met glycerolconcentraties tussen 4 en 8 % (Fontbonne en Badinand, 1993b; Wilson, 1993). Onlangs werden zowel 2, 4, 6 als 8 % glycerol getest in combinatie met een Tris-fructose-citraatverdunner. Zowel de motiliteit als de acrosoomintactheid van het sperma bleken superieur na het invriezen in 8 % glycerol (Peña *et al.*, 1998a). Of glycerol nu aan het gekoelde sperma (bij 4°C) werd toegevoegd of onmiddellijk na afname van het sperma bij 37°C werd toegevoegd,

bleek geen invloed te hebben. In het algemeen blijken hogere glycerolconcentraties ($\geq 5\%$) en snellere dooismeltheden gunstig te zijn voor de overleving van de spermacellen (Rota *et al.*, 1998). Naast glycerol bestaat er echter nog een hele reeks andere cryoprotectiva. Deze zijn nog niet geprobeerd bij hondensperma. Een voorbeeld is ethyleenglycol. Dit is een zeer snel penetrerend cryoprotectans dat de laatste jaren veel gebruikt wordt bij het snel invriezen of vitrificeren van runderembryo's (Mahmoudzadeh *et al.*, 1995). Verder worden nieuwere cryoprotectantia, zoals de aminozuren proline en glycine-betaine, uitgetest bij de hond met beperkt succes (Peña *et al.*, 1998c). Niet-penetreerbare cryoprotectiva worden ook veel gebruikt bij het invriezen van embryo's (Van Soom *et al.*, 2000) maar zijn nog niet uitgetest voor het invriezen van hondensperma.

Membraanstabilisatoren kunnen uit heel eenvoudige stoffen bestaan. Zo wordt eidooier reeds lang toegevoegd aan spermaverdunner, omdat het de celmembraan beschermt tegen koudeshock (Watson, 1976). Bij hondensperma is een concentratie van 20% eidooier optimaal (Davis, 1982). Deze concentratie wordt dan ook in de meeste protocols gebruikt. Samen met eidooier worden de laatste tijd ook vaak detergenten gebruikt om de spermacelmembranen te modifieren. Natrium dodecylsulfaat is een wateroplosbaar anionisch detergent dat gebruikt wordt om eiwitten in oplossing te brengen. Het denatureert de structuur van de eiwitten en dissocieert hen in hun polypeptide ketens (Helenius *et al.*, 1979). Het wordt toegevoegd aan spermaverdunner voor honden onder de vorm van Equex STM pasta en Orvus ES pasta (Thomas *et al.*, 1992; Nöthling *et al.*, 1995; Rota *et al.*, 1997). Het aangrijpingspunt van de Equex pasta zou zich situeren ter hoogte van de eidooier, door een verandering van de eiwitten, waardoor de bescherming tegen koudeshock en tegen vriesschade toeneemt (Pursel *et al.*, 1978). In ieder geval blijkt de overleving van het sperma na het ontdooien te verbeteren wanneer natrium dodecylsulfaat in een concentratie van 0,25% (Peña *et al.*, 1998b) of 0,5% (Rota *et al.*, 1997) wordt toegevoegd.

Equilibratietijd, verpakking van het sperma, koelsnelheid en ontdooimethode

Hoe langer het sperma geëquilibreerd wordt, hoe beter de fertiliteit: dit zou niet veroorzaakt worden door een betere glycerolpenetratie maar doordat de membranen meer tijd krijgen om te gewennen aan de

koudeshock (England, 1993). Hondensperma wordt meestal gedurende een tweetal uren gekoeld en gelijktijdig geëquilibreerd met glycerol (Rota *et al.*, 1998; Dobrinski *et al.*, 1993; Peña *et al.*, 1998a). Over bij welke temperatuur glycerol bij het sperma moet worden gevoegd lopen de meningen uiteen: sommigen koelen eerst het sperma af tot 5°C en voegen dan glycerol toe. Anderen voegen de glycerol reeds bij 25°C aan het sperma toe en beginnen daarna pas met het afkoelingsproces. Vergelijkende studies tussen beide technieken toonden aan dat er in vitro geen verschil in spermaoverleving was (Fontbonne en Badinand, 1993a, Rohloff *et al.* 1978, Peña *et al.*, 1998a).

Voordat het sperma ingevroren wordt, moet het verpakt worden; meestal worden hiervoor runderspermarietjes gebruikt. De inhoud van de rietjes varieert van 0,25 ml tot 2,5 ml. Rietjes van 2,5 ml zouden voordelig zijn, omdat bij de hond 250 tot 300 miljoen spermacellen nodig zijn per inseminatie en dit aantal is te hoog om in rietjes van 0,25 of 0,5 ml te brengen. In een vergelijkende studie waarbij rietjes van 0,5 ml en 2,5 ml werden gebruikt, werden de beste resultaten echter verkregen met 0,5 ml rietjes (Thomas *et al.*, 1993).

De ideale afkoelingssnelheid voor het invriezen van hondensperma is uitgebreid onderzocht. Meestal worden de rietjes ingevroren in een rek dat hangt in vloeibare stikstofdampen. Deze methode is zeer praktisch en succesvol. Door de afstand van de spermarietjes tot de vloeibare stikstof te variëren, kan men op eenvoudige wijze variaties in afkoelsnelheid induceren (Dobrinsky *et al.*, 1993; Farstad, 1998). Deze invriemethode wordt statisch genoemd (Tabel 3). De reproduceerbaarheid van een bepaald invriesprotocol is echter beter wanneer men een programmeerbaar toestel gebruikt, zoals de Mini Digitcool (Rota *et al.*, 1998) of het Planer 10™ invriestoestel (Farstad, 1998). Deze methode van invriezen wordt dynamisch genoemd.

Hondensperma blijkt een hele reeks verschillende invriessnelheden te overleven. Bij vergelijking van de invriessnelheid van twee commerciële invriemethoden, de Andersen en de CLONE methode (Ström *et al.*, 1997), bleken beide methoden significant te verschillen in snelheid van temperatuurdaling in de kern van het rietje. De drachtigheidresultaten van beide methoden verschillen echter niet. Uit deze gegevens blijkt dat het moeilijk is om optimale afkoelsnelheden voor hondensperma aan te geven, omdat de resultaten beïnvloed worden door de gebruikte

Tabel 3. Afkoelsnelheid bij het plaatsen van sperma op verschillende afstand boven stikstofdamp.

Methode	Temperatuur gradiënt	Werkwijze	Auteur
Statisch	5°C/min	20 cm boven N ₂ gedurende 30 min	Dobrinsky <i>et al.</i> , 1993
	8°C/min	12 cm boven N ₂ gedurende 20 min	Dobrinsky <i>et al.</i> , 1993
	18°C/min	4 cm boven N ₂ gedurende 10 min	Dobrinsky <i>et al.</i> , 1993
	18°C/min	4 cm boven N ₂ gedurende 8 min	Farstad, 1998
Dynamisch	10°C/min van -6 tot -40°C	Mini Digitcool	Rota <i>et al.</i> , 1998
	18°C/min van -6 tot -40°C	Mini Digitcool	Rota <i>et al.</i> , 1998
	50°C/min van -7 tot -100°C	Planer 10TM	Farstad, 1998

verdunner, de samenstelling van de media en de invriesmethode.

De ontdooisnelheid is ook een variabele die de invriesresultaten beïnvloedt. Terwijl rundersperma meestal ontdooit wordt bij 37°C gedurende 1 minuut, wordt hondensperma vaak snel ontdooit gedurende 8 seconden bij 70°C (Olar *et al.*, 1989; Rota *et al.*, 1998). Dit snelle ontdooien zou een gunstig effect hebben op de overlevingsduur van het sperma (Rota *et al.*, 1998).

DE ANDERE BENADERING VAN INVRIEZEN: MEMBRAANKARAKTERISATIE

Varkenssperma is zeer gevoelig voor koudeshock en die gevoeligheid vindt haar oorsprong in de biochemische samenstelling van de spermacelmembraan (Drobnis *et al.*, 1993). Hondensperma is veel minder gevoelig voor koudeshock, maar vertoont na het invriezen en ontdooien zeer snel de acrosoomreactie, waardoor het sperma niet lang overleeft. Vers hondensperma overleeft dan weer zeer lang in de uterus van de teef. Waarschijnlijk zijn deze specifieke eigenschappen van hondensperma gerelateerd aan de samenstelling van de membraan. Zo is bij pluimvee gebleken dat er belangrijke veranderingen plaatsvinden in het sperma van de haan tijdens het opstapelen ervan in de spermaopslagtubuli (Bakst, 1993): een re-

versibele suppressie van spermamotiliteit en respiratie en een stabilisatie van de spermamembranen doen zich voor. Er zouden membraanmodulaties plaatsvinden in de verhouding cholesterol/fosfolipiden. Membraanvesikels die vrijkomen van de microvilli in de spermaopslagtubuli zouden zich als liposomen gedragen en de membraan stabiliseren. Anderzijds kan ook een gewone transfer van lipidenmateriaal in het lumen van de tubuli zorgen voor de stabilisatie van de membraan (Bakst, 1993). Bij de hond is over deze processen niets bekend. Onderzoek naar de exacte biochemische samenstelling van de spermacelmembraan heeft bij de hond nog vrijwel niet plaatsgevonden en dateert al van 25 jaar geleden (Darin-Bennett *et al.*, 1974).

CONCLUSIE

Tot op heden werden de juiste methode voor het invriezen van hondensperma en de samenstelling van hondenspermaverdunner vooral door trial and error vastgesteld. Karakterisatie van de spermacelmembraan van de hond voor en na het invriezen zou een beter inzicht geven in de processen die plaatsvinden tijdens cryopreservatie en die verantwoordelijk zijn voor de korte overlevingsduur van het sperma na het ontdooien. Het onderzoek dat door de vakgroep wordt uitgevoerd, is erop gericht om een betere invriestech-

niek voor hondensperma te ontwikkelen, zodat met lagere dosissen en met minder invasieve technieken geïnsemineerd kan worden.

DANKWOORD

Een speciaal woord van dank voor Eef Donné, die de aanzet heeft gegeven voor dit onderzoek en voor Trees Loncke die een scriptie heeft geschreven over dit onderwerp.

REFERENTIES

- Allison AC, Hartree EF (1970). Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility* 21, 501-515.
- Bakst MR (1993). Oviducal sperm storage in poultry: a review. *Reproduction Fertility and Development* 5, 595-599.
- Battista M., Parks J., Concannon P.W. (1988). Canine sperm post thaw survival following freezing in straws and pellets using pipes, lactose, tris or test expanders. Xth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, (Dublin) 3, 229.
- Beesley SG, Costanzo JP, Lee RE (1998). Cryopreservation of spermatozoa from freeze-tolerant and -intolerant anurans. *Cryobiology* 37, 155-62.
- Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS (1994). Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31, 224-238.
- Darin-Bennett A., Poulos A., White IG (1974). The phospholipids and phospholipid bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 41, 471-474.
- Davies P.R. (1982). A study of spermatogenesis, rates of sperm production and methods of preserving the semen of dogs. PhD Thesis, University of Sydney, Australia.
- De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B., Verkleij AJ (1990). Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology* 27, 171-183.
- De Pauw I., Verberckmoes S., Vanroose G., Van Soom A., de Kruif A. (1999). Comparison of eosin/nigrosin and Sybr-14/PI staining for the assessment of the membrane status of bull sperm. AETE Lyon submitted.
- Dobrniski I., Lulai C., Barth A.D., Post K. (1993). Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl* 47, 291-296.
- Drobnis E, Crowe KLM, Berger T, Anchoroguy TJ (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *The Journal of Experimental Zoology* 265, 432-437.
- England GCW (1993). Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl* 47, 243-255.
- England GCW (1998). *Allen's Fertility and Obstetrics in the dog (second edition)*. Sutton JB, Swift ST. (Eds.).
- England GCW, Allen WE (1992). Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology* 37, 373-381.
- England GCW, Plummer JM (1993). Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility I Suppl* 47, 261-270.
- Farstad W. (1996). Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science* 42, 251-260.
- Farstad W. (1998). Mating and artificial insemination in the dog. In: Simpson G., England G., Harvey M. (Eds.) *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*. British Small Animal Veterinary Association, pp 95-104.
- Fontbonne A., Badinand F. (1993a). Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intravaginal and intrauterine deposition of semen. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl* 47, 325-327.
- Fontbonne A., Badinand F. (1993b). Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility suppl* 4, 531-532.
- Foote R.H. (1964). The effects of electrolytes, sugars, glycerol and catalase on survival of dog sperm in buffered yolk mediums. *American Journal of Veterinary Research* 25, 32-36.
- Gadella BM (1996). Lipid changes in the plasma membrane of capacitating boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 31, 63-73.
- Goodrowe-KL, Hay-MA, Platz-CC, Behrns-SK, Jones-MH, Waddell-WT (1998). Characteristics of fresh and frozen-thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 53, 299-308.
- Helenius A, McCaslin DR, Fries E, Tandford C (1979) Properties of detergents. *Methods in Enzymology* 56, 734.
- Hoffman B, Reisenbeck A, Klein R (1996). Reproductive endocrinology of bitches. *Animal Reproduction Science* 42, 275-288.
- Koehler JK, Platz CC, Waddell W, Jones MH, Behrns S. (1998). Semen parameters and electron microscope observations of spermatozoa of the red wolf, *Canis lupus*. *Journal of Reproduction and Fertility* 114, 95-101.
- Leibo SP, Bradley L. (1999). Comparative cyrobiology of mammalian spermatozoa. In: C. Gagnon (Ed.). *The male gamete: from basic science to clinical applications*. Cache River press, pp. 501-516.
- Linde-Forsberg C., Forsberg M. (1993). Results of 527 controlled artificial-inseminations in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl* 47, 313-323.
- Loncke T. (1998). Sperma-onderzoek bij de reu. Scriptie.
- Mahmoudzadeh A.R., Van Soom A., Bols P., Ysebaert M.T., de Kruif A. (1995) Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *Journal of Reproduction and Fertility* 103, 33-39.

- Martin I.C.A. (1963). The freezing of dog spermatozoa to -79°C . *Research in Veterinary Science* 4, 304-314.
- Mazur P. (1965). The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Annals of the New-York Academy of Sciences* 125, 658-676.
- Muylaert A. (1998). Bepalen van inseminatietijdstip bij de teef. Scriptie.
- Olar TT, Bowen RA, Pickett BW (1989). Influence of extender, cryopreservation and seminal processing procedures on post-thaw motility on canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology* 31, 451-461.
- Ortman K., Rodriguez-Martinez (1994). Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 41, 37-47.
- Parks JE, Lynch DL (1992). Lipid composition and thermotropic behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29, 255-266.
- Peelman LJ, Van Zeveren A., Coopman F., Bouquet Y. (1996). Genetische afwijkingen bij de hond (*Canis Familiaris*) en hun moleculair genetische en biochemische karakteristieken. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 65, 242-252.
- Peña AI, Barrio F., Quintela LA, Herradón PG (1998a). Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology* 50, 163-174.
- Peña AI, Barrio F., Quintela LA, Herradón PG (1998b). Effect of sodium dodecyl sulphate on post-thaw dog semen quality during in vitro incubation at 39°C and 22°C . *Reproduction in Domestic Animals* 33, 393-398.
- Peña AI, Barrio F., Quintela LA, Herradón PG (1998c). Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 33, 5-9.
- Polge C., Smith AU, Parkes AS (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 164, 666.
- Province CA, Amann RP, Pickett BW, Squires EL (1984). Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C . *Theriogenology* 22, 409-415.
- Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA (1978). Effect of Orvus paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *Journal of Animal Science* 47, 198-202.
- Rohloff D., Laiblin C., Heidrich S. (1978). Untersuchungen über die gefrierschutzwirkung von Glycerin und DMSO bei der Tiefgefrierung von Rüdensperma. *Berlin München Tierärztliche Wochenschrift* 91, 31-33.
- Rota A., Iguer-Ouada M., Verstegen J, Linde-Forsberg C. (1999). Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a Tris extender with or without Equex STM Paste. *Theriogenology* 51, 1045-1058.
- Rota A., Linde-Forsberg C., Vannozzi J., Romagnoli S., Rodriguez-Martinez H. (1998). Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/ thawing rates. *Reproduction in Domestic Animals* 33, 355-361.
- Rota A., Ström B., Linde-Forsberg C. (1995). Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C . *Theriogenology* 44, 885-900.
- Rota A., Ström B., Linde-Forsberg C., Rodriguez-Martinez H. (1997). Effects of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C . *Theriogenology* 47, 1093-1101.
- Rowson L.E.A. (1954). Infertility of cow, sow and bitch. *Irish Veterinary Journal* 8, 216-221.
- Seager S.W.J. (1969). Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *A.I. Digest* 17, 6-7.
- Singer S.J. and Nicolson J.L. (Datum???) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.
- Smith F.O., Graham E.F. (1984). Cryopreservation of canine semen: technique and performance. Xth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination (Urbana-Champaign) 2, 216.
- Spallanzani (1776). Opuscoli di fisca animale e vegetabile. Opuscolo II. Observatione e sperienze intorn ai vermicali spermaici dell'homo e degli animale. Modena 1776 (cited by Watson).
- Ström B., Rota A., Linde-Forsberg C. (1997). In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48, 247-256.
- Thomas PGA, Larsen RE, Burns JM, Hahn CN (1993). A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 40, 1199-1205.
- Van Soom A., De Backer V., de Kruif A. (2000). Nieuwe ontwikkelingen in de cryopreservatie van embryo's bij grote huisdieren. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, in druk.
- Verstegen J., Onclin K., Silva L., Concannon P. (1997). Termination of obligate anoestrus and induction of fertile ovarian cycles in dogs by administration of purified pig LH.
- Watson PF (1981). The effects of cold shocks on sperm cell membranes. In: GJ Morris and A Clarke (eds.) *The effects of low temperatures on biological membranes*. Ac Press London pp 189-219.
- Watts J.R., Wright P.J., Lee C.S., Whithear K.G. (1997). New techniques using transcervical uterine cannulation for the diagnosis of uterine disorders in bitches. *Journal of Reproduction and Fertility* 51, 283-293.
- Watts J.R., Wright P.J. (1995). Investigating uterine disease in the bitch: uterine cannulation for cytology, microbiology and hysteroscopy. *Journal of Small Animal Practice* 36, 201-206.
- White IG (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development* 5, 639-658.
- Wilson MS (1993). Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl* 47, 307-311.