

## BEOORDELING VAN FERTILITEIT VAN VERS EN ONTDOOID HONDENSPERMA

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

Voor een correcte beoordeling van de spermakwaliteit zijn een goede afnametechniek en een correcte manipulatie van het sperma na afname van groot belang. Tot op heden wordt hondensperma beoordeeld door het bepalen van de motiliteit, de concentratie en de morfologie. Deze drie parameters geven echter niet altijd een correct beeld van het werkelijk bevruchtend vermogen van sperma. Sinds geruime tijd is bijvoorbeeld bekend dat goed beweeglijk sperma niet noodzakelijkerwijs fertiel is.

De laatste jaren zijn verschillende nieuwe technieken op de markt gekomen om de spermakwaliteit preciezer en accurater te beoordelen. Door spermacellen aan bepaalde in vitro testen bloot te stellen, wordt het mogelijk om een beter inzicht te krijgen in het bevruchtend vermogen van de spermacel. Computergeassisteerde sperma-analyse en spermamigratietesten geven niet alleen een idee over de progressieve motiliteit van het sperma maar ook over de snelheid en de lineariteit waarmee de spermacellen zwemmen. Met behulp van de Sperm Quality Analyzer kunnen de concentratie, de morfologie en de motiliteit van het sperma volledig automatisch bepaald worden. Met de Hemizona-assay is het mogelijk het aantal spermacellen te bepalen die aan de zona gaat binden. De zonabinding van een subfertiele reu kan dan vergeleken worden met die van een normale fertiele reu.

Verscheidene fluorescerende kleurstoffen, zoals bijvoorbeeld CFDA, PI, SYBR14, PSA, kunnen momenteel toegepast worden bij het spermaonderzoek en laten toe om onder andere de acrosoomreactie en de membraanintegriteit van spermacellen te beoordelen. Een bijkomend voordeel van het gebruik van fluorescerende kleurstoffen is dat de spermacellen ook door middel van flow cytometrie beoordeeld kunnen worden waardoor een groter aantal spermastalen op korte tijd kan worden onderzocht.

### INLEIDING

Het belangrijkste criterium om de fertiliteit van een ejaculaat, hetzij vers, hetzij verdund of ingevroren te beoordelen, is het te insemineren en de geboorte van eventuele puppies af te wachten. Het is duidelijk dat deze benaderingswijze onvermijdelijk leidt tot veel tijdverlies en onkosten en daarbij nog aanleiding geeft tot de geboorte van ongewenste puppies. Alternatieve methoden om de functionaliteit van spermacellen bij de hond te testen zijn daarom erg gewenst.

In dit artikel wordt een overzicht gegeven van de evolutie die de laatste jaren is opgetreden bij de controle van de fertiliteit van de reu. Het beoordelen van het sperma begint bij een goede afname en een correcte manipulatie van het sperma. Conventioneel wordt de kwaliteit van een ejaculaat vastgesteld door het bepalen van de concentratie, de motiliteit en de morfologie, alhoewel reeds lang bekend is dat de correlatie tussen deze parameters en de fertiliteit van het sper-

mastaal soms niet erg groot is (Linford *et al.*, 1976). Nieuwe onderzoekstechnieken, die gebaseerd zijn op meer functionele karakteristieken van het sperma, kunnen een beter idee geven van de fertiliteit van een bepaald ejaculaat. Functionele karakteristieken van het sperma kunnen gerelateerd worden aan het vermogen van het sperma om aan een eikel te binden of deze te bevruchten, of aan de aanwezigheid van bepaalde celfuncties die de spermacel moet kunnen vervullen om een eikel intact te kunnen bereiken. Het introduceren van deze nieuwe technieken is een stap voorwaarts bij het beoordelen van de fertiliteit van een bepaalde reu.

### AFNAME VAN HONDENSPERMA

Bij de meeste huisdieren wordt sperma opgevangen in een kunstvagina. Alhoewel deze methode bij de hond ook kan toegepast worden (Stockner

Tabel 1. Normale parameters voor het ejaculaat van een reu.

Parameter	Waarde
pH	6,3-6,7
Volume	1-30 ml
Eerste fractie	1-12 ml
Tweede fractie	1-2 ml
Derde fractie	tot 20 ml
Progressieve motiliteit	> 70 %
Normale spermamorfologie	> 80 %
Sperma -aantal per ejaculaat	> 200 x 10 <sup>6</sup>
WBC	< 2000 /ml
Alkalische fosfatase	5000-40 000 IU /l

en Bardwick, 1991, Schubert en Seager, 1991), wordt meestal gebruik gemaakt van de manuele stimulatie van de reu (Hendrikse, 1984). Behalve bij zeer ervaren reuen, die getraind zijn en waarbij herhaaldelijk sperma wordt afgenomen, is de aanwezigheid van een loopse teef ten zeerste gewenst om de reu te stimuleren. Voor een uitgebreide beschrijving van de afname van hondensperma wordt verwezen naar de literatuur (Hendrikse, 1984; Stockner en Bardwick, 1991). Kort samengevat wordt als volgt te werk gegaan:

De erectie wordt opgewekt door een lichte massage van de bulbus glandis of het caudale deel van de glans doorheen het preputium. Wanneer de bulbus begint te zwellen, wordt het preputium naar caudaal geschoven tot achter de bulbus (Figuur 1). Zo blijft het preputium gefixeerd. Men oefent verder een lichte massage uit op de urethra achter de bulbus. Als de erectie voltooid is en de reu voldoende gestimuleerd is, dan volgt de ejaculatie vrij snel. Het ejaculaat wordt bij de reu vrijgesteld in drie fracties (Figuur 2), waarbij alleen de tweede fractie sperma bevat en opgevangen dient te worden. De eerste fractie is waterhelder, bestaat uit prostaatvocht (England, 1990) en niet uit vocht van de urethraklieren zoals vroeger vaak verkeerdelijk werd aangenomen. De eerste fractie wordt in de regel niet opgevangen, te meer omdat de reu vaak nog heftige debbewegingen kan uitvoeren die het opvangen van het ejaculaat bemoeilijken. De tweede fractie is de spermarijke fractie die melk- tot roomachtig van consistentie is. Het volume van deze fractie varieert van 0,1 tot 5 ml en de lozingtijd duurt ongeveer één mi-

nuut. De derde fase bestaat uit helder prostaatvocht. Als deze fractie begint te komen, worden de stimulatie van de reu en het collecteren van het ejaculaat stopgezet, omdat het prostaatvocht de spermakwaliteit bij het invriezen negatief beïnvloedt.

Het libido van de hond kan beïnvloed worden door psychische, fysische en omgevingsfactoren. Er zijn rasverschillen in libido beschreven, zoals bijvoorbeeld bij de Ierse wolfshond die een lagere libido zou hebben dan andere rassen (Dahlbom *et al.*, 1995, 1997a). Obese dieren hebben ook een lagere libido. Alhoewel hypothyroïdie vaak beschreven wordt als een oorzaak van verminderde libido, kon in een recente studie waarbij experimenteel hypothyroïdie bij zes honden werd geïnduceerd, geen invloed van een verminderde schildklierfunctie op de reproductieve functies aangetoond worden (Johnson *et al.*, 1999), zodat het verband tussen hypothyroïdie en infertiliteit nog niet duidelijk aangetoond is. Het mislukken van een sperma-afname door een gebrek aan libido bij de reu vormt een probleem wanneer de fertiliteit van de reu geëvalueerd moet worden. Een vroegere pijnlijke ervaring bij het dekken of pijn aan rug, poten of voortplantingsstelsel kunnen dit veroorzaken. Voordat een nieuwe poging wordt ondernomen, dient een dergelijke reu grondig onderzocht te worden.

Vaak wordt de vraag gesteld hoe vaak een hond kan dekken zonder dat de spermakwaliteit vermindert. Hierbij moet een onderscheid gemaakt worden tussen de dagelijkse spermaproductie van de reu in de testis en de hoeveelheid sperma die opgeslagen zit in de epi-

didymis en ductus deferens en effectief vrijgezet wordt tijdens de ejaculatie (extragonadale reserve). Onderzoek heeft aangetoond dat bij dagelijkse sperma-afname de extragonadale reserves binnen 5-7 dagen uitgeput zijn (Olar *et al.*, 1983). De totale sperma-productie per ejaculatie wordt dan heel laag (Olar *et al.*, 1983, Boucher *et al.*, 1958). Wanneer sperma moet afgenomen worden voor een fertiliteitsonderzoek of voor invriezen is seksuele rust aan te raden gedurende 4-5 dagen vóór de spermacollectie. Men kan echter wel een extra sperma-afname doen ongeveer één uur na de eerste. Hierdoor kan men de totale hoeveelheid sperma die verkregen wordt voor inseminatie of invriezen met 70 % opdrijven (England, 1999) zonder inbreuk te doen op de spermakwaliteit.

#### CONVENTIONELE KWALITEITSCONTROLE VAN HONDENSPERMA

De conventionele kwaliteitscontrole van hondensperma bestaat zoals reeds vermeld uit het bepalen van de concentratie, de motiliteit en de morfologie.

#### Concentratie

De concentratie van sperma is een weergave van het aantal zaadcellen per volume-eenheid en is dus natuurlijk afhankelijk van het ejaculaatvolume dat werd opgevangen. Een bijmenging van prostaatvocht verdunt vanzelfsprekend de concentratie. Daarom wordt in een aantal studies de voorkeur gegeven aan de bepaling van het totaal aantal spermacellen per ejaculaat (Stockner en Bardwick, 1991, Schubert en Seager, 1991). De variatie is zeer groot (Tabel 2) dus is het moeilijk een lijn te trekken in de hoeveelheid spermacellen die geproduceerd wordt. Algemeen kan gesteld worden dat het aantal spermacellen negatief beïnvloed wordt door inteelt en door een te gering libido, waardoor er een onvolledige ejaculatie optreedt (Hendrikse, 1984). Zoals al eerder vermeld, kan een te hoge dekfrekwentie ook een nadelige invloed hebben op de sperma-output. In een uitgebreide studie in Nederland werd aangetoond dat de grootte van de hond positief gecorreleerd is met de spermaproductie (Hendrikse en Antonisse, 1984). Dit kon niet be-

Tabel 2. Correlatie fertiliteit en conventionele spermakarakteristieken volgens de literatuur.

N reuen	N spermacellen/ ejaculaat x 10 <sup>6</sup> (range)	% Motiele spermacellen	% Normale morfologie	Referentie
Fertiel (n=150)	365 (55-3560)	60 % (20-100 %)	78 % (55-95- %)	Stockner en Bardwick (1991)
Fertiel (n=23)	795 (118-1659)	81 % (68-90)	73 % (47-91)	Seager en Schubert, (1996)
Fertiel (n= 28)	563 (246-1777)	81 % (55-90)	78 % (53-93)	Schubert en Seager, (1991)
Fertiel (n= 65)	703	70 %	69 %	England (1999)
Fertiel (n= 23)	-	76 %	79 %	Oettlé, (1993)
Subfertiel (n= 15)	-	57 %	33 %	

vestigd worden in een meer recente studie met minder honden, maar ook in deze studie konden, evenals in de Nederlandse studie, rasverschillen in spermakwaliteit aangetoond worden. Meer bepaald bij de Duitse herder was de totale sperma-output significant hoger dan bij andere rassen (England, 1999). Het totaal aantal spermacellen is van belang wanneer het ejaculaat gebruikt moet worden voor verse inseminatie of wanneer het sperma ingevroren moet worden, om het aantal inseminaties te berekenen. Meestal worden er 150 miljoen verse of 300 miljoen ingevroren en ontdooide spermacellen per inseminatie ingebracht. Er bestaan echter geen literatuurgegevens over de minimale hoeveelheid sperma die nodig is om bevruchting te garanderen.

### Motiliteit

Tot op heden is de meest gebruikte methode om de fertiliteit van vers en ontdooide sperma te beoordelen het controleren van de beweeglijkheid. Dit is een subjectieve methode, waarbij door de onderzoeker, na microscopische evaluatie, een score wordt gegeven om het percentage progressief beweeglijke spermacellen aan te duiden. Vooral bij het onderzoek van vers sperma kunnen bepaalde handelingen een negatieve invloed op de motiliteit uitoefenen zoals koudeshock, langdurige incubatie in prostaatvocht of het in contact brengen met toxische substanties (bij spermacollectie of inseminatie), zoals rubber (kunstvagina), glijmiddelen, zoals K-Y lubricant jelly en Staycept jelly en spuiten (rubberstop) (England en Allen, 1992). Ook wanneer het sperma geëvalueerd wordt aan de rand bij opdrogende preparaten schat men de motiliteit te laag in. De motiliteit wordt te hoog beoordeeld bij sperma dat rond luchtbellens beweegt. Talkpoeder, afkomstig van handschoenen die gebruikt worden bij de spermaname, kan ook toxisch zijn. Een juiste behandeling van het preparaat is dus zeer belangrijk bij het schatten van de motiliteit.

Het is al bijna dertig jaar bekend dat goed beweeglijk sperma niet noodzakelijk fertiel hoeft te zijn (Pursel *et al.*, 1972), en omgekeerd kan onbeweeglijk sperma toch leefbaar zijn en beweeglijk worden wanneer het geïnsemineerd wordt of in een geschikte verdunner wordt gebracht. Cafeïne bijvoorbeeld kan de spermamotiliteit in vitro opmerkelijk verhogen door het spermametabolisme te activeren, evenals pentoxifylline, dat het meest effectief is als het tijdens het ontdooien wordt toegevoegd (Koutsarova *et al.*, 1997).

Op welk tijdstip moet de motiliteit van een spermastaal onderzocht worden? Bij vers sperma is het duidelijk dat dit het best zo snel mogelijk na de afname gebeurt. Ingevroren sperma kan onmiddellijk na ontdooien beoordeeld worden op motiliteit of het kan gedurende enkele uren bij 37°C geïncubeerd worden en pas daarna onderzocht worden (thermoresistentietest). Sommige onderzoekers hechten meer waarde aan de thermoresistentietest omdat ontdooide sperma dat in de teef gebracht wordt ook gedurende een bepaalde tijd bij een temperatuur van 37°C moet overleven. In een studie waarbij twee verschillende invriestechieken (de Andersenmethode en de CLONE-methode) met elkaar vergeleken werden, konden er bij het ontdooide sperma wel significante verschillen in thermoresistentie aangetoond worden, maar geen verschillen in drachtigheden na zowel intravaginale als intra-uteriene inseminatie (Ström *et al.*, 1997).

Er zijn slechts weinig studies beschikbaar waarbij de motiliteit gecorreleerd wordt met het percentage drachtigheden. Bij vers sperma is het nog mogelijk om drachten te verkrijgen met sperma dat een motiliteit van 20-30% vertoont en zelfs met sperma dat minder dan 10% beweeglijk is. Bij ingevroren sperma liggen de 'cut-off' waarden voor spermamotiliteit op 40% (Linde-Forsberg en Forsberg, 1989).

### Morfologie

De beoordeling van de morfologie van vers sperma wordt vooral uitgevoerd bij fertiliteitsproblemen, bij het invriezen van sperma en bij een inseminatie. De morfologie wordt meestal bestudeerd met behulp van fasecontrastlichtmicroscopie en met een eenvoudige kleurtechniek, zoals de eosine-nigrosinekleuring (Figuur 3) en de Spermac-kleuring. Een model voor het onderzoek van hondensperma is voorgesteld door Oetlé (1993), waarbij een onderscheid gemaakt wordt tussen afwijkingen aan acrosoom, kop, middenstuk en staart. Inseminatie van vers sperma van diverse reuen bij een groep teven leidde tot de vaststelling dat de fertiliteit significant lager lag na inseminatie van een spermastaal dat minder dan 60% normale spermacellen bevatte (Oetlé, 1993). Dit criterium kan dan ook als kwaliteitsstandaard gebruikt worden bij het beoordelen van sperma van een fokreue of voor een inseminatie.

Wanneer de spermamorfologie beoordeeld moet worden vóór of na invriezen, moet men met een aantal zaken rekening houden. Er werd reeds aangetoond dat spermastalen met relatief veel gebogen middenstuk-





Fig. 1. Fixatie preputium achter de bulbus van de penis bij sperma-afname van de hond.

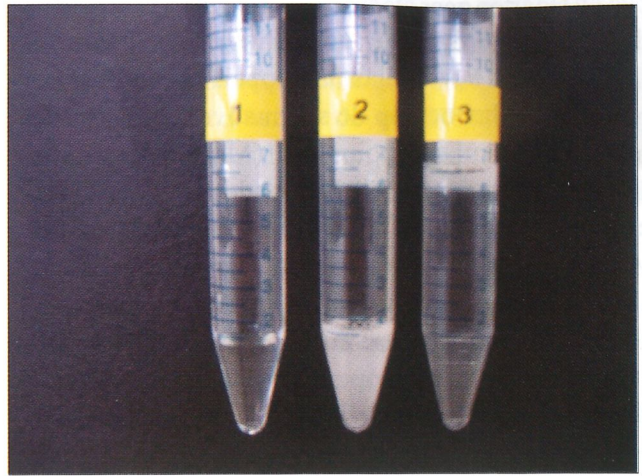


Fig. 2. Drie fracties van het ejaculaat van de hond (1. heldere prostaatfractie 2 de spermafractie 3. opnieuw prostaatfractie)

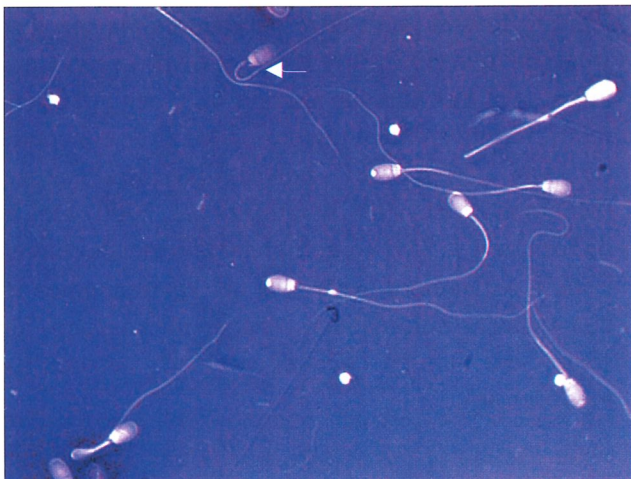


Fig. 3. Eosine-nigrosinekleuring van hondensperma (bovenaan in beeld (pijl)=dode spermacellen; de overige zijn levende, membraanintacte spermacellen).

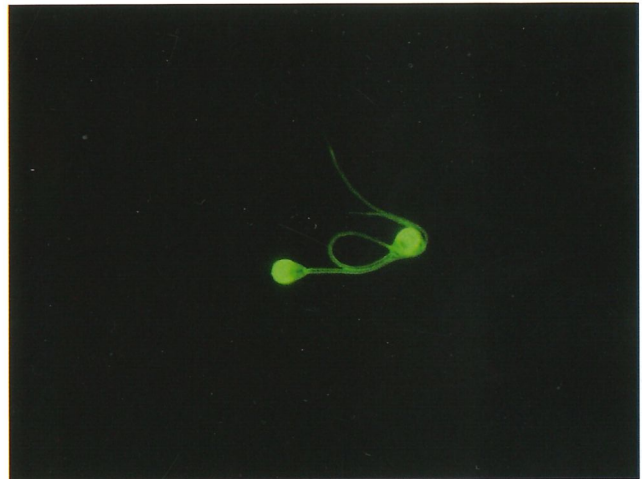


Fig. 4. PSA-kleuring van spermacellen (de kop van de cel kleurt volledig groen, wat wijst op een intacte, niet gereageerde acrosoom).

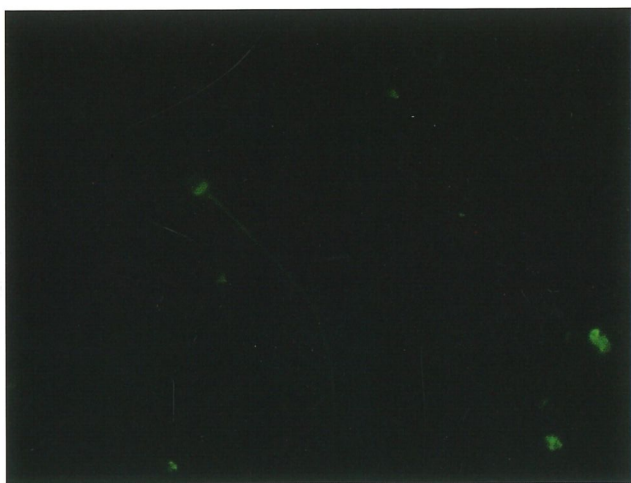


Fig. 5. PSA-kleuring van spermacellen (de acrosoom heeft gereageerd, te zien aan de groene band t.h.v. het equatoriaalvlak van de spermacel).

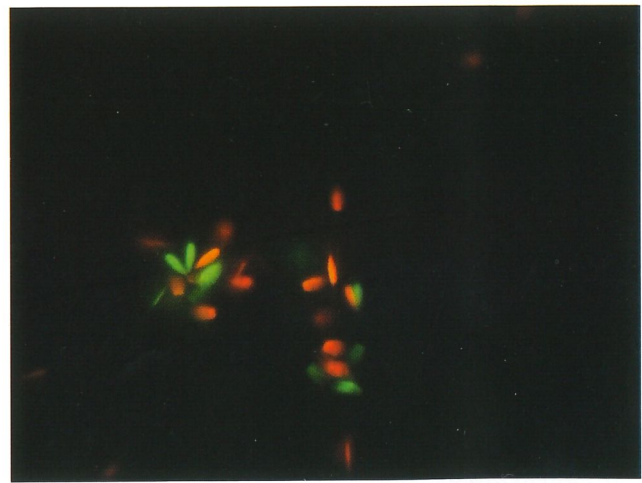


Fig. 6. SYBR14-PI-kleuring van hondensperma (de groene spermacellen hebben nog een intacte celmembraan: bij de rode spermacellen is de celmembraan niet meer intact).

ken en staarten zeer slecht in te vriezen zijn en na ontdooien geen progressieve motiliteit meer vertonen. Ook proximale protoplasmadruppels zouden een negatief effect hebben op de spermaoverleving tijdens het invries- en ontdooiproces (Morton en Bruce, 1989, Nöthling *et al.*, 1997). Standaard moet het ejaculaat 80 % normale spermacellen bevatten om invriesbaar te zijn. Tijdens het invriezen van hondensperma worden er veranderingen geïnduceerd aan de spermacelmembraan en dus ook aan de membraan van het acrosoom. Het optreden van acrosoomveranderingen na het invriezen is bij de hond goed gedocumenteerd (Oettlé, 1986; Rodriguez-Martinez *et al.*, 1993). Deze acrosoomveranderingen zijn niet altijd zichtbaar wanneer fasecontrastmicroscopie of een gewone eosine-nigrosinekleuring gebruikt wordt. Daarom is het aangewezen een speciale techniek te gebruiken om de intactheid van het acrosoom na het ontdooien te evalueren. Dit kan door middel van transmissie-elektronen microscopie of TEM (Holst *et al.*, 1998) of door middel van een specifieke acrosoomkleuring, zoals Spermac, of met FITC gelabelde pisum sativum agglutinine (PSA; figuur 4 en 5) of peanut agglutinine (PNA) (Sirivaidyapong *et al.*, 2000).

#### *Nieuwe technieken bij spermakwaliteitscontrole*

Wanneer men de correlatie van bepaalde in vitro testen met de werkelijke fertiliteit van het sperma wil bepalen, wordt het al gauw duidelijk dat slechts een combinatie van verschillende in vitro testen een aanwijzing kan geven over het werkelijk in vivo bevruchtend vermogen van het sperma (Amann, 1989). Het is namelijk zo dat sperma, zoals reeds eerder gezegd, verschillende functies moet kunnen uitvoeren en dat de bevruchting van een eicel door een zaadcel bestaat uit het succesvol verloop van een cascade van reacties. Hoe meer spermacellen in een ejaculaat in staat zijn om deze stappen te doorlopen, hoe meer kans er op bevruchting is.

In vitro testen die deze verschillende functies controleren zijn gedurende de laatste jaren met de opkomst van de moderne voortplantingstechnieken meer en meer in voege gekomen.

#### *Functionele motiliteit*

Het beoordelen van de motiliteit kan door middel van de bovenvermelde subjectieve methode, maar is gedurende de laatste jaren verfijnd door de opkomst van computergeassisteerde sperma-analyse en sper-

mamigratietesten. De computeranalyse van spermamotiliteit geeft vergelijkbare resultaten met die van de subjectieve analyse over de progressieve motiliteit en kan daarbij nog extra informatie geven over de snelheid van de spermacellen en de lineariteit waarmee ze zwemmen (Günzel-Apel *et al.*, 1993; Mogas *et al.*, 1998). Subtiele veranderingen in het motiliteitspatroon die indicatief zijn voor capacitatie kunnen zo opgemerkt worden (Rota *et al.*, 1999). Andere methoden waarmee de motiliteit onderzocht kan worden is de transmigratietest, waarbij het aantal spermacellen dat naar het oppervlak van medium in een proefbuis zwemt, wordt geteld (Schäfer *et al.*, 1997). Ook de Sperm Quality Analyzer (SQA), een toestel dat in de humane geneeskunde wordt gebruikt, kan aangewend worden om drie parameters, namelijk de concentratie, de morfologie en de motiliteit, te bepalen. Dit toestel geeft deze parameters als een getal weer: de Sperm Motility Index of SMI. In een studie uitgevoerd met humaan sperma werd een goede correlatie teruggevonden tussen de SMI en de concentratie van progressief beweeglijke spermatozoa (Mahmoud *et al.*, 1998, Martinez *et al.*, 2000). Ook bij de hond zou de SMI vergelijkbaar zijn met de conventionele parameters, waardoor het spermaonderzoek dus volledig automatisch, zonder microscoop, kan uitgevoerd worden (Verstegen, 1997, persoonlijke mededeling).

#### *Thermoresistentietest*

Zoals reeds vermeld wordt de kwaliteit van ontdooid sperma soms gerelateerd aan de duur van de overleving bij 38°C (thermoresistentietest). De motiliteit van het sperma wordt tot 4 uur na de start van de incubatie beoordeeld, waarbij de motiliteit afneemt van 40-50 % onmiddellijk na het ontdooien tot 5-15 % na 4 uur incubatie (Pena *et al.*, 1998a). De behandeling met pentoxyfylline verbetert de motiliteit tot ongeveer 30 % na 5-6 uur bij 38°C (Koutsarova *et al.*, 1997). De thermoresistentietest is een indicator om de fertiliteit te voorspellen bij de mens (Stovall *et al.*, 1994) en bij het varken (Larsson en Einarsson, 1976). Bij de hond is de betrouwbaarheid van de test echter omstreden (Ström *et al.*, 1997).

#### *Morfometrie*

Spermamorfologie kan ook door middel van computergestuurde beeldanalysesystemen beoordeeld worden. Hondensperma is anisospermisch, dit wil zeggen dat niet alle spermacellen een identieke groot-



te of vorm hebben. Kopafwijkingen zijn belangrijker dan afwijkingen van de staart en het middenstuk. Met behulp van de computer kan men de spermakoppen opmeten en zodoende de objectiviteit, de betrouwbaarheid en de herhaalbaarheid van de procedure vergroten. Omdat bij normale honden veel variatie bestaat in afmetingen van de spermakop en omdat de kleurtechniek de grootte van de spermakoppen kan beïnvloeden, moet er nog meer onderzoek gebeuren vooraleer deze techniek in de routinespermabeoordeling kan ingeschakeld worden (Dahlbom *et al.*, 1997b)

#### *Membraanintactheid*

Meestal wordt de intactheid van de spermamembraan getest door middel van een supravitaalkleuring, zoals eosine-nigrosine, waarbij de eosinekleurstof penetreert door beschadigde membranen heen. De laatste jaren is een aantal fluorescerende kleurstoffen op de markt gekomen die dezelfde eigenschappen hebben. Zo werd de combinatie carboxifluoresceïne diacetaat (CFDA) en propidium jodide (PI) reeds met goed gevolg toegepast bij hondensperma. Levende spermacellen fluoresceren groen (CFDA) en dode zijn rood (PI) (Pena *et al.*, 1998b). Het voordeel van deze techniek is dat de spermacellen niet alleen onder de microscoop maar ook door middel van flow cytometrie beoordeeld kunnen worden, wat toelaat om veel grotere aantallen op korte tijd te onderzoeken. Momenteel is er een commerciële kit op de markt, de Live-Dead stain (Molecular Probes), die dezelfde resultaten geeft maar waarvan de componenten bestaan uit SYBR14 en PI (Figuur 6), en die reeds uitgetest werd met stierensperma (De Pauw *et al.*, 1999) en hondensperma.

Een andere manier om de membraanintactheid te onderzoeken is de hypo-osmotische zwellingsstest (HOS). Als spermacellen in een hypotoon medium geïncubeerd worden, nemen ze water op en begint de staart op te rollen (England en Plummer, 1993). Deze test zou eerder de functionaliteit van de membraan nagaan, waarbij ook lichtere membraanbeschadigingen aangetoond worden.

#### *Vermogen tot acrosoomreactie*

Nieuwe fluorescente kleurstoffen kunnen gebruikt worden om de acrosoomreactie bij hondensperma aan te tonen. Voordelen van het gebruik van fluorescerende kleurstoffen zijn dat zowel de functie als de morfologie van de spermacellen kunnen onderzocht worden zonder interferentie van de media. Ook is het kleurpa-

troon van de spermacellen meer consistent. Verschillende functionele parameters kunnen met verschillende kleurstoffen tegelijkertijd geëvalueerd worden. Meestal wordt de acrosoomreactie aange-toond met lectines die geconjugeerd zijn aan fluoresceïne, zoals Peanut Agglutinine (PNA) (Sirivaidya-pong *et al.*, 2000) of Pisum Sativum Agglutinine (PSA) (Pena *et al.*, 1999a en 1999b). PSA kan gecombineerd worden met Carboxy-SNARF-1 en PI om de levend-dood verhouding in een spermastaal te bepalen (Pena *et al.*, 1999a). Een interessante nieuwe ontwikkeling in dit opzicht is dat men door het kunstmatig induceren van de acrosoomreactie in een vers spermastaal kan voorspellen hoe goed het sperma in te vriezen is (Szasz *et al.*, 2000b).

#### *Zonabinding*

De acrosoomreactie vindt plaats ter hoogte van de zona pellucida en het sperma bindt dan aan de zona om deze vervolgens te penetreren en dan met de eicel te versmelten. Bij verschillende diersoorten is er een test ontwikkeld om de zonabindingscapaciteit van spermastalen te onderzoeken. Deze test is de Hemizona-assay (HZA). Hiertoe wordt een eicel van een hond door middel van micromanipulatie in twee gekleefd. De zona valt dan uiteen in twee helften en elke helft wordt met een spermastaal geïncubeerd. De spermacellen binden aan de zona en het aantal gebonden cellen kan bepaald worden. Zo kan men de zonabinding van een subfertiele reu vergelijken met die van een fertiele reu (Mayenco-Aguirre en Perez-Cortes, 1998). Of men kan de binding van een ingevroren spermastaal vergelijken met de binding van een vers spermastaal (Ivanova *et al.*, 1999).

#### *Eicelpenetratie*

De ultieme test is het onderzoeken of het sperma in staat is een eicel te bevruchten. In vitro fertilisatie kan nu al bij een aantal van onze huisdieren uitgevoerd worden maar is nog niet zo ver ontwikkeld bij de hond, tenminste niet met een normale embryonale ontwikkeling als gevolg. Uniek bij de hond is het feit dat onrijpe eicellen ook gepenetreerd kunnen worden (Mahi en Yanagimachi, 1976). Door deze eigenschap kunnen onrijpe hondeneicellen gebruikt worden in een functionele test voor hondenspermacellen (Hewitt en England, 1997) om de bevruchtungskracht van ingevroren sperma te beoordelen en zelfs om de spermakwaliteit van wolven na te gaan (Hay *et al.*, 1997).

## CONCLUSIE

Het is duidelijk dat de beoordeling van hondensperma nu veel vollediger kan gebeuren dan pakweg tien jaar geleden. Met de nieuwe onderzoeksmethoden is het mogelijk de verschillende functies die een spermacel moet bezitten om een eikel te kunnen bevruchten, preciezer te beoordelen. Dit kan vooral nuttig zijn om de fertiliteit van ingevroren sperma te beoordelen. Hoewel de oude, vertrouwde parameters, namelijk de motiliteit, de concentratie en de morfologie, niet altijd een exact beeld geven van het werkelijk bevruchtend vermogen van spermacellen, zijn ze voor de beoordeling van vers sperma nog zeker voldoende.

## REFERENTIES

- Amann R (1989) Can the fertility potential of a semen sample be predicted accurately? *Journal of Andrology* 10, 89-98.
- Boucher J.H., Foote R.H., Kirk R.W. (1958). The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves. *Cornell Veterinary* 48, 67-86.
- Dahlbom M, Andersson M, Huszenicza G, Alanko M (1995) Poor semen quality in Irish Wolfhounds : a clinical, hormonal and spermatological study. *The Journal of Small Animal Practice* 36, 547-552.
- Dahlbom M, Andersson M, Juga J, Alanko M (1997a) Fertility parameters in male Irish Wolfhounds : a two year follow-up study. *The Journal of Small Animal Practice* 38, 547-550.
- Dahlbom M, Andersson M, Vierula M, Alanko M (1997b) Morphometry of normal and teratozoospermic canine sperm heads using an image analyzer: work in progress. *Theriogenology* 48, 687-698.
- 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 Abstract p140.
- England GCW (1990) An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Research in Veterinary Science* 49, 66-70.
- England GCW (1999) Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriogenology* 52, 981-986.
- England GCW, Allen WE (1992) Factors affecting the viability of canine spermatozoa. 1. Potential influences during processing for artificial insemination. *Theriogenology* 37, 363-371.
- England GCW, Plummer JM (1993) Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility suppl.* 47, 261-270.
- Günzel-Apfel AR, Günther C, Terhaer P, Bader H (1993) Computer-assisted analysis of motility, velocity and liness of dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 47, 271-278.
- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL (1997) Canine spermatozoa-cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* 48, 1329-1342.
- Hendrikse J (1984) Een literatuuroverzicht van het verzamelen en beoordelen van reuesperma. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 109, 175-179.
- Hendrikse J, Antonisse HW (1984) Beoordelen van reuesperma. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 109, 171-174.
- Hewitt DA, England GCW (1997) The canine oocyte penetration assay ; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Animal Reproduction Science* 50, 123-139.
- Holst Ström BS, Rota A, Andersen Berg K, LindeForsberg C, Rodriguez-Martinez H (1998) Canine sperm head damage after freezing-thawing: ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reproduction in Domestic Animals* 33, 77-82.
- Ivanova M, Mollova M, Ivanova-Kicheva MG, Petrov M, Djarkova TS, Somlev B (1999) Effect of cryopreservation on zona-binding capacity of canine spermatozoa in vitro. *Theriogenology* 52, 163-170.
- Johnson C, Olivier NB, Nachreiner R, Mullanaye T (1999) Effect of 131-I induced hypothyroidism on indices of reproductive function in adult male dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 13, 104-110.
- Koutsarova N, Todorov P, Koutsarov G (1997) Effect of pentoxifylline on motility and longevity of fresh and thawed dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 51, 117-121.
- Larsson K, Einarsson S (1976) Influence of boars on the relationship between fertility and post-thawing sperm quality of deep frozen boar spermatozoa. *Acta Veterinaria Scandinavica* 17, 74-82.
- Linde-Forsberg C. and Forsberg M. (1993) Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 47, 313-323.
- Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DI (1976) The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *Journal of Reproduction and Fertility* 47, 283-291.
- Mahi CA, Yanagimachi R (1976) Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes in vitro. *Journal of Experimental Zoology* 196, 189-196.
- Mahmoud AMA, Gordts S, Vereecken A, Serneels A, Campo R, Rombauts L, Comhaire FH (1998) Performance of the sperm quality analyzer in predicting the outcome of assisted reproduction. *International Journal of Andrology* 21, 41-46.
- Martinez C, Mar C, Azcarate M, Pascual P, Aritzeta JM, Lopez-Urrutia A (2000) Sperm motility index: a quick screening parameter from sperm quality analyser IIB to rule out oligo- and asthenozoospermia in male fertility study. *Human Reproduction* 15, 1727-1733.
- Mayenco-Aguirre AM, Pérez Cortés AB (1998) Preliminary results of hemizona assay (HZA) as a fertility test for canine spermatozoa. *Theriogenology* 50, 195-204.



- Mogas T, Rigau T, Piedrafita J, Bonet S, Rodriguez-Gil JE (1998) Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen. *Theriogenology* 50, 1171-1189.
- Morton DB, Bruce SG (1989) Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* 39, 311-316.
- Nöthling JO, Gerstenberg C, Volkmann DH (1997) Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.* 51, 109-116.
- Oettlé EE (1986) Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Animal Reproduction Science* 12, 145-150.
- Oettlé EE (1993) Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction and Fertility* 47, 257-260.
- Olar TT, Amann RP, Pikett BW (1983) Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa and extragonadal reserves of the dog. *Biology of Reproduction* 29, 1114-1120.
- Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradon PG (1998a) Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology* 50, 163-174.
- Peña AI, Quintela LA, Herradon PG (1998b) Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology* 50, 1211-1220.
- Peña AI, Johannisson A, LindeForsberg C (1999a) Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 52, 965-980.
- Peña AI, Quintela LA, Herradon PG (1999b) Flow cytometric assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 34, 495-502.
- Pursel VG, Johnson LA, Shulmann LL (1972) Loss of boar fertilising capacity associated with altered acrosome morphology during in vitro storage. *VIIth International Congress on Animal Reproduction & Artificial Insemination* 3, 1525-1600.
- Rodriguez-Martinez H, Ekwall H. and Linde-Forsberg C. (1993). Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 47, 279-285.
- Rota A, Pena AI, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez H (1999) In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Animal Reproduction Science* 57, 199-215.
- Schäfer S, Holzmann A, Arbeiter K (1997) Untersuchungen zur transmigrationsrate von kurzzeitkonservierten Hundesperma. *Reproduction in Domestic Animals* 32, 285-289.
- Schubert CL, Seager SWJ (1991) Semen collection and evaluation for the assessment of fertility parameters in the male dalmatian. *Canine practice* 16 (5), 17-21.
- Seager SWJ, Schubert CL (1996) Semen collection and evaluation for the clinical assessment of fertility parameters in the male Rottweiler. *Canine Practice* 21, 30-34.
- Sirivaidyapong S, Cheng FP, Marks A, Voorhout WF, Bevers MM, Colenbrander B (2000) Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology* 53, 789-802.
- Stockner PK, Bardwick C (1991) The relationship of semen parameters to fertility in the dog. *Canine practice* 16 (2), 15-23.
- Stovall DW, Guzick DS, Berga SL, Krasnow JS, Zeleznik AJ (1994) Sperm recovery and survival : two tests that predict in vitro fertilization outcome. *Fertility and Sterility* 62, 1244-1249.
- Ström B, Rota A, Linde-Forsberg C (1997) In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology* 48, 247-256.
- Szasz F, Sirivaidyapong S, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Colenbrander B, Solti L, Gadella BM (2000b) Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Molecular Reproduction and Development* 55, 289-298.