

# ANALYSIS OF BOVINE SPERM DNA INTEGRITY BY FLOW CYTOMETRY

## ANALÝZA INTEGRITY DNA BOVINNÍCH SPERMIÍ POMOCÍ METODY FLOW CYTOMETRY

**Peslarová Z., Máchal L., Machatková M.**

Ústav chovu hospodářských zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

Laboratoř reprodukční biotechnologie, oddělení Genetiky a reprodukce, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno Česká republika

E-mail: peslarova@seznam.cz

### ABSTRACT

The purpose of the present study was to standardize Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) method and to employ it in monitoring DNA integrity changes in a population of motile spermatozoa capacitation in heparin used for in vitro fertilization. Immediately after sperm thawing, Percoll separation of motile spermatozoa, 3 and 6 h incubation of spermatozoa without/with heparin, samples were collected and analyzed using Becton Dickinson flow cytometer (Evenson et al 2000). Mean percentages of spermatozoa with non-detectable (non-DFI) and detectable (det-DFI) DNA fragmentation index were determined by SCSA-software. The data obtained were evaluated statistically using Student t-test. The process of separation did not cause any decrease in percentages of spermatozoa with unimpaired chromatin integrity in any of the four tested bulls, moreover, significant increase was observed in one bull. During capacitation, the percentage of spermatozoa with unimpaired chromatin integrity gradually decreased in all investigated bulls, and statistically significant differences between sperm populations incubated with and without heparin were recorded in two of them. The SCSA method was confirmed to be suitable for monitoring of chromatin structure alterations in sperm used for in vitro fertilization. The present study documented that motile sperm separation did not adversely affect the percentage spermatozoa with unimpaired DNA integrity. High variability in chromatin integrity in spermatozoa capacitated with heparin was detected amongst the tested bulls.

**Keywords:** sperm, DNA integrity, flow cytometry, SCSA

### ABSTRAKT

Cílem práce bylo standardizovat metodu Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) a využít

ji pro monitorování změn integrity DNA v populaci motilních spermií kapacitovaných heparinem, které jsou používány k in vitro fertilizaci. Bezprostředně po rozmrazení spermatu, separaci motilních spermií na gradientu Percollu, 3 a 6-ti hod. inkubaci spermií bez nebo v přítomnosti heparinu byly odebrány vzorky, které byly vyšetřeny na Becton Dickinson flow cytometru (Evenson et al 2000). Pomocí SCSA-software byly stanoveny průměrné podíly spermií s nedetekovatelným (non-DFI) a detekovatelným (det-DFI) indexem DNA fragmentace. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu. Separace nesnížila podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu u žádného ze čtyř testovaných býků, u jednoho býka jej signifikantně zvýšila. V průběhu kapacitace došlo k postupnému poklesu podílu spermií s neporušeným chromatinem u všech sledovaných býků, u dvou z nich byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi populací spermií inkubovaných bez nebo v přítomnosti heparinu. Bylo potvrzeno, že metoda SCSA je vhodná pro monitorování změn struktury chromatinu spermií používaných k in vitro fertilizaci. Bylo prokázáno, že separace motilních spermií neovlivňuje negativně podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu. Bylo potvrzeno, že změny integrity chromatinu spermií kapacitovaných v přítomnosti heparinu jsou u býků vysoce variabilní.

**Klíčová slova:** spermie, integrita DNA, průtoková cytometrie, SCSA

## ÚVOD

Vyšetření spermatu pomocí průtokové cytometrie patří mezi metody umožňující objektivní vyšetření kvalitativních ukazatelů ejakulátu, jako jsou viabilita spermií, intaktnost akrozómu, mitochondriální aktivita spermií a integrita DNA. (Nagy, et al. 2004; Watson, et al. 2002; Evenson, et al. 2000; Graham, et al. 1990). Pro vyhodnocení integrity chromatinu spermií ve spermatu byla vypracována metoda SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay). Tuto metodu popsal Donald Evanson a Lorna Jost (2000).

Pro úspěšný průběh fertilizace v podmínkách in vitro je potřebována populace viabilních, motilních spermií, kterou je možno získat pomocí účinných separačních technik z rozmrazeného spermatu. Stále zůstává nevyřešena otázka, proč někteří býci dosahující výborných výsledků v inseminaci mají špatné výsledky v in vitro systému. V průběhu separace dojde nejen k odstranění ředidla a nemotilních spermií, ale současně může být narušena integrita DNA motilních spermií.

Cílem práce bylo standardizovat metodu Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) a využít ji pro monitorování změn integrity DNA v populaci motilních spermií separovaných a kapacitovaných za standardních podmínek v přítomnosti heparinu.

## **METODIKA**

V experimentech bylo použito zmrazené sperma 4 mladých býků (A, B, C, D), českého strakatého plemene, s testovanou oplozovací schopností v inseminaci (60,2%-66,4% březost)

a in vitro systému (8,02%-32,8%embryí ). Po rozmrazení inseminačních dávek ve vodní lázni

o teplotě 37 °C po dobu 60 sekund byl odebrán vzorek a sperma bylo navrstveno na gradient Percollu. Po 30 minutové centrifugaci při 700 G byl supernatant obsahující mrtvé spermie a ředidlo odstraněn a pelet byl dvakrát promyt médiem pomocí centrifugace po dobu 10 minut při 200 G. Následně byl resuspendován ve 100μl Tyrodova fertilizačního média a naředěn na koncentraci 25 mil. spermií/ml. Současně byl odebrán vzorek spermií po separaci (P0). Suspenze spermií byla rozdělena na dva alikvoty, k jednomu z nich byl přidán heparin. (10μg/ml). Po 3 a 6 hodinách inkubace byly odebrány vzorky spermií inkubovaných bez (P3, P6) a s heparinem (P3H, P6H). Odebrané vzorky byly naředěny TNE puforem (0,05M NaCl; 0,01M Tris; 0,001M EDTA; pH 7,4) na výslednou koncentraci 1,5mil./ml a byly zamrazeny a uchovávány při -80°C až do jejich vyšetření. Bezprostředně před analýzou byly vyšetřované vzorky rozmrazeny ve vodní lázni při 37 °C a uloženy na led až do vyšetření. Do plastové zkumavky bylo napipetováno 100μl vzorku a 200μl kyselého roztoku s detergentem pH 1,2 po 30 vteřinách se přidalo 600μl akridinové oranže (AO), zkumavka byla vložena do flowcytometru, kde vzorek protékal průtokem cca 200 spermií/sekundu, po 3 minutách od přidání kyselého roztoku s detergentem byl vzorek měřen.. U každého vzorku byly provedeny dvě měření po 5000 spermií. Pomocí SCSA softwaru byly získány podíly spermií s nedetekovatelným indexem DNA fragmentace (non DFI), tj. s nepoškozenou strukturou chromatinu a spermií s detekovatelným indexem DNA fragmentace (det DFI) tj.s poškozenou strukturou chromatinu. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány pomocí Studentova t-testu a vyjádřeny jako průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami.

## VÝSLEDKY A DISKUZE

Separace motilních spermií na gradientu Percollu zvýšila podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu u všech testovaných býků, účinnost separace byla tím vyšší, čím nižší byl podíl spermií s neporušenou DNA ve spermatu po rozmrazení (tab.1). K nejvýraznějšímu zvýšení podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu došlo u býka B, u kterého byl zjištěný rozdíl statisticky vysoce významný ( $P \leq 0,001$ ).

Tab. 1: Charakteristika struktury chromatinu spermií býků před a po separaci

| Býk | Před separací           |                         | Po separaci             |                         |
|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
|     | Podíl spermií s non DFI | Podíl spermií s dec DFI | Podíl spermií s non DFI | Podíl spermií s dec DFI |
| A   | 95,88                   | 4,13                    | 98,13                   | 1,87                    |
| B   | 80,15 <sup>a</sup>      | 19,86 <sup>a</sup>      | 93,26 <sup>b</sup>      | 6,74 <sup>b</sup>       |
| C   | 95,13                   | 4,87                    | 97,15                   | 2,86                    |
| D   | 97,84                   | 2,16                    | 98,19                   | 1,81                    |

Rozdíly hodnot v řadách s odlišným indexem jsou statisticky významné ( $P \leq 0,01$ )

V průběhu inkubace spermií bez heparinu byly zjištěny rozdíly v podílu spermií s non DFI mezi jednotlivými býky. U 2 ze 4 testovaných býků byly prokázány signifikantní rozdíly ( $P \leq 0,05$ ) v podílu spermií s non DFI inkubovaných bez heparinu ve srovnání se spermiemi inkubovanými v přítomnosti heparinu.

Podíly spermií s neporušenou a porušenou strukturou chromatinu u býka A v průběhu inkubace bez a v přítomnosti heparinu jsou shrnuty v tabulce 2.

Tab. 2: Charakteristika struktury chromatinu spermií býka A v průběhu inkubace

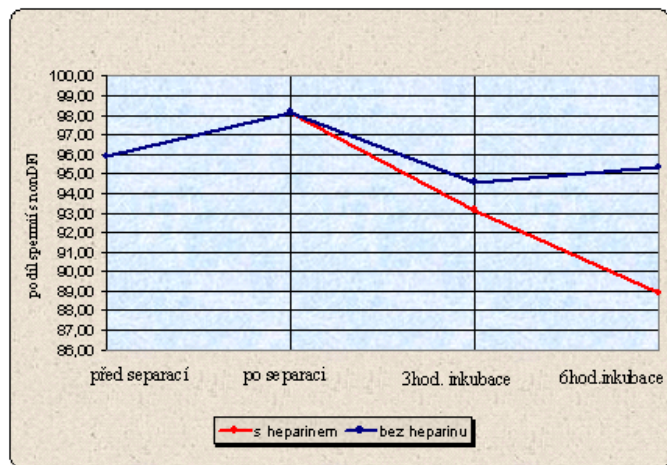
| Vzorek | Podíl spermií s non DFI |                    | Podíl spermií s det DFI |                   |
|--------|-------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------|
|        | n                       | %                  | n                       | %                 |
| P0     | 4906,50                 | 98,13 <sup>a</sup> | 93,50                   | 1,87 <sup>a</sup> |
| P3     | 4728,75                 | 94,58 <sup>b</sup> | 271,25                  | 5,43 <sup>b</sup> |
| P3H    | 4658,00                 | 93,16              | 342,00                  | 6,84              |
| P6     | 4767,00                 | 95,34              | 233,00                  | 4,66              |
| P6H    | 4445,25                 | 88,91              | 554,75                  | 11,10             |

Rozdíly hodnot ve sloupcích s odlišným indexem jsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )

Během inkubace spermií bez heparinu a s heparinem nebyl u býka A prokázán statisticky významný rozdíl v podílu spermií s non DFI, i když spermie inkubované bez heparinu (P3 a P6) vykazovaly nižší poškození struktury chromatinu než spermie inkubované s heparinem (P3H a P6H). V průběhu inkubace motilních spermií bez heparinu (P0, P3, P6)

byl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $P \leq 0,05$ ) v podílu spermií s non DFI mezi časovými intervaly 0 a 3 hodin (graf 1).

*Graf 1: Změny struktury chromatinu spermií býka A v průběhu a inkubace*



Podíly spermií s neporušenou a porušenou strukturou chromatinu u býka B v průběhu inkubace bez a v přítomnosti heparinu jsou shrnuty v tabulce 3.

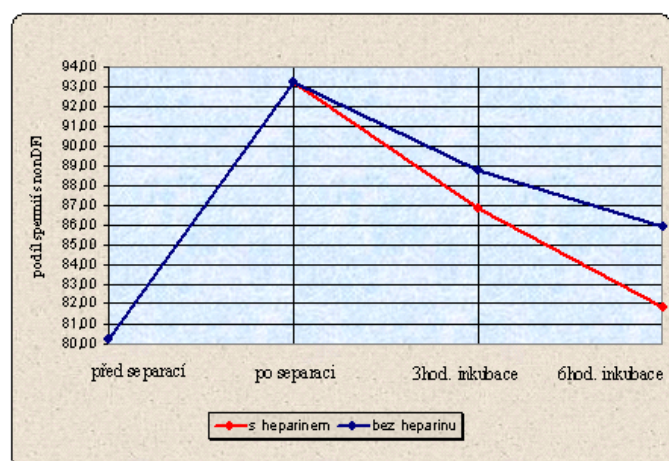
*Tab. 3: Charakteristika struktury chromatinu spermií býka B v průběhu inkubace*

| Vzorek | Podíl spermií s non DFI |                     | Podíl spermií s det DFI |                     |
|--------|-------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
|        | n                       | %                   | n                       | %                   |
| P0     | 4663,00                 | 93,26 <sup>a</sup>  | 6,74                    | 6,74 <sup>a</sup>   |
| P3     | 4441,00                 | 88,82 <sup>bc</sup> | 11,18                   | 11,18 <sup>bc</sup> |
| P3H    | 4341,00                 | 86,82 <sup>d</sup>  | 13,18                   | 13,18 <sup>d</sup>  |
| P6     | 4294,75                 | 85,90 <sup>be</sup> | 14,11                   | 14,11 <sup>be</sup> |
| P6H    | 4090,25                 | 81,81 <sup>f</sup>  | 18,20                   | 18,20 <sup>f</sup>  |

Rozdíly hodnot ve sloupcích s odlišným indexem (a-b, c-d, e-f) jsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )

U býka B byl prokázán statisticky významný rozdíl ( $P \leq 0,05$ ) v podílu spermií s non DFI, v průběhu inkubace motilních spermií bez a v přítomnosti heparinu, přičemž spermie inkubované bez heparinu (P3 a P6) vykazovaly nižší míru poškození struktury chromatinu než spermie inkubované v přítomnosti heparinu (P3H a P6H). V průběhu inkubace motilních spermií bez přítomnosti heparinu (P0, P3, P6) byly rovněž prokázány statisticky významné rozdíly ( $P \leq 0,05$ ) v podílu spermií s poškozenou strukturou chromatinu (graf 2).

Graf 2: Změny struktury chromatinu spermií býka B v průběhu inkubace



Podíly spermií s neporušenou a porušenou strukturou chromatinu u býka C v průběhu inkubace bez a v přítomnosti heparinu jsou shrnuty v tabulce 4.

Tab. 4: Charakteristika struktury chromatinu spermií býka C v průběhu inkubace

| Vzorek | Podíl spermií s non DFI |       | Podíl spermií s det DFI |      |
|--------|-------------------------|-------|-------------------------|------|
|        | n                       | %     | n                       | %    |
| P0     | 4857,25                 | 97,15 | 142,75                  | 2,86 |
| P3     | 4753,75                 | 95,08 | 246,25                  | 4,93 |
| P3H    | 4794,00                 | 95,88 | 206,00                  | 4,12 |
| P6     | 4736,50                 | 94,73 | 263,50                  | 5,27 |
| P6H    | 4833,50                 | 96,67 | 166,50                  | 3,33 |

V průběhu inkubace populace motilních spermií bez i s heparinem nebyly u býka C zjištěny statisticky významné rozdíly v podílu spermií s non DFI. Charakter průběhu poškození chromatinu spermií byl u tohoto býka téměř na stejné úrovni po celou dobu inkubace a po 6 hodinové inkubaci bez i s heparinem se jevila jako mírně lepší varianta s heparinem (graf 3).

Graf 3: Změny struktury chromatinu spermií býka C v průběhu inkubace



Podíly spermií s neporušenou a porušenou strukturou chromatinu u býka D v průběhu inkubace bez a v přítomnosti heparinu jsou shrnuty v tabulce 5.

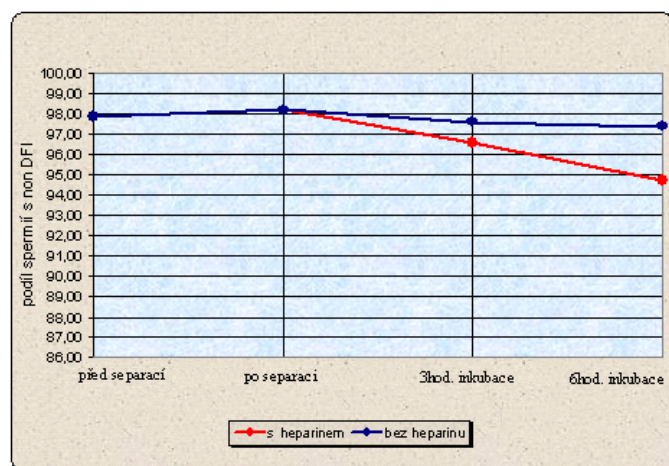
Tab. 5: Charakteristika struktury chromatinu spermií býka D v průběhu inkubace

| Vzorek | Podíl spermií s non DFI |                     | Podíl spermií s det DFI |                   |
|--------|-------------------------|---------------------|-------------------------|-------------------|
|        | n                       | %                   | n                       | %                 |
| P0     | 4909,50                 | 98,19 <sup>a</sup>  | 90,50                   | 1,81              |
| P3     | 4881,00                 | 97,62               | 119,00                  | 2,38 <sup>a</sup> |
| P3H    | 4827,75                 | 96,56               | 172,25                  | 3,45 <sup>b</sup> |
| P6     | 4869,25                 | 97,39 <sup>bc</sup> | 130,75                  | 2,62 <sup>c</sup> |
| P6H    | 4734,50                 | 94,69 <sup>d</sup>  | 265,50                  | 5,31 <sup>d</sup> |

Rozdíly hodnot ve sloupcích s odlišným indexem (a-b, c-d) jsou statisticky významné ( $P \leq 0,05$ )

U býka D byl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $P \leq 0,05$ ) v průběhu inkubace motilních spermií bez a s heparinem pouze u vzorků P6 a P6H, přičemž vzorek P6H vykazoval vyšší podíl poškození chromatinu než vzorek (P6). V průběhu inkubace motilních spermií bez přítomnosti heparinu (P0, P3, P6) byl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $P \leq 0,05$ ) v poškození struktury chromatinu až mezi vzorky P0 a P6 u vzorků P0 a P3 nebyl ještě rozdíl statisticky významný (graf 4).

Graf 4: Změny struktury chromatinu spermií býka D v průběhu inkubace



## ZÁVĚR

Bylo potvrzeno, že metodu SCSA lze použít pro vyšetření struktury chromatinu motilních spermií býků používaných k fertilizaci v in vitro systému.

Bylo prokázáno, že separace motilních spermií na gradientu Percollu neovlivnila negativně podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu u žádného z testovaných býků

Mezi testovanými býky byly v průběhu inkubace spermií bez heparinu zjištěny rozdíly v podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu a byly prokázány signifikantní rozdíly mezi spermiemi inkubovanými bez a v přítomnosti heparinu.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Evenson, D., Jost L., 2000: *Sperm chromatin structure assay for fertility assesment*. Current protocols in cytometry.
- Graham, J.K., Kunze, E., Hammerstedt, R.H., 1990: *Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry*. Biology of reproduction, 43, 55-64
- Nagy, S., Hallap, T., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H., 2004: *Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry*. Animal Reproduction Science, 80, 225-235.
- Watson, P.F., Cariese, S., 2002: *Use of a triple stain and flow cytometry to asses the proportion of live bull spermatozoa with intact acrosomes*. Reproduction , 29, 12-13.