

# MONITORING OF MORFOLOGICAL CHANGES OF ACROSOME IN BOVINE SPERMATOOZOA USING THE FIX VITAL STAIN ASSAY AND FLUORESCENCE TECHNIQUE

## SLEDOVANIE ZMIEN AKROZÓMU BOVINNÝCH SPERMIÍ POMOCOY METÓDY VITÁLNEHO FARBENIA (FIX VITAL STAIN ASSAY) A FLUORESCENČNÉHO VYŠETRENIA

**Molnárová Z.**

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

E-mail: zuzana@mendelu.cz

### ABSTRACT

One of the topical tasks in the field of reproductive biotechnology is to study and predict bull fertility in *in vivo* and *in vitro* conditions. Objective of the study was to assess capacitation and the onset of acrosome reaction in the population of motile spermatozoa incubated under standard conditions in the presence of heparin. To monitor the kinetics of the acrosome changes in spermatozoa of individual bulls, the fix vital stain assay (FVSA) and fluorescence technique were used. Motile spermatozoa were obtained from frozen sperm of 13 young bulls of the Bohemian Spotted cattle breed by centrifugation Percoll gradient. The spermatozoa were incubated at laboratory temperature in modified Tyrode's medium supplemented with albumin, lactate, pyruvate and 10  $\mu\text{g}$  of heparin per ml. A total of 800 spermatozoa stained with bisbenzimid Hoechst 33258 were examined in each of the bulls. The percentages of spermatozoa with reacting acrosome (A1), intact acrosome (B1), and without acrosome (C1) after 1-h incubation and of spermatozoa with reacting acrosome (A6), intact acrosome (B6) and without acrosome after 6-h incubation from the total number of evaluated spermatozoa were assessed. The individual bulls showed different response to heparin, which classified them into three groups. In bulls with a very fast response to heparin (group 1,  $n = 5$ ), the monitored spermatozoa populations showed the following mean values ( $\pm\text{SD}$ ):  $A1 = 95.8 \pm 3.6$ ,  $B1 = 2.9 \pm 3.5$ ,  $C1 = 1.1 \pm 0.5$  after 1-h incubation, and  $A6 = 96.2 \pm 1.3$ ,  $B6 = 0.2 \pm 0.6$ ,  $C6 = 3.5 \pm 1.2$  after 6-h incubation. In bulls with a medium-fast reaction to heparin (group 2,  $n = 5$ )  $A1 = 82.0 \pm 8.2$ ,  $B1 = 16.4 \pm 8.5$ ,  $C1 = 1.5 \pm 1.2$  after 1-h incubation, and  $A6 = 92.6 \pm 2.3$ ,  $B6 = 3.7 \pm 2.8$ ,  $C6 = 3.9 \pm 1.8$  after 6-h incubation and in bulls with a slow reaction to heparin (group 3,  $n = 3$ )  $A1 = 39.1 \pm 3.4$ ,  $B1 = 60.3 \pm 3.4$ ,  $C1 = 0.5 \pm 0.3$  after 1h-hour incubation, and  $A6 = 74.9 \pm 6.2$ ,  $B6 = 22.7 \pm 6.5$ ,  $C6 = 2.2 \pm 1.0$  after 6-h incubation respectively. Student's T-test revealed significant differences ( $P 0.01$ ) between the groups 1, 2 and 3 in the percentages of spermatozoa with reacting acrosome and intact acrosome after 1-h incubation (A1, B1) as well as after 6-h

incubation (A<sub>6</sub>, B<sub>6</sub>). Significant difference (P 0.05) was also found in groups 1 and 3 between the proportions of sperms without acrosome after 1-h and 6-h incubation (C<sub>1</sub>, C<sub>6</sub>). Morphological assessment of acrosome status by FVSA and fluorescence examination showed considerable variability in the ability of motile sperms of bulls to undergo capacitation and the onset of acrosome reaction. Based on morphological changes of acrosome, the kinetics of sperm reactions to heparin could be characterized in individual animals.

**Key words:** bulls, spermatozoa, acrosome evaluation, fluorescence, fertility

## **ABSTRAKT**

K aktuálnym úlohám v oblasti reprodukčnej biotechnológie patrí snaha o poznanie a prognózu oplodňovacej schopnosti individuálnych býkov v in vitro podmienkach. Cieľom práce bolo hodnotiť kapacitáciu a nástup akrozómovej reakcie u populácie motilných spermíí individuálnych býkov inkubovaných za štandardných podmienok v prítomnosti heparínu a monitorovať priebeh týchto zmien pomocou metódy FVSA ( fix-vital stain assay ) a fluorescenčného vyšetrenia. Zo zmrazenej spermy 13-tich mladých býkov českého strakatého plemena boli centrifugáciou na gradiente Percollu získané motilné spermie, ktoré boli inkubované pri laboratórnej teplote v modifikovanom Tyrodovom médiu s albumínom, laktátom a pyruvátom, doplnenom o 10 µg heparínu na ml. V dvoch časových intervaloch boli inkubované spermie farbené bisbenzimidom Hoechst 33258 a fluorescenčne vyšetrované. Boli hodnotené podiely spermíí s reagujúcim akrozómom ( A<sub>1</sub> ), s intaktným akrozómom ( B<sub>1</sub> ) a bez akrozómu ( C<sub>1</sub> ) po 1 hod. inkubácie a podiely spermíí s reagujúcim akrozómom ( A<sub>6</sub> ), s intaktným akrozómom ( B<sub>6</sub> ) a bez akrozómu ( C<sub>6</sub> ) po 6 hod. inkubácie z celkového počtu hodnotených spermíí. U hodnotených býkov bol zistený odlišný priebeh reakcie spermíí na heparín, na základe ktorého boli býky zaradené do 3 súborov. U býkov s veľmi rýchlou reakciou na heparín ( súbor 1, n = 5 ) boli u sledovanej populácie spermíí zistené tieto priemerné hodnoty A<sub>1</sub> = 95,8 ± 3,6; B<sub>1</sub> = 2,9 ± 3,5; C<sub>1</sub> = 1,1 ± 0,5; A<sub>6</sub> = 96,2 ± 1,3; B<sub>6</sub> = 0,2 ± 0,6; C<sub>6</sub> = 3,5 ± 1,2, u býkov so stredne rýchlou reakciou na heparín ( súbor 2, n = 5 ) A<sub>1</sub> = 82,0 ± 8,2; B<sub>1</sub> = 16,4 ± 8,5; C<sub>1</sub> = 1,5 ± 1,2; A<sub>6</sub> = 92,6 ± 2,3; B<sub>6</sub> = 3,7 ± 2,8; C<sub>6</sub> = 3,9 ± 1,8 a u býkov s pozvoľnou reakciou na heparín ( súbor 3, n = 3 ) A<sub>1</sub> = 39,1 ± 3,4 ; B<sub>1</sub> = 60,3 ± 3,4; C<sub>1</sub> = 0,5 ± 0,3; A<sub>6</sub> = 74,9 ± 6,2; B<sub>6</sub> = 22,7 ± 6,5; C<sub>6</sub> = 2,2 ± 1,0. Študentovým T-testom bol zistený štatisticky významný rozdiel ( p ≤ 0,01 ) medzi súbormi 1, 2 a 3 a to v podieloch spermíí s reagujúcim akrozómom a intaktným akrozómom po 1 hodinovej inkubácii ( A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> ) i po 6 hodinovej inkubácii ( A<sub>6</sub>, B<sub>6</sub> ). Štatisticky významný rozdiel ( p ≤ 0,05 ) bol potvrdený tiež u súborov 1 a 3 a to medzi podielmi spermíí bez akrozómu po 1 hodinovej a 6 hodinovej inkubácii ( C<sub>1</sub>, C<sub>6</sub> ). Pomocou morfológického hodnotenia stavu akrozómu metódou FVSA a fluorescenčného vyšetrenia bola preukázaná značná variabilita v schopnosti motilných spermíí individuálnych býkov prekonať pri štandardných podmienkach kapacitáciu a nástup akrozómovej reakcie. Na základe

morfologických zmien akrozómu bolo možné charakterizovať kinetiku reakcie spermií na heparín u individuálnych býkov.

**Kľúčové slová:** býky, spermie, hodnotenie akrozómu, fluorescencia, fertilita

## ÚVOD

Pre úspešný priebeh fertilizácie je potrebná dostatočne početná populácia motilných spermií s neporušenou cytoplazmatickou membránou a intaktným akrozómom. Cieľom práce bolo sledovať zmeny akrozómu u populácie motilných spermií individuálnych býkov inkubovaných za štandardných podmienok v prítomnosti heparínu a monitorovať nástup akrozómovej reakcie ako potencionálneho ukazovateľa fertility býkov.

## METODIKA

Pre experiment bola použitá zmrazená sperma 13-tich býkov českého strakatého plemena produkovaná pre testáciu so známymi kvantitatívnymi a kvalitatívnymi ukazovateľmi a výsledkami zabrevávania po inseminácii a in vitro fertilizácii. Po rozmrazení vo vodnom kúpeli pri 37 °C po dobu 60 sec bola sperma navrstvená na gradient Percollu a centrifugovaná pri 700 g po dobu 30 minút. Supernatant obsahujúci riedidlo a mŕtve spermie bol odstránený a peletka tvorená iba motilnými spermiami bola dvakrát premytá v modifikovanom Tyrodovom médiu s albumínom, laktátom a pyruvátom ( SP-TALP ) centrifugáciou pri 200 g po dobu 10 minút. Peletka bola resuspendovaná v 100µl fertilizačného média ( IVF-TALP) a spermie nariadené na koncentráciu 25x10<sup>6</sup>/ml. Súčasne bola pomocou fluorescenčného vyšetrenia DNA overená ich viabilita ( XX,%). K polovici suspenzie bol pridaný heparín, tak aby výsledná koncentrácia bola 10µg/ml fertilizačného média. V priebehu inkubácie boli odoberané dve vzorky spermií, ktoré boli fixované 2,5 % glutaraldehydom a až do vyšetrenia uchovávané pri 6 °C. Pred vyšetrením boli spermie zafarbené bisbenzimidom Hoechst-33258 a bezprostredne vyšetrené na fluorescenčnom mikroskope s fázovým kontrastom a filtrom 410 nm pri zväčšení 200-400x . Z každej vzorky boli pripravené dva preparáty a na každom z nich bolo hodnotených 400 spermií, z ktorých boli stanovené podiely spermií s reagujúcim akrozómom ( A<sub>1</sub> ), s intaktným akrozómom ( B<sub>1</sub> ) i spermií bez akrozómu ( C<sub>1</sub> ) po 1 hod. inkubácie a. podiely spermií s reagujúcim akrozómom ( A<sub>6</sub> ), s intaktným akrozómom ( B<sub>6</sub> ) a spermií bez akrozómu ( C<sub>6</sub> ) po 6 hod. inkubácie z celkového počtu hodnotených spermií.

## VÝSLEDKY

Pomocou metódy fix vital stain assay a fluorescenčného vyšetrenia boli stanovené priemerné percentuálne podiely spermií s morfologicky definovaným stavom akrozómu v populácii motilných spermií separovaných zo zmrazenej spermy individuálnych býkov a inkubovaných za štandardných podmienok kapacitácie. Sledovaním zmien akrozómu u jednotlivých subpopulácií spermií bol zistený odlišný priebeh reakcie na heparín, na základe

ktorého bolo možné býkov rozdeliť do troch súborov: 1) s veľmi rýchlou reakciou, 2) stredne rýchlou reakciou a 3) pozvoľnou reakciou na heparín ( tab.1).

Tab. 1: Priemerné percentuálne podiely spermií s morfológicky definovaným stavom akrozómu v súboroch býkov.

OZNAČENIE	SÚBOR BÝKOV Typ reakcie PODIEL SPERMIÍ	1 ( n = 5 ) veľmi rýchla		2 ( n = 5 ) stredne rýchla		3 ( n = 3 ) pozvoľná	
		̄	SD	̄	SD	̄	SD
A <sub>1</sub>	s reagujúcim akrozómom po 1h.	95,8	3,6	82,0	8,2	39,1	3,4
B <sub>1</sub>	s intaktným akrozómom po 1h.	2,9	3,5	16,4	8,5	60,3	3,4
C <sub>1</sub>	bez akrozómu po 1h.	1,1	0,5	1,5	1,2	0,5	0,3
A <sub>6</sub>	s reagujúcim akrozómom po 6h	96,2	1,3	92,6	2,3	74,9	6,2
B <sub>6</sub>	s intaktným akrozómom po 6h.	0,2	0,6	3,7	2,8	22,7	6,5
C <sub>6</sub>	bez akrozómu po 6h.	3,5	1,2	3,9	1,8	2,2	1

Študentovým T-testom bol zistený štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,01$ ) medzi súbormi 1 a 2 a to v podiele spermií s reagujúcim akrozómom ( $A_1 = 95,8 \pm 3,6$  vs.  $82,0 \pm 8,2$ ;) a intaktným akrozómom ( $B_1 = 2,9 \pm 3,5$  vs.  $16,4 \pm 8,5$ ) po 1 hod. inkubácie i v podiele spermií s reagujúcim akrozómom ( $A_6 = 96,2 \pm 1,3$  vs.  $92,6 \pm 2,3$ ) a intaktným akrozómom ( $B_6 = 0,2 \pm 0,6$  vs.  $3,7 \pm 2,8$ ) po 6 hod. inkubácie. Súčasne bol nájdený štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,01$ ) medzi súbormi 2 a 3 a to v podiele spermií s reagujúcim akrozómom ( $A_1 = 82,0 \pm 8,2$  vs.  $39,1 \pm 3,4$ ) a intaktným akrozómom ( $B_1 = 16,4 \pm 8,5$  vs.  $60,3 \pm 3,4$ ) po 1 hod. inkubácie i v podiele spermií s reagujúcim akrozómom ( $A_6 = 92,6 \pm 2,3$  vs.  $74,9 \pm 6,2$ ) a intaktným akrozómom ( $B_6 = 3,7 \pm 2,8$  vs.  $22,7 \pm 6,5$ ) po 6 hod. inkubácie. Štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,01$ ) bol preukázaný tiež medzi súbormi 1 a 3 a to v podiele spermií s reagujúcim akrozómom ( $A_1 = 95,8 \pm 3,6$  vs.  $39,1 \pm 3,4$ ) a intaktným akrozómom ( $B_1 = 2,9 \pm 3,5$  vs.  $60,3 \pm 3,4$ ) po 1 hod.inkubácie i v podiele spermií s reagujúcim akrozómom ( $A_6 = 96,2 \pm 1,3$  vs.  $74,9 \pm 6,2$ ) a intaktným akrozómom ( $B_6 = 0,2 \pm 0,6$  vs.  $22,7 \pm 6,5$ ) po 6 hod. inkubácie. U súborov 1 a 3 bol štatisticky významný rozdiel ( $p \leq 0,05$ ) zistený medzi podielom spermií bez akrozómu po 1 a 6 hod.inkubácie ( $C_1 = 1,1 \pm 0,5$  vs.  $0,5 \pm 0,3$ ) a ( $C_6 = 3,5 \pm 1,2$  vs.  $2,2 \pm 1,0$ ).

## **ZÁVER**

Bolo potvrdené, že vitálne farbenie DNA spermíí metódou FVSA a nasledujúce fluorescenčné vyšetrenie umožňujú objektívne hodnotiť stav akrozómu u motilných spermíí separovaných zo zmrazenej spermy a inkubovaných za štandardných kapacitačných podmienok v prítomnosti heparínu. Boli preukázané výrazné rozdiely v schopnosti spermíí prekonať kapacitáciu a nástup akrozómovej reakcie u individuálnych býkov. Na základe morfológických zmien akrozómu u sledovaných subpopulácií spermíí bolo možné charakterizovať býkov z hľadiska priebehu ich reakcie na použitý kapacitačný agens-heparín. Overenie korelácie medzi výsledkami fluorescenčného vyšetrenia spermíí, úspešnosťou in vitro fertilizácie bovinných oocytov a výsledkami testácie býkov v inseminácii bude predmetom ďalšieho štúdia.