

MONITORING OF CHROMATIN STRUCTURE CHANGES OF BULL SPERM DURING THEIR CAPACITATION BY HEPARIN

MONITOROVÁNÍ ZMĚN STRUKTURY CHROMATINU BOVINNÍCH SPERMIÍ V PRŮBĚHU JEJICH KAPACITACE HEPARINEM

Rečková Z., Máchal L., Machatková M.

Ústav chovu a šlechtění 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: zuzana.reckova@seznam.cz

ABSTRACT

The purpose of the present study was to monitor chromatin integrity changes in a population of motile sperm during capacitation of separated sperm non treated and treated with heparin. In experiment was used 17 young tested bulls which are used for in vitro fertilization. Immediately after sperm thawing, Percoll separation of motile sperm, 3 and 6 hours' incubation of sperm non treated and treated with heparin, samples were collected and analyzed by flow cytometer and there were determined sperm rates with non-detectable and detectable DNA fragmentation index. In conclusion, the process of separation significantly increased sperm rate with no chromatin structure damage. During sperm incubation gradually decreased sperm rate with no chromatin structure damage but this decrease was significant only in case of sperm treated with heparin. The present study documented that sperm chromatin integrity changes during their capacitation are considerably individual in tested bulls. It was determined high variable results of in vitro system aren't consequence of negative influence of sperm separation and incubation because non damaged sperm rate was enough high after 6 hours' heparin effect.

Keywords: sperm, DNA integrity, chromatine structure, SCSA, flow cytometry

Abstrakt

Cílem práce bylo monitorovat změny integrity chromatinu v populaci motilních spermií v průběhu kapacitace separovaného spermatu neošetřeného a ošetřeného heparinem. Do experimentu bylo zařazeno 17 mladých býků prověřených v testaci, kteří jsou používáni k in vitro fertilizaci. Po rozmrazení spermatu, separaci motilních spermií na gradientu Percollu, 3 a 6-ti hodinové inkubaci spermií neošetřených a ošetřených heparinem byly odebrány vzorky, které byly vyšetřeny na flow cytometru a byl stanoven podíl spermií s nedetekovatelným a detekovatelným indexem DNA fragmentace. Prokázalo se, že separací spermií se signifikantně zvýšil podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu. V průběhu inkubace spermií došlo k postupnému poklesu podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu, ale tento pokles byl signifikantní pouze v případě inkubace spermií ošetřených heparinem. Potvrdilo se, že změny integrity chromatinu spermií v průběhu jejich kapacitace

jsou u sledovaných býků značně individuální. Bylo zjištěno, že vysoce variabilní výsledky z in vitro systému nejsou důsledkem negativního vlivu separace a inkubace spermií, protože podíl nepoškozených spermií byl dostatečně vysoký i po 6 ti hodinovém působení heparinu.

Klíčová slova: spermie, integrita DNA, struktura chromatinu, SCSA, průtoková cytometrie

ÚVOD

Metody průtokové cytometrie určené k hodnocení spermatu se stávají standardními a objektivními metodami, které jsou schopny objektivně zhodnotit kvalitativní a kvantitativní ukazatele spermatu, 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). K vyhodnocení integrity chromatinu spermií je používána metoda, kterou popsal Donald Evenson a Lorna Jost (2000), SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay).

Pro úspěšný výsledek přípravy embryí v podmínkách in vitro je nutné získat populaci motilních spermií s intaktním akrozomem a DNA, která je schopna fertilizovat oocyty. Stále nevyřešena však zůstává otázka, proč někteří býci, kteří dosahují výborných výsledků v inseminaci, nedosahují adekvátních výsledků i v in vitro systému. Jedním z možných by mohlo být i vysvětlení, že v průběhu separace motilních spermií nebo jejich kapacitace, ještě před vlastní penetrací oocytů, dochází k narušení integrity DNA spermií, což má negativní dopad na účinnost procesu in vitro fertilizace. Abychom eliminovali tuto možnost sledovali jsme průběh změn integrity chromatinu spermií po rozmrazení, separaci a jejich kapacitaci. Cílem práce bylo srovnat změny integrity DNA v populaci motilních spermií inkubovaných za kapacitačních a kontrolních podmínek až do doby, kdy penetrují do bovinních oocytů.

MATERIÁL A METODIKA

V experimentu bylo použito zmrazené sperma 17 mladých býků českého strakatého plemene, s testovanou oplozovací schopností v inseminaci (52,3% - 67,3% březost) a i v in vitro systému (5,1% - 32,8% embryí).

Po rozmrazení inseminační dávky ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 60 sekund bylo sperma navrstveno na gradient Percollu a současně byl odebrán vzorek rozmrazeného spermatu (PS). Po 30 minutové centrifugaci při 700G byl supernatant obsahující mrtvé spermie a ředidlo odstraněn a pelet byl dvakrát promyt v izolačním médiu při 200G po dobu 10 minut. Pelet byl resuspendován ve 100μl Tyrodova fertilizačního média a po stanovení koncentrace spermií byl naředěn fertilizačním médiem na výslednou koncentraci 25mil./ml a byl odebrán vzorek separovaných spermií (P0). Spermie byly inkubovány jak pouze v médiu tak i v médiu doplněném heparinem (10μg/ml). Po 3 a 6 hodinách inkubace byly odebrány vzorky spermií jak neošetřených (P3, P6) tak i ošetřených heparinem (P3H, P6H). Odebrané vzorky byly naředěny TNE puforem (0,05M NaCl; 0,01M Tris; 0,001M EDTA; pH 7,4) na výslednou koncentraci 2 mil. spermií/ml, zmrazeny a uchovávány při -80°C až do jejich vyšetření.

Těsně před analýzou byly vyšetřované vzorky rozmrazeny ve vodní lázni při 37°C a bezprostředně po jejich rozmrazení byly uloženy na led $\pm 4^{\circ}\text{C}$ až do jejich vyšetření. Do plastové zkumavky bylo napipetováno 100 μl vzorku a 200 μl kyselého roztoku s detergentem (pH 1,2) a po 30 vteřinách se přidalo 600 μl barviva akridinové oranže (AO), zkumavka byla vložena do flow cytometru, kde vzorek protékal průtokem přibližně 300 spermií/vteřinu a po 3 minutách od přidání kyselého roztoku s detergentem byl vzorek měřen.

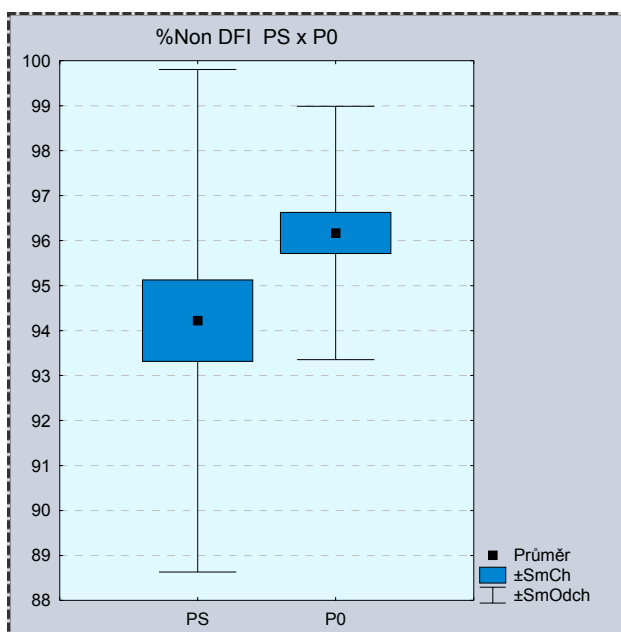
U každého vzorku byla provedena dvě měření po 5 tisících spermií tj. celkem bylo vyhodnoceno 10 tisíc spermií od každého býka. Pomocí SCSA-soft softwaru byly získány informace o podílech spermií nacházejících se ve spermatu a to podíl spermií s nedetekovatelným DNA fragmentačním indexem (non DFI) tj. spermie s nepoškozenou strukturou chromatinu a podíl spermií s detekovatelným DNA fragmentačním indexem (det DFI) tj. spermie s poškozenou strukturou chromatinu.

Získané hodnoty byly statisticky zpracovány v programu STATISTICA pomocí Wilcoxonova testu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Separace motilních spermií na gradientu Percollu signifikantně zvýšila ($p < 0,01$) průměrný podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu u sledovaných býků. Účinnost separace motilních spermií u jednotlivých býků byla tím vyšší, čím nižší byl podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu v jejich spermatu po rozmrazení (graf 1.).

Graf 1. Vliv separace na průměrný podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu u testovaných býků



PS – vzorek před separací spermatu
P0 – vzorek spermatu po separaci

Tab. 1. Srovnání průměrných podílů spermií s neporušenou strukturou chromatinu před a po separaci

	PS [%]	P0 [%]
Průměr	94,91	96,69
Prům.odch.	3,09	1,36
Minimum	79,37	92,51
Maximum	99,29	99,22

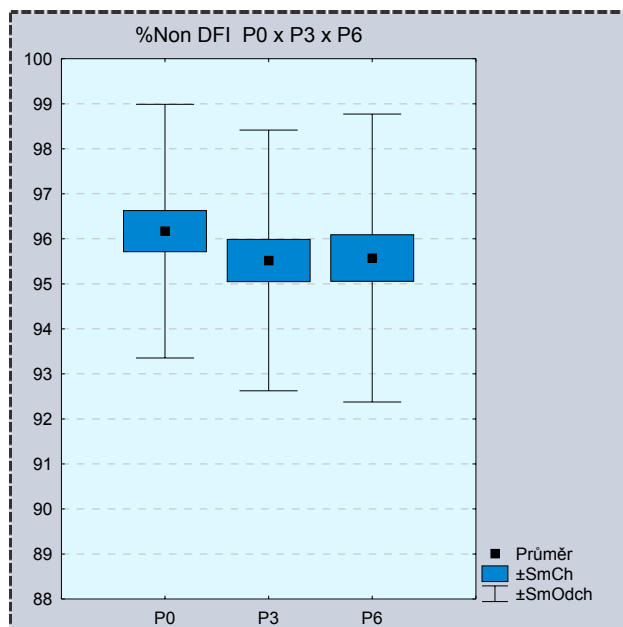
PS – vzorek před separací spermatu

P0 – vzorek spermatu po separaci

Průměrný podíl spermií s nepoškozenou strukturou chromatinu se po separaci spermií na gradientu Percollu zvýšil o 1,8% a minimální hodnota podílu spermií s nepoškozenou strukturou chromatinu se zvýšila z původní hodnoty 79,4% po rozmrazení spermatu na hodnotu 92,5% nepoškozených spermií po separaci spermií, tj. v separované populaci spermií bylo o 13,1% méně poškozených spermií než v inseminační dávce.

V průběhu inkubace spermií neošetřených heparinem došlo k postupnému poklesu průměrného podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu, ale tento pokles nebyl statisticky významný (graf 2.).

Graf 2. Změny průměrného podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu v průběhu inkubace heparinem neošetřených spermií



P0 - vzorek po separaci spermatu

P3 - vzorek spermatu po 3 hodinách inkubace heparinem neošetřených spermií

P6 - vzorek spermatu po 6 hodinách inkubace heparinem neošetřených spermií

Tab.2. Srovnání podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu po separaci, po 3 a po 6 hodinách inkubace heparinem neošetřených spermií

	P0 [%]	P3 [%]	P6 [%]
Průměr	96,69	95,73	95,81
Prům.odch.	1,36	2,35	2,21
Minimum	92,51	88,6	85,55
Maximum	99,22	99,13	99,18

P0 - vzorek po separaci spermatu

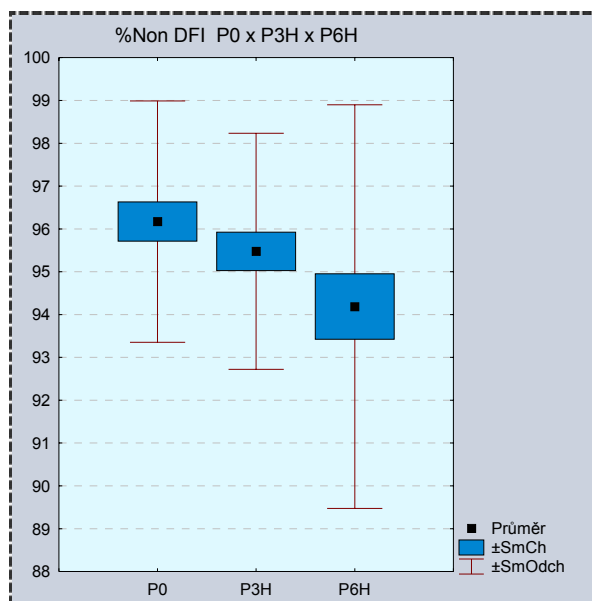
P3 - vzorek spermatu po 3 hodinách inkubace heparinem neošetřených spermií

P6 - vzorek spermatu po 6 hodinách inkubace heparinem neošetřených spermií

Během inkubace spermií neošetřených heparinem se hodnota průměrného podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu příliš nezměnila, ale minimální hodnota podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu klesla z původních 92,5% v čase 0 hod. na 88,6% po 3 hodinách a 85,6% spermií s nepoškozenou strukturou chromatinu po 6 hodinách.

V průběhu inkubace spermií ošetřených heparinem došlo k signifikantnímu poklesu podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu (graf 3) a to mezi vzorky po separaci a po 3 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií ($p < 0,05$), po separaci a po 6 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií ($p < 0,01$), po 3 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií a po 6 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií ($p < 0,05$).

Graf 3. Vliv inkubace heparinem ošetřených spermií na podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu



P0 - vzorek po separaci spermatu

P3H - vzorek spermatu po 3 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií

P6H - vzorek spermatu po 6 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií

Tab. 3. Srovnání podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu po separaci, po 3 a 6 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií

	P0 [%]	P3H [%]	P6H [%]
Průměr	96,69	95,60	94,65
Prům.odch.	1,36	1,92	1,92
Minimum	92,51	86,61	86,61
Maximum	99,22	99,02	99,12

P0 - vzorek po separaci spermatu

P3H - vzorek spermatu po 3 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií

P6H - vzorek spermatu po 6 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií

Průměrná hodnota podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu se po 3 hodinách kapacitace spermií snížila o 1,1 % ve srovnání s hodnotou v čase 0 hodin, po 6 hodinové kapacitaci spermií byl rozdíl mezi hodnotami podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu 2,0 %. Minimální hodnota spermií s neporušenou strukturou chromatinu se po 3 i 6 hodinové inkubaci heparinem ošetřených spermií snížila o 5,9 %.

Při porovnání podílů spermií s neporušenou strukturou chromatinu ve vzorcích po 6 hodinové inkubaci heparinem neošetřených spermií a heparinem ošetřených spermií byl zjištěn vysoce statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$), přičemž vzorek po 6 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií vykazoval nižší podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu. Při srovnání podílů spermií s neporušenou strukturou chromatinu ve vzorcích po 3 hodinové inkubaci heparinem neošetřených spermií a heparinem ošetřených spermií byl rozdíl mezi těmito vzorky patrný, ale nebyl statisticky významný a rovněž vzorek po 3 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií vykazoval vyšší podíl poškozených spermií.

Výsledky z experimentů, které by se týkaly hodnocení změn struktury chromatinu v průběhu separace bovinních spermií a jejich následné inkubace resp. kapacitace heparinem nebyly dosud publikovány, tudíž výsledky tohoto experimentu nemohou být porovnány s výsledky jiných autorů.

ZÁVĚR

- Bylo prokázáno, že separací motilních spermií se signifikantně zvýšil ($p < 0,01$) podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu, tj. separace na gradientu Percollu pozitivně ovlivňuje podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu.
- V průběhu inkubace spermií neošetřených a ošetřených heparinem došlo k signifikantnímu poklesu podílu spermií s neporušenou strukturou chromatinu mezi vzorky po separaci a po 3 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií ($p < 0,05$), po separaci a po 6 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií ($p < 0,01$), po 3 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií a po 6 hodinách inkubace heparinem

ošetřených spermií ($p < 0,05$), po 6 hodinách inkubace heparinem neošetřených spermií a po 6 hodinách inkubace heparinem ošetřených spermií ($p < 0,01$).

➤ Potvrdilo se, že změny integrity chromatinu spermií v průběhu jejich kapacitace jsou u sledovaných býků značně individuální.

➤ Bylo zjištěno, že vysoce variabilní výsledky z in vitro systému nejsou důsledkem negativního vlivu separace a inkubace spermií, protože podíl spermií s neporušenou strukturou chromatinu byl dostatečně vysoký pro potenciální penetraci oocytů i po 6 ti hodinovém působení heparinu.

LITERATURA

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.