

INTEGRALNOŚĆ BŁON KOMÓRKOWYCH I STRUKTURA CHROMATYNY PLEMNİKÓW SEKSOWANEGO I NIESEKSOWANEGO NASIENIA BUHAJÓW*

Piotr Gogol, Monika Trzcńska

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji,
32-083 Balice k. Krakowa

Celem badań było porównanie jakości seksowanego (frakcja X) i nieseksowanego nasienia buhajów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Oceniono 25 próbek nasienia seksowanego od 22 buhajów oraz 28 próbek nasienia nieseksowanego od 26 buhajów. Ocena nasienia obejmowała określanie integralności błon komórkowych plemników przy zastosowaniu podwójnego barwienia fluorochromami SYBR14 i jodkiem propydydny (PI) oraz cytometryczną analizę uszkodzeń chromatyny plemnikowej metodą SCSA. W nasieniu seksowanym w porównaniu do nieseksowanego stwierdzono o 18,6% mniej plemników żywych (odpowiednio 38,49 i 57,06%), a o 11,1% więcej plemników martwych i o 7,5% więcej plemników zamierających ($P < 0,01$). Analiza chromatyny plemnikowej wykazała obecność niższego odsetka plemników z uszkodzoną chromatyną (indeks DFI) w nasieniu seksowanym w porównaniu z nieseksowanym ($P < 0,05$). Średnia wartość indeksu DFI dla nasienia seksowanego wynosiła 1,4% (0,31–2,66%), a dla nasienia nieseksowanego 2,66% (0,66–16,16%). Wyniki naszych badań wykazały istotne różnice pomiędzy jakością seksowanego i nieseksowanego nasienia buhajów. Jednocześnie wskazały na duże różnice poziomu uszkodzeń błon komórkowych i DNA plemników pomiędzy buhajami.

Słowa kluczowe: seksowane nasienie, buhaj, błony komórkowe, chromatyna

Jedyną obecnie sprawdzoną metodą sortowania plemników według płci, która znajduje zastosowanie komercyjnie, jest sortowanie barwionych fluorescencyjnie komórek przy użyciu cytometrii przepływowej. Technologia ta jest stale udoskonalana, jednak w przypadku użycia nasienia seksowanego skuteczność inseminacji jest wciąż niższa w porównaniu z nasieniem nieseksowanym. Główną przyczyną jest obniżona jakość plemników, które w trakcie seksowania są narażone na oddziaływanie czynników stresowych. Charakter uszkodzeń plemników seksowanych nie został jeszcze

*Praca finansowana z działalności statutowej IZ PIB, zadanie nr 01-19-06-11.

wystarczająco wyjaśniony. W związku z tym potrzebne są badania nad precyzyjnym określaniem ich jakości *in vitro*. Oczekuje się, że przyczyni się to do udoskonalenia procedury seksowania i w konsekwencji doprowadzi do poprawy płodności uzyskiwanej po użyciu seksowanego nasienia.

Dotychczasowe badania koncentrowały się na ocenie takich parametrów nasienia seksowanego jak ruchliwość plemników, integralność błony komórkowej oraz akrosomu i struktura chromatyny (Boe-Hansen i in., 2005; Suh i in., 2005; Carvalho i in., 2010).

Ocena integralności błony komórkowej plemników jest jednym z kluczowych testów w określaniu jakości nasienia. Błona plazmatyczna plemnika jest strukturą, która chroni plemniki przed szkodliwymi czynnikami pozakomórkowymi i odgrywa istotną rolę podczas procesu kapacytacji i reakcji akrosomowej w czasie zapłodnienia (Gadella, 2008; Tapia i in., 2012). W ocenie integralności błony komórkowej stosuje się powszechnie barwniki fluorescencyjne kwasów nukleinowych, których istotną cechą jest brak zdolności przenikania przez nieuszkodzoną błonę komórkową. Do analizy plemników najczęściej stosowanym związkami jest jodek propydydy (PI). Fluorochrom ten wzbudzany jest laserem 488 nm, a maksimum jego emisji przypada na pasmo czerwone. W celu zwiększenia dokładności analizy stosuje się zwykle podwójne barwienie plemników, gdzie oprócz PI stosuje się równocześnie fluorochrom SYBR-14, łączący się z DNA plemników o uszkodzonej, jak i nieuszkodzonej błonie komórkowej. Barwienie takie uwidacznia wszystkie plemniki i pozwala odrzucić z analizy zanieczyszczenia występujące w nasieniu, które mogłyby być zaliczone do grupy plemników z błoną nieuszkodzoną. Metody wykorzystujące barwniki fluorescencyjne kwasów nukleinowych są obecnie stosowane w diagnostyce andrologicznej (Christensen i in., 2004), w badaniach nad fizjologią plemników i opracowywaniem nowych rozcieńczalników do nasienia (Grundler i in., 2004) oraz w badaniach nad zdolnością zapładniającą nasienia (Sutkeviciene i in., 2009).

Bardzo istotnym elementem oceny komórki plemnikowej w kontekście jej zdolności zapładniającej jest analiza struktury chromatyny. W trakcie spermatogenezy chromatyna plemników ulega poważnym przekształceniom związanym między innymi z jej kondensacją. Kondensacja chromatyny jest procesem złożonym i bardzo wrażliwym na czynniki zakłócające jej przebieg. Metodą pozwalającą na ocenę tych procesów jest SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay). Opiera się ona na stwierdzeniu, że DNA komórkowe posiada zmienną wrażliwość na denaturację w podwyższonej temperaturze lub niskim pH. Wrażliwość ta zależy od stadium wzrostu i różnicowania komórki, zakłóceń tych procesów, bądź działania czynników toksycznych. Badania oceny stanu chromatyny plemnikowej w mrożonym nasieniu buhajów, przeprowadzone na dużej liczbie ejakulatów, wykazały występowanie wysokiej korelacji między wrażliwością chromatyny na denaturację a płodnością uzyskiwaną po inseminacji tym nasieniem (Ballachey i in., 1987; Bochenek i in., 2001).

Celem badań było porównanie integralności błon komórkowych i struktury chromatyny plemnikowej dostępnego komercyjnie seksowanego (frakcja X) i nieseksowanego nasienia buhajów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej.

Material i metody

Nasienie

Materiał do badań stanowiło dostępne komercyjnie seksowane (frakcja X) i nieseksowane nasienie buhajów rasy holsztyńsko-fryzyskiej. Nasienie zakupione w latach 2018 i 2019 przez Zakłady Doświadczalne IZ PIB w Kołbaczu i Chorzelowie było przeznaczone do inseminacji samic na fermach krów mlecznych, a część porcji przekazano do badań. Wykorzystano próbki z 25 ejakulatów nasienia seksowanego od 22 buhajów (wiek od 1 do 6 lat) oraz 28 ejakulatów nasienia nieseksowanego od 26 buhajów (wiek od 2 do 6 lat). Nasienie seksowane pochodziło tylko od zagranicznych buhajów, a nieseksowane od krajowych i zagranicznych. Nasienie rozmrażano w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, a następnie poddawano ocenie w laboratorium Zakładu Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki PIB w Balicach. Przy użyciu cytometru przepływowego (CytoFLEX, Beckman Coulter, USA) oceniano integralność błon komórkowych oraz strukturę chromatyny plemnikowej.

Ocena integralności błon komórkowych

Ocenę integralności błon komórkowych wykonywano, stosując podwójne barwienie fluorochromami: SYBR-14 i jodkiem propydydy (PI) (Live/ Dead Sperm Viability Kit, Thermofisher). Przed barwieniem nasienie rozrzedzono do koncentracji 5×10^6 plemników w 1 ml płynie PBS. Następnie do 200 μ l nasienia dodawano 1 μ l roztworu bazowego SYBR-14 (0,2mM) i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 37°C, po czym dodawano 1 μ l roztworu bazowego PI (2,4 μ M). Analizę cytometryczną rozpoczynano po kolejnych 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej. Podwójne barwienie umożliwiło kwalifikowanie plemników do trzech grup: z nieuszkodzoną błoną komórkową („żywych”) – fluorescencja zielona, z rozerwaną błoną („martwych”) – fluorescencja czerwona oraz plemników z uszkodzoną błoną komórkową, lecz jeszcze aktywnych metabolicznie („zamierających”) – fluorescencja zielona i czerwona.

Ocena chromatyny plemnikowej

Do oceny uszkodzeń struktury chromatyny plemnikowej wykorzystano metodę Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). Przed badaniem nasienie rozrzedzono płynem PBS do koncentracji plemników 1×10^6 w 1 ml. Następnie przy pomocy 1,0 M roztworu HCl obniżano pH próbki do około 1,3 (indukcja częściowej denaturacji chromatyny plemnikowej), po 30 sekundach dodawano zbuforowany roztwór fluorochromu oranżu akrydyny (AO) i po 3 minutach inkubacji w temp. 4°C przeprowadzano w cytometrze przepływowym pomiar fluorescencji w paśmie zielonym (chromatyna prawidłowa) oraz czerwonym (chromatyna uszkodzona). Po analizie wyliczano parametr α_t wg następującego wzoru: $\alpha_t = \text{czerwona} / (\text{zielona} + \text{czerwona})$ fluorescencja. Na podstawie α_t określano dla każdego ejakulatu odsetek plemników z uszkodzoną chromatyną plemnikową – tzw. indeks DFI (DNA Fragmentation Index).

Analiza statystyczna

Istotność różnic między średnimi oszacowano testem *t* przy wykorzystaniu pakietu statystycznego Statistica 12. Do oceny zależności pomiędzy parametrami jakości nasienia zastosowano współczynnik korelacji liniowej Pearsona.

Wyniki

Wyniki cytometrycznej oceny integralności błon komórkowych i uszkodzeń chromatyny plemnikowej nasienia seksowanego i nieseksowanego przedstawiono w tabelach 1 i 2. Szczegółowe dane przedstawione w powyższych tabelach wskazują na duże różnice poziomu uszkodzeń DNA i błony komórkowej plemników pomiędzy buhajami. W nasieniu seksowanym w porównaniu do nieseksowanego stwierdzono o 18,6% mniej plemników żywych (odpowiednio 38,49 i 57,06%), a o 11,1% więcej plemników martwych i o 7,5% więcej plemników zamierających ($P < 0,01$) (tab. 3). Analiza chromatyny plemnikowej wykazała obecność niższego odsetka plemników z uszkodzoną chromatyną (indeks DFI) w nasieniu seksowanym ($P < 0,05$) w porównaniu z nieseksowanym. Średnia wartość indeksu DFI dla nasienia seksowanego wynosiła 1,4% (0,31–2,66%), a dla nasienia nieseksowanego 2,66% (0,66–16,16%). Nie stwierdzono istotnych korelacji pomiędzy integralnością błon komórkowych i indeksem DFI dla nasienia seksowanego i nieseksowanego.

Tabela 1. Parametry jakościowe nasienia seksowanego
Table 1. Quality parameters of sexed semen

| Lp. No. | Buhaj/Ejakulat Bull/Ejaculate | Odsetek plemników Sperm percentage | | | |
|---------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------|-------------------------|---|
| | | żywe live | martwe dead | zamierające moribund | z uszkodzoną chromatyną (DFI) with damaged chromatin (DFI) |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | S-1 | 36,71 | 42,19 | 21,1 | 2,39 |
| 2 | S-2 | 31,49 | 51,67 | 16,84 | 1,77 |
| 3 | S-3 | 30,63 | 58,03 | 11,33 | 1,75 |
| 4 | S-4 | 44,5 | 43,42 | 12,08 | 2,44 |
| 5 | S-5 | 39,2 | 40,95 | 19,84 | 2,66 |
| 6 | S-6 | 46,08 | 42,51 | 11,41 | 1,64 |
| 7 | S-7 | 43,03 | 44,4 | 12,57 | 0,48 |
| 8 | S-8 | 41,51 | 46,07 | 12,42 | 0,31 |
| 9 | S-9 | 40,05 | 52,04 | 7,81 | 0,94 |
| 10 | S-10 | 55,58 | 37,86 | 6,55 | 0,89 |
| 11 | S-11 | 39,83 | 41,37 | 18,8 | 1,02 |
| 12 | S-12 | 30,07 | 56,44 | 13,48 | 1,1 |
| 13 | S-13 | 33,79 | 59,86 | 6,35 | 0,88 |
| 14 | S-14/A | 43,27 | 49,19 | 7,53 | 1,64 |

cd. tabeli 1 – Table 1 contd.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|--------|-------|-------|-------|------|
| 15 | S-14/B | 38,37 | 51,51 | 10,13 | 1,6 |
| 16 | S-15 | 30,3 | 56,12 | 13,58 | 1,29 |
| 17 | S-16/A | 35,29 | 50,75 | 13,96 | 1,99 |
| 18 | S-16/B | 44,23 | 44,75 | 11,02 | 1,05 |
| 19 | S-17 | 34,25 | 53,23 | 12,04 | 0,62 |
| 20 | S-18/A | 25,46 | 55,35 | 19,19 | 2,51 |
| 21 | S-18/B | 39,63 | 41,92 | 18,45 | 1,76 |
| 22 | S-20 | 25,23 | 64,39 | 10,38 | 1,08 |
| 23 | S-21 | 45,7 | 39,07 | 15,22 | 0,32 |
| 24 | S-22/A | 48,64 | 34,33 | 17,02 | 0,59 |
| 25 | S-22/B | 39,33 | 46,34 | 14,33 | 2,25 |

DFI – indeks fragmentacji DNA.

DFI – DNA fragmentation index.

Tabela 2. Parametry jakościowe nasienia nieseksowanego

Table 2. Quality parameters of unsexed semen

| Lp. No. | Buhaj/Ejakulat Bull/Ejaculate | Odsetek plemników Sperm percentage | | | |
|------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------|-------------------------|---|
| | | żywe live | martwe dead | zamierające moribund | z uszkodzoną chromatyną (DFI) with damaged chromatin (DFI) |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | N-1 | 59,9 | 16,78 | 23,32 | 3,62 |
| 2 | N-2 | 70,24 | 18,02 | 11,74 | 0,67 |
| 3 | N-3 | 43,44 | 53,52 | 3,04 | 3,37 |
| 4 | N-4 | 72,57 | 20,33 | 7,11 | 4,79 |
| 5 | N-5 | 50,99 | 47,01 | 2,0 | 4,88 |
| 6 | N-6 | 42,84 | 56,46 | 0,7 | 1,25 |
| 7 | N-7 | 63,78 | 27,39 | 8,84 | 1,98 |
| 8 | N-8 | 17,55 | 78,84 | 3,61 | 0,66 |
| 9 | N-9 | 64,4 | 31,62 | 3,98 | 1,2 |
| 10 | N-10 | 28,33 | 68,1 | 3,58 | 1,44 |
| 11 | N-11 | 53,32 | 45,03 | 1,65 | 0,74 |
| 12 | N-12 | 32,43 | 62,76 | 4,81 | 2,58 |
| 13 | N-13 | 54,59 | 40,37 | 5,04 | 16,16 |
| 14 | N-14 | 52,02 | 46,11 | 1,87 | 2,68 |
| 15 | N-15 | 72,38 | 25,95 | 1,66 | 3,03 |
| 16 | N-16 | 68,01 | 27,98 | 4,01 | 1,11 |
| 17 | N-17/A | 43,48 | 51,45 | 5,07 | 1,59 |
| 18 | N-17/B | 49,6 | 40,02 | 10,38 | 2,28 |
| 19 | N-18 | 69,06 | 25,19 | 5,75 | 1,46 |

c.d. tabeli 2 – table 2 contd.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----|--------|-------|-------|-------|------|
| 20 | N-19 | 70,46 | 16,29 | 13,25 | 1,6 |
| 21 | N-20 | 74,72 | 15,67 | 9,61 | 2,3 |
| 22 | N-21 | 69,08 | 16,83 | 14,05 | 2,34 |
| 23 | N-22 | 45,69 | 50,69 | 3,62 | 1,62 |
| 24 | N-23 | 71,62 | 26,79 | 1,59 | 2,97 |
| 25 | N-24 | 30,62 | 66,76 | 2,62 | 0,66 |
| 26 | N-25 | 76,63 | 19,76 | 3,61 | 1,89 |
| 27 | N-26/A | 72,81 | 20,47 | 6,72 | 2,58 |
| 28 | N-26/B | 77,2 | 21,18 | 1,52 | 3,03 |

DFI – indeks fragmentacji DNA.

DFI – DNA fragmentation index.

Tabela 3. Porównanie parametrów jakościowych nasienia seksowanego i nieseksowanego
Table 3. Comparison of quality parameters of sexed and unsexed semen

| Odsetek plemników Sperm percentage | Nasienie seksowane (n=25) Sexed semen (n=25) | | Nasienie nieseksowane (n=28) Unsexed semen (n=28) | |
|---|---|-----------------|--|-----------------|
| | średnia ± SEM mean ± SEM | zakres range | średnia ± SEM mean ± SEM | zakres range |
| Żywe Live | 38,49±1,46 A | 25,23–55,58 | 57,06±3,14 B | 17,55–77,20 |
| Martwe Dead | 48,15±1,52 A | 34,33–64,39 | 37,05±3,51 B | 15,67–78,84 |
| Zamierające Moribund | 13,38±0,84 A | 6,35–21,10 | 5,88±0,95 B | 0,70–23,32 |
| Z uszkodzoną chromatyną With damaged chromatin | 1,40±0,14 a | 0,31–2,66 | 2,66±0,54 b | 0,66–16,16 |

a, b – wartości oznaczone różnymi literami różnią się istotnie (P<0,05).

a, b – values marked with different letters differ significantly (P<0.05).

A, B – jak wyżej dla P<0,01.

A, B – as above for P<0.01.

Omówienie wyników

Przyczyny obniżonej zdolności zapładniającej nasienia seksowanego nie są dostatecznie poznane, a działania kompensacyjne, które w przypadku nasienia nieseksowanego umożliwiają podniesienie wskaźnika zacieleń, jak np. zastosowanie większej liczby plemników w dawce inseminacyjnej, nie przynoszą spodziewanej poprawy wyników w przypadku nasienia seksowanego (Frijters i in., 2009; DeJarnette i in., 2011). Względna płodność po inseminacji nasieniem seksowanym w dawce 2,1 miliona i 10 milionów plemników stanowiła około 70% płodności uzyskanej po użyciu nasienia konwencjonalnego (DeJarnette i in., 2011), a różnicy w płodności między nasieniem konwencjonalnym a seksowanym, rzędu 10 punktów procentowych, nie

zmniejszono poprzez zwiększenie liczby plemników seksowanych w dawce inseminacyjnej (DeJarnette i in., 2010 i 2011). Przyczyny niższej zdolności zapładniającej nasienia seksowanego przypisuje się różnorodnym zmianom biochemicznym, jakie zachodzą w nasieniu podczas sortowania plemników. W procedurze seksowania wyodrębniono ponad 20 różnych podprocesów, w tym wydłużony czas inkubacji przed barwieniem, barwienie fluorochromem Hoechst 33342, ekspozycja na wiązkę laserową w celu indukcji fluorescencji, ekspozycja na pole elektryczne w celu rozdzielania na poszczególne frakcje czy wirowanie, z których wszystkie mogą przyczynić się do spadku wartości biologicznej plemników (Hollinshead i in., 2004; Suh i in., 2005). Ten wieloetapowy proces, jakim jest seksowanie, obejmuje dość drastyczne zmiany w otoczeniu, przez które przechodzą komórki płciowe i łącznie etapy te przyczyniają się do dodatkowego obciążenia plemników. Taki sposób postępowania wynika z konieczności zmiany fizjologii plemników w sposób, który ułatwia wprowadzenie, a następnie zatrzymanie barwnika Hoechst 33342 w komórce tak, aby ostatecznie mógł fluoryzować i umożliwić rozdział komórek (Seidel, 2012). Etap kriokonserwacji stanowi dodatkowe obciążenie dla plemników, które zostały już poddane znacznemu stresowi. Jak zatem można było oczekiwać, przeprowadzone przez nas badania wykazały znacznie wyższy (o około 19%) odsetek plemników z uszkodzonymi błonami w nasieniu seksowanym. Podobne wyniki uzyskali Carvalho i in. (2010), którzy wpływ seksowania badali na plemnikach z tych samych ejakulatów. Ejakulatory były dzielone, a następnie jedna część była poddawana procedurze seksowania i zamrażana, a druga była zamrażana bez seksowania. Seksowanie spowodowało obniżenie ruchliwości oraz wzrost odsetka plemników z uszkodzonym akrosomem i błoną komórkową. W przypadku integralności błon komórkowych różnica wynosiła 22%. Przypuszcza się, że ten negatywny wpływ seksowania na błony komórkowe może wynikać z naprężeń mechanicznych (stres mechaniczny), ponieważ, jak wykazano we wcześniejszych badaniach, zmniejszenie ciśnienia podczas sortowania zwiększało przeżywalność plemników, a także wskaźniki zapłodnienia (Suh i in., 2005) i ciąży (Schenk i in., 2009).

Badania struktury chromatyny plemnikowej (SCSA) były wykonywane na nasieniu wielu różnych gatunków, w tym buhaja. Opisano związek między płodnością samca a parametrami SCSA (Ballachey i in., 1987; Sailer i in., 1996; Bochenek i in., 2001). Nie do końca wyjaśniono natomiast zagadnienie wpływu różnych procedur postępowania z nasieniem, w tym seksowania, na integralność DNA plemników. W naszym badaniu stwierdziliśmy istotną różnicę między nasieniem seksowanym a nieseksowanym pod względem integralności DNA plemników mierzonej metodą SCSA. Plemniki seksowane charakteryzowały się znacznie niższym indeksem DFI w porównaniu z nieseksowanymi. Świadczy to, że w plemnikach sortowanych było mniej uszkodzeń DNA niż w plemnikach nieseksowanych. Chociaż istnieją pewne oznaki, że narażenie plemników na promieniowanie UV podczas seksowania za pomocą cytometrii przepływowej wpływa na integralność chromatyny (Bordignon i Smith, 1999; Boe-Hansen i in., 2005; Bochenek i in., 2007), to inne badania wskazują na brak znaczącej różnicy między plemnikami seksowanymi i nieseksowanymi (De Ambrogio i in., 2006; Holden i in., 2017). Wyniki te, oparte na technice barwienia i analizy *in vitro*, zostały potwierdzone danymi z badań nad zapłodnieniem *in vitro*,

w których seksowanie nie miało wpływu na tempo dekontensacji główki plemników, podziały komórkowe i tworzenie blastocysty (Carvalho i in., 2010). Być może plemniki buhaja są nieco mniej wrażliwe na ekspozycję na promieniowanie UV niż plemniki innych ssaków, ze względu na większą zawartość protaminy w chromatynie (Gimes, 1986), co zwiększa jej stabilność. W tym względzie ściślej upakowane DNA może tłumaczyć pozorny brak uszkodzeń chromatyny plemników seksowanych. Jednak nie można wykluczyć, że szkodliwe skutki ekspozycji na UV pojawią się dopiero na późniejszych etapach rozwoju (tj. po utworzeniu blastocysty) (Carvalho i in., 2010).

W naszych badaniach stopień uszkodzeń chromatyny w plemnikach seksowanych i nieseksowanych, mimo istotnych różnic, był na stosunkowo niskim poziomie (odpowiednio 1,4% i 2,66%). Choć istniejące dane wskazują, że zmiany upakowania chromatyny mogą odgrywać istotną rolę w niepłodności (Sailer i in., 1996), sugeruje się, że poziomy indeksu DFI niższe niż 2% nie powinny mieć znaczącego wpływu na płodność po inseminacji. W praktyce obniżenie odsetka ciąży o około 10 % zaobserwowano, gdy uszkodzenia DNA były większe niż 20% (Rybar i in., 2004).

Należy podkreślić, że zmiany poziomu uszkodzenia DNA są zależne od metodyki stosowanej do sortowania metodą cytometrii przepływowej. W niektórych przypadkach poziom uszkodzeń DNA w badanej próbce można znacznie zmniejszyć. Efekt ten można uzyskać, gdy procedura seksowania plemników obejmuje etap, który jest przeprowadzany w celu wyeliminowania subpopulacji martwych plemników. Ta strategia jest powszechnie stosowana w sortowaniu nasienia buhajów i wydaje się być skuteczna w pośrednim zmniejszaniu poziomu uszkodzeń DNA plemników, jak wcześniej sugerowali Boe-Hansen i in. (2005). Autorzy ci stwierdzili istotną różnicę między poziomem uszkodzeń chromatyny ustalonym dla nieseksowanego i seksowanego komercyjnego nasienia buhajów. Przy czym integralność DNA mierzono za pomocą dwóch testów, testu SCSA i testu kometowego. Autorzy zasugerowali, że efekt ten był powiązany z procesem sortowania poprzez wykluczenie plemników martwych. Gosálvez i in. (2011) wykazali, że uszkodzone plemniki są skutecznie gromadzone w posortowanej martwej subpopulacji i jest to powód, dla którego zawsze obserwuje się wzrost poziomu uszkodzeń DNA w tej frakcji po seksowaniu. Choć odkrycie to można uznać za oczywiste, rzeczywistość nie jest tak prosta, ponieważ stwierdzono, że nie wszystkie martwe plemniki zawierają uszkodzone DNA i nie wszystkie plemniki ocenione jako żywe są absolutnie wolne od uszkodzeń DNA. Badania w tym zakresie nie są jednoznaczne i chociaż przeważa opinia, potwierdzona uzyskanymi przez nas wynikami, że oba te parametry są niezależne (Gosálvez i in., 2009), to czasem stwierdza się ujemną korelację pomiędzy nimi (Karabinus i in., 1991; Fernández i in., 2005). Nasze badania dostarczają dodatkowych informacji na temat tego aspektu jakości plemników seksowanych wskazując, że nawet przy stosunkowo wysokim odsetku plemników z uszkodzoną błoną komórkową w nasieniu, poziom uszkodzeń DNA może być niski.

Podsumowanie

Wyniki naszych badań pokazały istotne różnice pomiędzy jakością seksowanego i nieseksowanego nasienia buhajów. Jednocześnie wskazały na duże różnice poziomu

uszkodzeń DNA i błony komórkowej plemników pomiędzy buhajami i to pomimo tego, że wszystkie analizowane w naszych badaniach próbki były zakupione w firmach komercyjnych, a więc prawdopodobnie wcześniej były już poddane kontroli jakości. Świadczy to o potrzebie zastosowania dodatkowych testów kriokonserwowanego nasienia buhajów przeznaczonego do inseminacji, w celu identyfikacji i eliminowania ejakulatów o obniżonej jakości. Przydatne mogą tu być cytometryczne metody oceny błony komórkowej i struktury chromatyny plemników.

Piśmiennictwo

- Ballachey B.E., Hohenboken W.D., Evenson D.P. (1987). Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol. Reprod.*, 36: 915–925.
- Bochenek M., Smorąg Z., Pilch J. (2001). Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, 56: 557–567.
- Bochenek M., Herjan T., Smorąg Z. (2007). Influence of sexing procedure on bull sperm chromatin structure. *Reprod. Fertil. Dev.*, 19: 296.
- Boe-Hansen G.B., Morris I.D., Ersboll A.K., Greve T., Christensen P. (2005). DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology*, 63: 1789–1802.
- Bordignon V., Smith L.C. (1999). UV-irradiated sperm activated oocyte but arrest pre implantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol. Reprod.*, 61: 1513–1520.
- Carvalho J.O., Sartoric R., Machado G.M., Mourão G.B., Dode M.A.N. (2010). Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, 74: 1521–1530.
- Christensen P., Knudsen D.B., Wachmann H., Madsen M.T. (2004). Quality control in boar semen production by use of the FACSCount AF system. *Theriogenology*, 62 (7): 1218–1228.
- De Ambrogi M., Spinaci M., Galeati G., Tamanini C. (2006). Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*, 66: 1994–2000.
- DeJarnette J.M., McCleary C.R., Leach M.A., Moreno J.F., Nebel R.L., Marshall C.E. (2010). Effects of 2.1 and 3.5×10^6 sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *J. Dairy Sci.*, 93: 4079–4085.
- DeJarnette J.M., Leach M.A., Nebel R.L., Marshall C.E., McCleary C.R., Moreno J.F. (2011). Effects of sex sorting and sperm dosage on conception rates in Holstein heifers. Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *J. Dairy Sci.*, 94: 3477–3483.
- Fernández J.L., Muriel L., Goyanes V., Segrelles E., Gosálvez J., Enciso M., LaFromboise M., De Jonge C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil. Steril.*, 84: 833–842.
- Frijters A.C.J., Mullaart E., Roelofs R.M.G., van Hoorne R.P., Moreno J.F., Moreno O., Merton J.S. (2009). What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology*, 71: 64–67.
- Gadella B.M. (2008). Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim. Reprod. Sci.*, 107: 229–236.
- Gimes S.R. Jr. (1986). Nuclear proteins in spermatogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83: 495–500.
- Gosálvez J., Cortés-Gutiérrez E.I., Nuñez R., Fernández J.L., Caballero P., López-Fernández C., Holt W.V. (2009). A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil. Steril.*, 92 (6): 1915–1919.
- Gosálvez J., Ramirez M.A., López-Fernández C., Crespo F., Evans K.M., Kjelland M.E., Moreno J.F. (2011). Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: II. Dynamic features. *Theriogenology*, 75: 206–211.
- Grundler W., Dirscherl P., Beisker W., Weber F., Stolla R., Bollwein H. (2004). Quantification of temporary and permanent subpopulations of bull sperm by an optimized SYBR-14/propidium iodide assay. *Cytometry*, 60 (1): 63–72.

- Holden S.A., Fernandez-Fuertes B., Murphy C., Whelan H., O'Gorman A., Brennan L., Butler S.T., Lonergan P., Fair S. (2017). Relationship between *in vitro* sperm functional assessments, seminal plasma composition, and field fertility after AI with either non-sorted or sex-sorted bull semen. *Theriogenology*, 87: 221–228.
- Hollinshead F.K., O'Brien J.K., Maxwell W.M.C., Evans G. (2004). Assessment of *in vitro* sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. *Theriogenology*, 62: 958–968.
- Karabinus D.S., Evenson D.P., Kaproth M.T. (1991). Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *J. Dairy Sci.*, 74: 3836–3848.
- Rybar R., Faldikova L., Faldyna M., Machatcova M., Rubes J. (2004). Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. *Vet. Med. Czech*, 49: 1–8.
- Sailer B.L., Jost L.K., Evenson D.P. (1996). Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry*, 24: 167–173.
- Schenk J.L., Cran D.G., Everest R.W., Seidel G.E. Jr. (2009). Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminated, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology*, 71: 717–728.
- Seidel G.E. Jr. (2012). Sexing mammalian sperm – where do we go from here? *J. Reprod. Dev.*, 58: 505–509.
- Suh T.K., Schenk J.L., Seidel G.E. Jr. (2005). High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*, 64: 1035–1048.
- Sutkeviciene N., Riskeviciene V., Januskauskas A., Zilinskas H., Andersson M. (2009). Assessment of sperm quality traits in relation to fertility in boar semen. *Acta Vet. Scand.*, 51 (1): 53–58.
- Tapia J.A., Macias-Garcia B., Miro-Moran A., Ortega-Ferrusola C., Salido G.M., Peña F.J., Aparicio I.M. (2012). The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. *Reprod. Domest. Anim.*, 47: 65–75.

Zatwierdzono do druku: 13 X 2020

PIOTR GOGOL, MONIKA TRZCIŃSKA

Cell membrane integrity and sperm chromatin structure of sexed and unsexed bull semen

SUMMARY

The aim of the study was to compare the quality of sexed (fraction X) and unsexed semen of Holstein-Friesian bulls. Twenty five sexed semen samples from 22 bulls and 28 unsexed semen samples from 22 bulls were evaluated. The semen evaluation included determining the integrity of sperm cell membranes using double staining with SYBR14 fluorochrome and propidium iodide (PI) and cytometric analysis of sperm chromatin structure by SCSA method. In sexed semen compared to unsexed semen, 18.6% less live sperm (38.49 and 57.06%, respectively), and 11.1% more dead sperm and 7.5% more dying sperm was found ($P < 0.01$). Sperm chromatin analysis showed the presence of a lower percentage of sperm with damaged chromatin (DFI index) in sexed semen compared to unsexed semen ($P < 0.05$). The mean value of the DFI index for sexed semen was 1.4% (0.31% – 2.66%), and for unsexed semen 2.66% (0.66% – 16.16%). The results of our research showed significant differences between the quality of sexed and unsexed bull semen. In addition, they showed large differences in the level of damage to cell membranes and sperm DNA between bulls.

Key words: sexed semen, bull, cell membranes, chromatin