

Hagyományos és automatizált sejtanalitikai módszerek alkalmazása bikaspermiumok kromatinállapotának értékelésére

Kovács Barnabás Mihály^{1}, Kakasi Balázs², Nagy Szabolcs Tamás¹*

*¹Pannon Egyetem, Georgikon Kar, Állattudományi Tanszék,
8360 Keszthely, Deák Ferenc u. 16. A ép.*

*²Pannon Egyetem, Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet,
8200 Veszprém, Egyetem u. 10.*

**kovacs.barnabas529@gmail.com*

Abstract

Recently, evaluations of sperm traits, such as DNA fragmentation, or abnormal condensation of the sperm chromatin, are becoming increasingly important. The aim of the present study was to compare a conventional light microscopic procedure, Feulgen staining, with a modern automated method, the so-called Nicoletti test to evaluate sperm chromatin condensation, and to investigate the relationship between sperm primary defects and chromatin condensation. Our results on the semen samples of 15 Hungarian Simmenthal bulls did not reveal any significant correlation between the two methods. However, there is a significant, strong negative relationship between normal sperm morphology and abnormal chromatin condensation.

Key Words: chromatin condensation, sperm morphology, Feulgen staining, Nicoletti assay

Összefoglalás

Az utóbbi időben egyre inkább előtérbe kerülnek az olyan spermabírálati szempontok, mint a DNS száltöréseinek, fragmentációjának vagy a kromatin kondenzációjának értékelése. A jelen vizsgálat célja az volt, hogy összehasonlítsunk egy hagyományos fénymikroszkópos eljárást, a Feulgen-festést, valamint egy modern, automatizált eljárást, a Nicoletti-tesztet a spermiumok kromatinkondenzációs állapotának értékelésére, továbbá, hogy a spermiumok primer feji defektusainak és a kromatinkondenzációnak a kapcsolatát vizsgáljuk. A munkánk során 15 magyar tarka bika spermamintáját vizsgálva nem találtunk szignifikáns egyezést a két módszer eredményei között. A normális spermium-morfológia és a rendellenes kromatinkondenzáció között szignifikáns, erős negatív kapcsolat van jelen.

Kulcsszavak: kromatinkondenzáció, spermiummorfológia, Feulgen-festés, Nicoletti-teszt

Bevezetés

A mesterséges termékenyítés egyik legfontosabb eleme a kiváló minőségű szaporítóanyag használata, ami miatt kiemelt a szerepe a különböző spermabírálati módszereknek, melyekkel a sperma azon különböző tulajdonságait értékelhetik, amelyek kapcsolatban állnak a termékenyítőképesseggel (GERE, SOÓS és SZÁSZ 1998). Elsősorban a megfelelő sűrűség, tömegmozgás és progresszív motilitás azok a paraméterek, amelyek az általános spermabírálat során nagy jelentőséggel bírnak. A rutin jellegű spermavizsgálat során általában nincs idő részletes morfológiai vizsgálatra, azonban az újonnan belépő bikák esetében érdemes ezt is elvégezni.

Az elmúlt években egyre nagyobb hangsúlyt kap a spermabírálat során a DNS állapotának értékelése. A különböző DNS rendellenességek (egyes száltörés, fragmentáció, rendellenes kromatinkondenzáció) nem gátolják meg a spermiumokat a petesejthez való eljutásban és a megtermékenyítésben. Amennyiben a petesejt nem tudja javítani a DNS-hibákat, úgy az embrió fejlődése zavart lesz és akár korai embrióelhalás is felléphet. Ezek a spermiumdefektusok a nem kompenzálható rendellenességek közé tartoznak, hiszen a termékenyítő adag sejtkoncentrációjának növelésével sem lehet elérni a normál fertilitást, így nem lehet a negatív tulajdonságok hatását enyhíteni (EVENSON 1999). A jelen vizsgálat célja egyrészt az volt, hogy összehasonlítsunk egy hagyományos fénymikroszkópos eljárást, a Feulgen-festést, valamint egy modern, automatizált eljárást, a Nicoletti-tesztet a spermiumok kromatinkondenzációs állapotának értékelésére, másrészt pedig a spermiumok morfológiai tulajdonságainak és a rendellenes kromatinkondenzációnak a kapcsolatát meghatározzuk.

Anyag és módszer

A vizsgálatokat Keszthelyen, a Pannon Egyetem Georgikon Kar, Állattudományi Tanszék Sejtanalitikai laboratóriumában végeztük. A kísérletekhez felhasznált 15 magyartarka tenyészbika spermáját a Magyartarka Tenyésztők Egyesülete szolgáltatta.

A Feulgen-festés egy DNS specifikus festési eljárás, mely a kromatinkondenzáció rendellenességeinek kimutatására szolgál. Az eljárás két lépésből áll, az első a savas hidrolízis, ami eltávolítja a DNS szárlól a purin és pirimidin bázisokat, ezután a Schiff's reagenssel (fuchsine-sulfuric acid) reakcióba lépnek a szabad aldehid csoportok, és a reakció jellegzetes magenta színű festődést eredményez, rendellenes kromatinkondenzáció esetében viszont a sejtmag világosabb, szemcsézett képet mutat (BARTH és OKO 1991). *Kenetkészítés menete:*

1. A mélyhűtött bikaspermát felolvasztjuk, majd egy cseppet a tárgylemezre helyezünk, és fedőlemez segítségével kenetet készítünk.
2. A festőedénybe helyezett kenetekhez hozzáadjuk az 5 mol/l koncentrációjú sósavat 50 percre.
3. Ezután 5 percig folyóvízben átöblítjük a keneteket.
4. Szobahőmérsékleten hozzáadjuk a Schiff's reagenst egy órára. A reagens fényérzékenysége miatt ezt a festési folyamatot sötétben végezzük.
5. Majd nátrium-diszulfid oldattal átöblítjük 3 percen át.
6. A keneteket 10 percig folyóvízben átmossuk.
7. Ezután emelkedő koncentrációjú etanol oldattal dehidratáljuk a keneteket.

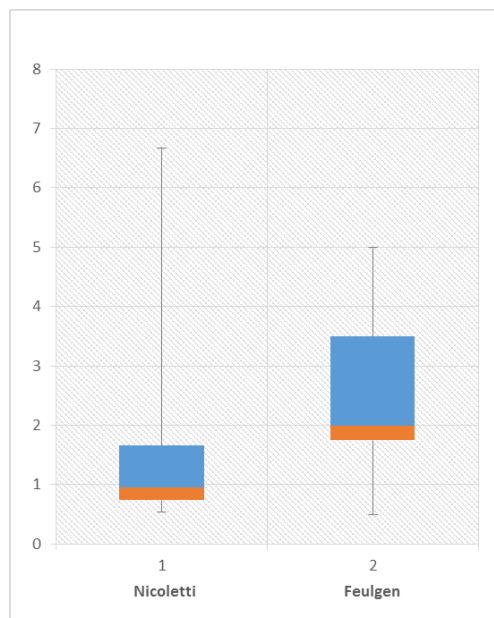
Az elkészült keneteket szobahőmérsékleten száradni hagyjuk, majd 24 órán át sötétben tároltuk a vizsgálat előtt. A festés eredményeként csak a spermiumok magja festődik, a citoplazma, az akroszóma és a farok nem. A 15 bika spermájából 2-2 kenetet készítettünk, majd minden bikától 200-200 sejtet számoltunk le és csoportosítottuk morfológia és DNS kondenzáció alapján, az objektivitás érdekében a tárgylemez teljes felületét végigpásztázva. A keneteket 1000-szeres nagyításban, 100 x immerziós objektívvel vizsgáltuk Olympus CX40 fénymikroszkóp segítségével. Az alábbi 5 csoportot különböztettük meg a spermiumok fej morfológiája szerint: normál, kicsi, kerek, körte, nagy, és mind a jól kondenzált, mind a nem megfelelően tömörült kromatinnal rendelkező spermiumokat besoroltuk ebbe az öt csoportba.

A Nicoletti-teszt egy egyszerű, flow citométeres értékeléshez alkalmas eljárás, amely egy fluoreszcens festék (propidium-jodid) használatával képes mérni a DNS fragmentáció mértékét a sejtekben (KAKASI, és mtsai. 2015). A spermát PBS-ben való mosás után 1ml fluoreszcens festékoldattal kevertük, ami 0,1% nátrium citrát, 0,1% TritonX-100, 50mg/l propidium jodid és desztillált víz oldata. A mintákat 4°C-on 24 óráig tároltuk, majd a vizsgálatot Beckman Coulter FC500 flow citométerrel végeztük el. A fő haploid csoportnál (ép kromatin állomány) mért fluoreszcenciához képest alacsonyabb értékek jelentették a darabolódott DNS-t, az annál magasabb értékeket mutató spermiumokra pedig a nem megfelelő kromatin kondenzáció volt a jellemző (NAGY és KAKASI 2014).

A statisztikai elemzéshez az R commander és a Minitab 17 statisztikai programot használtuk. A két módszer kapcsolatának vizsgálatát nemparaméteres Mann-Whitney U teszttel végeztük. A Feulgen-festés és a Nicoletti-teszt eredményeinek kapcsolatát, valamint a normális morfológia és rendellenes kromatinkondenzáció kapcsolatát Spearman rangkorrelációval értékeltük.

Eredmények és értékelés

Az **1. ábra** alapján látható, hogy a vizsgált módszerek eltérő eredményeket mutatnak. Spearman rangkorrelációval vizsgálva enyhe ($R_s=0,45$) de nem szignifikáns ($P=0,92$) a kapcsolat a két adatsor között.



1. ábra A Nicoletti-teszt és a Feulgen-festés eredményei dobozos ábrákon. Medián, alsó-felső kvartilis és minimum-maximum értékek ábrázolva.

A Mann-Whitney U teszt alapján szignifikáns ($p=0,016$) különbség van a Feulgen-festés eredményei és a Nicoletti-teszt eredményei között. A primer morfológiai defektusok alacsony számban voltak jelen a vizsgált spermamintákban (7%), a rendellenes kromatinkondenzációt mutató ondósejtek körében azonban ez az arány jóval magasabb volt (36%). Spearman rangkorrelációval vizsgálva a kromatinállapot és a spermiummorfológia kapcsolatát, a Feulgen-festés során kapott kromatinkondenzációs eredmények és a normális morfológia között szignifikáns ($P=0,006$) szoros negatív korreláció ($R_s=-0,67$) volt jelen. A Nicoletti-teszt eredményei és a morfológiai adatok között nem volt szignifikáns kapcsolat.

Következtetések

A spermiumok DNS állapotának vizsgálatára számos módszer ismert, például a Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA; EVENSON, 1999), TUNEL teszt, Nicoletti-teszt (KAKASI és mtsai, 2015). A jelen vizsgálat célja az volt, hogy a régóta ismert Feulgen-festési eljárást összehasonlítsuk az előbb említett Nicoletti-teszttel. A kísérlet során kiderült, hogy bár mindkét módszer alkalmas a kromatin kondenzációs állapotának megítélésére, mégis más eredményt mutatnak. A Feulgen-festéssel kétszer annyi rendellenes spermiumot észleltünk,

mint a Nicoletti-teszttel. Az eltérésnek oka lehet a mikroszkópos munka szubjektivitása, illetve hogy a rendellenes kromatinkondenzáció aránya a spermiumok között nagyon alacsony volt.

A vizsgált bikák esetében szignifikáns negatív kapcsolat volt észlelhető a normál spermiummorfológia és a rendellenes kromatinkondenzáció között. Tehát egy primer morfológiai értékeléssel is képet kaphatunk a spermiumok DNS állapotáról. Az eredmények alapján további vizsgálatok javasolhatók az adott témában más állatfajok esetében is.

Köszönetnyilvánítás

A publikáció elkészítését a EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Irodalomjegyzék

- BARTH, A.D., és OKO, R.J *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Wiley-Blackwell, 1991.
- EVENSON, D. P. „Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects.” *Reproduction, Fertility and Development* , 1999: 1-15.
- GERE, T., P. SOÓS, és F. SZÁSZ. *A szarvasmarha mesterséges termékenyítése*. Budapest: Mezőgazda Kiadó, 1998.
- KAKASI, B., SZ. NAGY, L. PÁL, GY. E. CZIMBER, és F. HUSVÉTH. „A comparison of alternative assays to measure DNA Damage in stallion spermatozoa: Tunel test versus 'Nicoletti assay'.” *Acta Veterinaria Hungarica*, 2015: 118-124.
- NAGY, SZ., és B. KAKASI. „'Nicoletti assay' - an alternative flow cytometric testing of bull sperm DNA status?” *Reproduction In Domestic Animals* 49:(Suppl. 3), 2014: 83.