

Wykorzystanie cytometrii przepływowej w seksowaniu i ocenie jakości nasienia ssaków

Michał Bochenek

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt
Instytut Zootechniki
Balice k. Krakowa

1. Seksowanie nasienia

Możliwość regulacji płci może mieć istotne znaczenie w hodowli zwierząt z co najmniej dwóch powodów. Po pierwsze, dysponowanie większą liczbą samic w stadzie korzystnie wpływa na efekty genetyczne i hodowlane; po drugie, przewaga samców z ich wyższymi, nawet o kilkanaście procent, przyrostami wagi jest pożądana w fermach towarowych, przeznaczających zwierzęta na ubój.

Termin **regulacja płci** może się odnosić zarówno do plemników, jak i zarodków. Jednak uzyskiwanie zarodków, mimo stosowania superowulacji czy zapłodnienia *in vitro*, wciąż wiąże się ze znacznymi kosztami. W związku z tym, jak się wydaje, znacznie atrakcyjniejsza jest możliwość sterowania płcią na wcześniejszym etapie, poprzez odpowiednie separowanie plemników. Zainteresowanie metodami rozdziału plemników zwierząt notuje się już od czasu szerokiego wprowadzenia inseminacji do praktyki hodowlanej bydła. Do niedawna jednak zasadniczą barierą pozostawał brak wiarygodnych i szybkich metod identyfikacji „płci” plemników, a także możliwości skutecznego odseparowania „rozpoznanych” już frakcji. Obecnie istnieje kilka sposobów różnicowania plemników niosących chromosomy X i Y. Opierają się one bądź na zjawisku punktowej fluorescencji barwionych plemników zawierających chromosom Y (3), bądź też wykorzystują metodę podwójnej hybrydyzacji *in situ* (22), lub pośrednią analizę chromosomalną (42).

Równocześnie z badaniami nad identyfikacją „płci” plemników prowadzono — w przypadku bydła już od lat pięćdziesiątych — próby fizycznego rozdziału nasienia na frakcje męską i żeńską oraz wykorzystanie ich do zapłodnienia. Próby te opierały się na wykorzystaniu zakładanych różnic pomiędzy plemnikami niosącymi chromosomy X i Y, a dotyczącymi wielkości i ciężaru (37), szybkości poruszania się (3), ładunku elektrycznego (5), właściwości powierzchni plemników (7), jak również różnic o charakterze immu-

nologicznym (4,33). Wymienione jednak metody, jak się okazało, były niezadowolające z powodu niskiej dokładności i wydajności, lub też jako dające możliwość odseparowania tylko jednej frakcji nasienia. Rozdzielone w ten sposób nasienie posiadało ponadto niewielką zdolność zapładniającą. W reultacie żadna ze wspomnianych metod nie znalazła praktycznego zastosowania.

Od pewnego czasu największe zainteresowanie budzi możliwość rozdziału plemników za pomocą cytometrii przepływowej. Jest to fluorescencyjna metoda badania właściwości strukturalnych i funkcjonalnych pojedynczych komórek. Badane komórki są znakowane fluorochromami bądź bezpośrednio, bądź za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Zawiesina pojedynczych komórek jest formowana w strumień cieczy o odpowiedniej średnicy tak, aby na jego przekroju poprzecznym mieściła się tylko jedna komórka. Podczas przejścia przez punkt analizy cytometru wzbudzona światłem laserowym fluorescencja barwnika w komórkach jest elektronicznie wzmacniana i przedstawiana w formie histogramów. Ponieważ całkowita fluorescencja otrzymywana z komórek jest separowana dzięki odpowiednim filtrom na wąskie pasma, istnieje możliwość równoczesnego znakowania komórek dwoma lub trzema barwnikami. Podstawową zaletą cytometrii przepływowej jest obiektywność oceny poziomu fluorescencji, możliwość rozdzielania fluorescencji pochodzącej z różnych źródeł w komórce, oraz duża szybkość analizy, wahająca się od kilkuset do kilku tysięcy komórek na sekundę.

Szczegółowy opis metody cytometrii przepływowej i jej zastosowań w biotechnologii zwierząt został dokonany przez Smoraga i wsp. (39).

Pomysł wykorzystania cytometrii przepływowej do rozdziału nasienia według „płci” narodził się na początku lat osiemdziesiątych, kiedy Pinkel i wsp. (34) stwierdzili możliwość dokonania precyzyjnego pomiaru DNA oraz różnic jego zawartości pomiędzy plemnikami niosącymi chromosom X lub Y. Barwili oni utrwalone plemniki kilku gatunków ssaków bromkiem etydy, mitramycyną lub DAPI. Podobne badania z wykorzystaniem fluorochromu Hoechst 33343 przeprowadził Keeler i wsp. (29). Barwnik ten, stosowany obecnie powszechnie w pracach nad sortowaniem nasienia, łatwo przenika przez nie uszkodzone błony żywych komórek, łączy się stechiometrycznie z DNA w okolicach par zasad A-T, a wzbudzany światłem ultrafioletowym fluoryzuje w paśmie 450 nm. Niekorzystne zjawisko „soczewkowania” fluorescencji plemników, polegające na skupianiu światła w kierunku krawędzi główki spowodowało konieczność stosowania specjalnie zmodyfikowanych cytometrów (25). Modyfikacje te, obejmujące odpowiednie ukształtowanie dyszy wylotowej urządzenia oraz odczytywanie fluorescencji DNA z dwóch ustawionych pod kątem 90° detektorów, mają na celu analizowanie i sortowanie plemników ułożonych pod jednakowym kątem względem osi odczytu.

Pierwszych prób sortowania nasienia tą metodą dokonano w drugiej połowie lat osiemdziesiątych (23). Nasienie buhaja, knura i tryka zostało dla ułatwienia analizy pozbawione witek. Dokonując po odsortowaniu powtórnej analizy stwierdzono, że dokładność rozdziału tak przygotowanych plemników wynosiła ponad 90%. Ustalono również, że różnice w zawartości DNA ple-

mników buhaja, knura i tryka wynoszą odpowiednio: 3,9; 3,7; i 4,2%. W kolejnych badaniach (31) wykazano, że barwione Hoechstem 33342 i sortowane plemniki buhaja i królika mogą zachować ruchliwość i zdolność zapładniająca. Po inseminacji sortowanym nasieniem buhaja uzyskano istotne przesunięcie proporcji płci potomstwa. Zanotowano jednak znaczne obniżenie płodności, gdyż w wyniku inseminacji wycieliło się zaledwie 30% krów.

W pełni skutecznego rozdziału plemników dokonano w końcu lat osiemdziesiątych na nasieniu królika (24). W reanalizie nasienia świeżego, barwionego Hoechstem 33342 wykazano, że dokładność separacji wynosiła 86% w przypadku plemników „żeńskich”, oraz 81% w przypadku „męskich”. Rozdzielone plemniki wprowadzane były chirurgicznie do macicy królic. Uzyskano około 28% wykotów; potomstwo urodzone po inseminacji frakcją X było w 94% płci żeńskiej, natomiast po inseminacji frakcją Y w 81% męskie. Nieco gorsze rezultaty osiągnięto sortując nasienie knura (26). Również w tym przypadku skuteczność rozdziału oceniano na podstawie reanalizy i inseminacji chirurgicznej loch. Odsetek prosiąt płci żeńskiej po inseminacji „żeńską” frakcją wyniósł 74%, a płci męskiej po inseminacji „męską” frakcją — 68%.

W przedstawionych tutaj badaniach nad rozdziałem plemników dowiedziono, że istnieje realna możliwość „seksowania” nasienia. W badaniach tych wskazano równocześnie na istotne ograniczenia metody, z których do najważniejszych zaliczyć można niewielką szybkość sortowania, osiągającą przeciętnie 100-200 komórek/sekundę, oraz znacznie obniżoną ruchliwość plemników. W pracach przeprowadzanych w latach dziewięćdziesiątych, jak się wydaje, wskazuje się, że nasienie separowane za pomocą cytometrii przepływowej stosowane być może do zapłodnienia poprzez mikroiniekcję plemników do oocytu (30), *in vitro* (8), lub w najlepszym przypadku laparoskopową inseminacją domaciczną (9).

Osobną kwestią pozostaje wpływ barwnika na zdolność zapładniającą i rozwój zarodka. Wspomniano już, że Hoechst 33342 pozostaje nadal powszechnie stosowanym przy separacji nasienia fluorochromem. Wyszukane początkowo zastrzeżenia nie znalazły jak dotąd potwierdzenia. W przypadku barwionych tym związkiem plemników buhaja obserwowano wprawdzie nieznaczne obniżenie zdolności do zapłodnienia *in vitro*, jednak nie dotyczyło ono wszystkich badanych ejakulatów. Podobnie nie potwierdziły się zastrzeżenia dotyczące uszkodzeń chromosomów, czy też wad potomstwa jako rezultatu zapłodnienia barwionymi plemnikami (40).

2. Ocena jakości nasienia

Powszechnie stosowane mikroskopowe metody oceny jakości nasienia posiadają wiele istotnych ograniczeń wpływających w poważny sposób na ich wiarygodność. Do podstawowych parametrów określanych rutynowo należy: koncentracja nasienia, procent plemników ruchliwych i rodzaj ich ruchu. Ocena taka — dokonywana coraz częściej za pomocą urządzeń komputerowych (*Computer Assisted Sperm Analysis*), a także określenie czasu przeży-

wania plemników pozwala jedynie na odrzucenie ejakulatów ewidentnie nieprzydatnych do mrożenia i inseminacji. Znacznie dokładniejsze, mikroskopowe badania morfologii i biochemii plemników są z kolei pracochłonne, żmudne, a liczba ocenionych plemników nie przekracza z reguły kilkuset.

Jedną z metod badawczych z powodzeniem wprowadzanych do oceny nasienia ssaków w ciągu ostatnich lat jest cytometria przepływowa. W metodzie tej nasienie stanowi dogodny obiekt analiz — jest to jednorodna zawiesina pojedynczych komórek, a jedynym postępowaniem przygotowującym je do barwienia jest dodatkowe rozrzedzenie. Plemniki posiadają wiele struktur i cech funkcjonalnych, które mogą być z powodzeniem badane za pomocą cytometru przepływowego. Należą do nich: integralność błon komórkowych, metabolizm (aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych i aktywność mitochondrialna), zmiany zachodzące na powierzchni plemników w trakcie kaptacji, uszkodzenia akrosomu, a także struktura chromatyny i przebieg jej „dojrzwania” w trakcie spermatogenezy.

2.1. Ocena błon komórkowych

W ocenie integralności błony komórkowej stosuje się barwniki fluorescencyjne, których podstawową w tym przypadku cechą jest brak zdolności przenikania przez nie uszkodzoną błonę komórkową. W celu wyeliminowania błędnego zaliczania fragmentów rozerwanych komórek jako całych komórek używa się związków barwiących jądro komórkowe (DNA). W przypadku zastosowania barwnika tego typu świecą tylko komórki o uszkodzonej błonie komórkowej, a ogólną liczbę badanych plemników zlicza się na podstawie niefluorescencyjnych parametrów: czołowego i bocznego rozproszenia światła laserowego (*Forward & Side Scatter*). W analizach plemników najczęściej stosowanym do tego celu związkiem jest jodek propydydy (PI). Fluorochrom ten wzbudzany jest standardowym w cytometrach laserem 488 nm, a maksimum jego emisji przypada na pasmo czerwone. Barwienie komórek jest proste, a próbki można poddawać analizie niemal bezpośrednio po dodaniu barwnika. Przydatność tego barwnika do oceny uszkodzeń błon plemników sprawdzono porównując analizy w cytometrze przepływowym z oceną mikroskopową rozmazów barwionych eozyną/nigrozyną (21). W badaniach tych wykazano zadowalającą zgodność wyników obu metod.

Wprowadzenie do analiz nasienia z udziałem PI czasu jako dodatkowego parametru (6) ujawniło, że oprócz plemników bez fluorescencji (z nie uszkodzoną błoną komórkową) i z wyraźnym świeceniem (uszkodzonych) występuje również trzecia grupa o zmiennym poziomie fluorescencji. Plemniki tej grupy charakteryzują się stopniowym wzrostem świecenia w trakcie trwania analizy, a następnie jego spadkiem po zdekompresowaniu próbki w cytometrze. Liczebność tej grupy może się wahać od kilku do ponad dwudziestu procent, a cykle wzrostu i spadku fluorescencji powtarzają się ze słabnącym nasileniem kilkakrotnie. Zaobserwowana zmienna fluorescencja występuje prawdopodobnie u plemników zamierających, tzn. na początku procesu utraty integralności błony komórkowej i jeszcze aktywnym metabolizmie.

Oprócz PI do oceny struktury błony komórkowej plemników bywają czasami stosowane również inne barwniki, np. bromek etydyny (EB) (13) o podobnych do PI właściwościach spektralnych, bądź Hoechst 33258 (41), wzbudzany światłem ultrafioletowym i posiadający emisję w paśmie niebieskim. Ponieważ cytometria przepływowa oferuje możliwość zastosowania i pomiaru fluorescencji dwóch lub trzech barwników naraz, ocenę błon komórkowych plemników można przeprowadzić równocześnie z analizą innych cech: stopnia uszkodzeń akrosomów i aktywności mitochondrialnej (13,16,21), enzymów wewnątrzkomórkowych (16,18) bądź też z barwnikami DNA żywych komórek (17). Przy złożonych analizach należy brać pod uwagę właściwości spektralne stosowanych barwników, a w razie częściowego pokrywania się pasm emisji fluorescencji dokonywać odpowiedniej kompensacji.

2.2. Ocena metabolizmu

W przypadku mikroskopowej oceny plemników termin „żywe/martwe” odnosi się do analizy przepuszczalności błony za pomocą barwienia eozyńa/nigrozyną. Z punktu widzenia cytometrycznej analizy nasienia termin ten ma szersze znaczenie. Obejmuje on oprócz opisanej oceny uszkodzeń zewnętrznej błony komórkowej także parametry funkcjonalne plemników: aktywność enzymatyczną i mitochondrialną.

Octan fluoresceiny (FDA) jest niefluoryzującym związkiem łatwo przenikającym przez nie uszkodzone błony komórkowe. Przy udziale aktywnych esteraz komórkowych hydrolizuje on do wolnej fluoresceiny — barwnika świecącego jasno w paśmie zielonym. Garner i wsp. (18) zastosowali odmianę FDA — octan karboksylfluoresceiny (CFDA) charakteryzującą się dłuższą retencją w komórkach. Podwójne barwienie za pomocą CFDA i PI przeprowadzili na nasieniu mężczyzn, buhajów, knurów, psów, ogierów i myszy. Na podstawie analizy cytometrycznej wykazano trzy grupy plemników: świecące zielono — aktywne enzymatycznie, świecące czerwono — z uszkodzonymi błonami komórkowymi i świecące w obu pasmach. Po badaniach mikroskopowych tej ostatniej grupy okazało się, że fluorescencję zieloną wykazywały akrosomy, podczas gdy chromatyna świeciła w paśmie czerwonym. Plemniki takie zostały zatem uznane za uszkodzone. W analizie cytometrycznej trzech grup plemników dokonanej na 14 próbkach mrożonego nasienia buhajów okazało się, że jest ona dobrze skorelowana ze standardowymi metodami oceny.

Badania mające na celu stwierdzenie aktywności mitochondrialnej przeprowadził Evenson i wsp. (13). Zastosował on rodaminę 123 (R123), kationowy barwnik wykazujący emisję w paśmie zielonym. Fluorochrom ten wiąże się z posiadającymi silny ujemny ładunek błonami aktywnych mitochondriów. Do oceny uszkodzeń zewnętrznych błon komórkowych użył bromku etydyny (EB) o podobnych do PI właściwościach spektralnych. Na podstawie uzyskanych wyników w przeprowadzonej analizie cytometrycznej nasienia ludzkiego wykazano, że intensywność fluorescencji mitochondriów jest wprost proporcjonalna do ruchliwości plemników i spada wraz z upływem czasu.

Podobne analizy przeprowadził Graham i wsp. (21) na nasieniu buhajów, stosując PI w miejsce EB dla rozpoznania struktury błony komórkowej. Dla oceny przydatności tej techniki zastosował inhibitory metaboliczne pozwalające stwierdzić powiązania między aktywnością mitochondriów a intensywnością fluorescencji R123. Dodatek fluorku sodu (NaF), będącego inhibitorem glikolitycznym, nie wpłynął na fluorescencję mitochondriów; natomiast inhibitory mitochondrialne — rotenone i monensin spowodowały spadek fluorescencji o około 50%. Dodatek inhibitorów nie wpłynął natomiast na liczbę plemników z uszkodzoną błoną komórkową.

2.3. Ocena akrosomów i kapacytacji

Prawidłowy przebieg reakcji akrosomalnej jest jednym z niezbędnych warunków penetracji komórki jajowej, a w konsekwencji jej zapłodnienia. Ocena stanu akrosomu ma zatem istotne znaczenie dla całościowej oceny nasienia. Jednym ze związków stosowanych do tego celu w cytometrii przepływowej są lektyny (fitohemaglutyniny) — proteiny otrzymywane głównie z roślin motylkowych. Posiadają one zdolność tworzenia specyficznych wiązań z mono- i oligosacharydami i są szeroko stosowane jako związki analityczne w badaniach glikoprotein komórkowych. Lektyny same w sobie nie są związkami fluorescencyjnymi, a do analiz cytometrycznych muszą być wyznakowane odpowiednimi barwnikami — najczęściej fluoresceiną (FITC) lub fikoerytryną (PE). Graham i wsp. (21) w swej pracy dotyczącej kompleksowej oceny nasienia buhajów zastosowali do badania akrosomów lektynę PSA (*Pisum Sativum Agglutinin*). Reakcję akrosomalną wywoływano za pomocą dilaurylfosfatydylocholiny (PC12), lub lizofosfatydylocholiny (LPC), kontrolę przebiegu reakcji akrosomalnej stanowiły rozmazy nasienia barwione naftolem/erytrozyną. Próbkę znakowano PSA/FITC oraz, w celu uwidocznienia plemników o uszkodzonej błonie komórkowej, jodkiem propydydy. W przeprowadzonych analizach wykazano wzrost fluorescencji plemników z akrosomami uszkodzonymi oraz z indukowaną reakcją akrosomalną. Niespecyficzne wiązanie PSA z plemnikami o nie tkniętych akrosomach powodowało pewien błąd oceny w stosunku do oceny mikroskopowej rozmazów. Błąd ten okazał się jednak możliwy do skorygowania poprzez odpowiednią elektroniczną obróbkę histogramów. Podobne badania, z użyciem PSA, zostały przeprowadzone również na nasieniu ludzkim (43). Reakcję akrosomalną wywoływano w nich za pomocą dodatku jonoforu wapniowego A23187 lub całonocnej inkubacji w obecności CO₂. Stwierdzono przy tym, że choć ocena cytometryczna jest bardzo szybka i obiektywna, to w pewnych przypadkach musi być ona uzupełniona kontrolą mikroskopową.

Właściwości lektyn zostały wykorzystane także do śledzenia procesu kapacytacji plemników: Ashworth i wsp. (1) przetestowali 21 lektyn na nasieniu tryków i knurów, inkubowanym uprzednio w płynie Tyrode'a w obecności lub przy braku CO₂. Wobec silnego toksycznego wpływu lektyn na plemniki opracowali oni metodę szybkiego znakowania nasienia, pozwalającą zakończyć analizę już w około 3 minuty po ich dodaniu. W przeprowadzonych

analizach cytometrycznych i mikroskopowych stwierdzono znaczne zmiany w intensywności i umiejscowieniu wiązań powierzchniowych lektyn. Plemniki inkubowane w obecności CO₂ wykazywały w większości silniejszą ogólną fluorescencję z wyróżnieniem rejonów akrosomu, choć w przypadku zastosowania lektyny ECL (*Erythrina Cristagalli Lectin*) zanotowano efekt odwrotny, tj. spadek fluorescencji. Zmiany te nie były wywołane zachodzącą reakcją akrosomalną. Po takiej reakcji, indukowanej w próbkach kontrolnych za pomocą jonoforu A23187, zaobserwowano silny wzrost fluorescencji akrosomów. Wzrost ten był niezależny od zmian zachodzących w trakcie inkubacji w płynie Tyrode'a z CO₂. W badaniach tych stwierdzono także konieczność uwidocznienia i tym samym eliminowania z analizy plemników o uszkodzonej błonie komórkowej. Silne powinowactwo lektyn do substancji wewnątrzkomórkowych powoduje bowiem „zacieranie” obrazu struktury glikoprotein powierzchniowych plemników.

Skomplikowana procedura znakowania lektynami, ich toksyczność powodująca szybki wzrost liczby plemników martwych, a także wyniki z niespecyficznego wiązania ryzyko błędu spowodowały poszukiwania możliwości badania reakcji akrosomalnej za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Prace z udziałem przeciwciał MH61 i CD46 skierowanych na antygeny wewnętrznej błony akrosomalnej (41) zostały przeprowadzone na nasieniu ludzkim; inne przeciwciała — GB24, skierowane również na wewnętrzne antygeny akrosomu zastosowano do analiz nasienia ludzkiego (15) i knurzego (35). Wspomniane przeciwciała wykazały wysoką specyficzną wiązań z akrosomami, dając jasną i silną fluorescencję plemników po reakcji akrosomalnej. Ponadto GB24 jako przeciwciała niespecyficzne gatunkowo mogą być stosowane także do badań nasienia buhajów. W badaniach tych do uwidocznienia plemników z uszkodzonymi błonami komórkowymi wprowadzono fluorochromy Hoechst 33258 (41) lub PI (15,35).

2.4. Ocena struktury chromatyny

W trakcie procesu spermatogenezy chromatyna plemników ulega poważnym przekształceniom. Proces ten nazywany niekiedy „dojrzwaniem” plemników polega na wymianie białek histonowych chromatyny na protaminy — niewielkie proteiny o dużej zawartości argininy i cysteiny, a następnie utlenianiu grup sulfhydrylowych (-SH) tych protamin do postaci mostków dwusiarczkowych (-S-S-). Procesom tym towarzyszy silna kondensacja chromatyny.

Na podstawie analiz nasienia pobranego z różnych odcinków najadrdzy szczurów i myszy (38), a także chomików (44) stwierdzono możliwość śledzenia przebiegu tego procesu za pomocą cytometrii przepływowej. Wykorzystano do tego celu fluorochrom mBBr (monobromobimane) wiążący się selektywnie z grupami sulfhydrylowymi. Barwnik ten wzbudzany jest światłem ultrafioletowym, a świeci w paśmie niebieskim. Analizując nasienie buhajów i ludzkie (38) stwierdzono istotne różnice w zawartości grup -SH pomiędzy ejakulatami poszczególnych osobników. Gledhill i wsp. (19) barwiąc nasienie

szczurów i myszy fluorochromem CPM (7-diethylamino-3-[4'-maleimidylphenyl]-4-methylcoumarin) zauważyli znaczny spadek liczby grup sulfhydrylowych w trakcie przesuwania się plemników pomiędzy trzonem a ogonem najądrzy.

Złożone procesy kondensacji chromatyny są bardzo wrażliwe na czynniki zakłócające ich przebieg. Metoda oceny struktury chromatyny plemnikowej (*Sperm Chromatin Structure Assay*, SCSA) (14) opiera się stwierdzeniu, że DNA komórkowe posiada zmienną wrażliwość na denaturację podwyższoną temperaturą lub niskim pH (11). Wrażliwość ta zależy od stadium wzrostu i różnicowania komórki, zakłóceń tych procesów, bądź działania czynników toksycznych. W metodzie SCSA wykorzystuje się metachromatyczne właściwości oranżu akrydyny (AO). Barwnik ten związany z podwójną nicią DNA fluoryzuje w paśmie zielonym, w połączeniu z RNA i pojedynczą nicią DNA — w paśmie czerwonym. Po łagodnej denaturacji chromatyny za pomocą temperatury, bądź obniżonego pH, u plemników z nieprawidłową jej strukturą następuje wzmocnienie fluorescencji w paśmie czerwonym. Ten wzrost świecenia wyrażony jest indeksem α_t , gdzie $\alpha_t = \text{czerwona} / (\text{czerwona} + \text{zielona})$ fluorescencja. W związku z tym, że RNA w plemnikach praktycznie nie występuje, α_t pozwala określić wyłącznie przyrost zdenaturowanego DNA. Metoda ta, już bez udziału denaturacji, umożliwia również śledzenie przebiegu zmian jakim podlega chromatyna w trakcie spermatogenezy. Yossefi i wsp. (44) wykorzystując zarówno mBBR, jak i AO obserwowali przebieg dojrzewania chromatyny plemników w najądrzach chomika. Stwierdzili oni, że proces oksydacji grup sulfhydrylowych następuje głównie w ogonie najądrzy, podczas gdy zasadnicza kondensacja chromatyny zachodzi wcześniej — w głowie najądrzy. Zaobserwowano ponadto osłabienie zdolności łączenia się cząstek AO z DNA w miarę postępowania procesu kondensacji.

W badaniach przeprowadzonych na dużej liczbie mrożonych ejakulatów buhajów (2) wykazano występowanie wysokiej korelacji między wrażliwością chromatyny na denaturację a płodnością uzyskiwaną po inseminacji tym nasieniem, przy czym poziom tej wrażliwości odzwierciedla nawet niewielkie różnice płodności (badania własne, w przygotowaniu do druku). Podatność na denaturację maleje wraz z wiekiem zwierzęcia. W analizie ejakulatów dwóch grup buhajów w wieku 14 miesięcy i 4 lat wykazano w grupie starszej zwiększoną odporność chromatyny na denaturację i odpowiedni wzrost wskaźnika niepowtarzalności po inseminacji tym nasieniem (27).

Metodę SCSA wykorzystano także do oceny wpływu rozrzedzalnika na mrożone nasienie (28). Sprawdzano w tym przypadku efekt użycia do mrożenia nasienia buhajów kombinacji rozrzedzalników mlekowego i żółtkowego. W trakcie analiz stwierdzono m.in. zwiększoną podatność na denaturację chromatyny plemników mrożonych uprzednio w rozrzedzalniku mlekowym. Sailer i wsp. (36) przeprowadzili porównanie płodności, struktury chromatyny oraz szesnastu parametrów morfometrycznych główek plemników buhajów barwionych metodą Feulgena. W analizach wykazano występowanie istotnych korelacji pomiędzy płodnością, poziomem wrażliwości chromatyny na denaturację, oraz takimi parametrami główek plemników jak: długość,

szerokość, powierzchnia, obwód, stosunek obwód/powierzchnia, stopień „kuliści” i nieregularności kształtu główki.

Evenson i wsp. (12) dokonali metodą SCSA oceny struktury chromatyny plemników myszy, szczurów, buhajów, tryków, knurów, ogierów i indyków. Przeprowadzając analizy na sześciu typach cytometrów ortogonalnych i epifluoryscencyjnych różnych producentów osiągnęli zadowalającą powtarzalność wyników wykazując przydatność metody dla oceny chromatyny plemników.

Podwyższona wrażliwość chromatyny na denaturację jest dodatnio skorelowana z obecnością w plemnikach luźnych krótkich odcinków DNA, będących wynikiem degradacji chromatyny. Oba te zjawiska są charakterystyczne dla apoptozy — aktywnej, „samobójczej” śmierci komórek. Istnieje interesująca teoria (10,20), że te zachodzące w plemnikach procesy są przejawem istnienia zbliżonego do apoptozy mechanizmu zmierzającego do wyeliminowania plemników niosących genetyczne defekty. Ponieważ mechanizm ten uruchamiany jest w końcowym stadium spermatogenezy, w komórkach wysoce zróżnicowanych, część efektorów apoptotycznych jest już nieczynna. Cały proces ogranicza się zatem do aktywacji endonukleaz „tnących” DNA na charakterystyczne, krótkie fragmenty. Plemniki takie mogą odznaczać się normalną aktywnością mitochondrialną, ruchliwością, a w pewnych przypadkach nawet prawidłową morfologią.

W przeciwieństwie do innych metod fluorescencyjnych, takich jak tradycyjna mikroskopia fluorescencyjna lub konfokalna, cytometria przepływowa nie daje konwencjonalnego obrazu komórki z widocznym jej kształtem lub organellami. Obrazem analizy cytometrycznej jest tylko intensywność fluorescencji barwnika przedstawiana w formie histogramów. Z faktu tego pośrednio wynikają podstawowe zalety metody: wielka szybkość analiz, dokładność i obiektywizm otrzymanych wyników, elastyczność zastosowań oraz możliwość wydajnego rozdzielania (sortowania) komórek na podstawie zadanych kryteriów. Zwykle szybkość przepływu, odczytu i sortowania w cytometrze wynosi kilkaset komórek na sekundę, choć w przypadku samej tylko analizy może sięgnąć nawet kilku tysięcy. Wydajność taka jest niemożliwa do uzyskania w analizie mikroskopowej, gdzie zliczenie przeciętnej próbki 200-300 komórek zajmuje kilka minut. W przypadku cytometrii przepływowej możliwe jest ponadto stosowanie równocześnie 2-3 barwników, których fluorescencja jest precyzyjnie kwantyfikowana, co w zwykłym mikroskopie jest w ogóle niemożliwe. Należy jednak przy tym pamiętać, że cytometria przepływowa i mikroskopia fluorescencyjna są metodami w dużym stopniu uzupełniającymi się. Wstępna analiza mikroskopowa często poprzedza cytometryczną i traktowana jest jako kontrola skuteczności barwienia fluorochromami i wykrycia ewentualnych, niespecyficznych wiązań jak to ma na przykład miejsce przy znakowaniu plemników lektynami.

W przypadku nasienia ważne znaczenie ma to, że dla wykonania analizy konieczna jest niewielka próbka — kilkadziesiąt tysięcy plemników w zupełności wystarcza do tego celu. Dodatkową korzyść stanowi możliwość oceny pewnych cech równocześnie, np. integralności błon komórkowych z aktyw-

nością esteraz, strukturą akrosomu lub aktywnością mitochondrialną. Wprowadzenie czasu jako dodatkowego, niefluorescencyjnego parametru pozwala śledzić dynamikę pewnych procesów zachodzących w plemnikach, jak to ma miejsce w przypadku badań błon komórkowych. Dane zawierające informacje o każdym badanym plemniku są zapisywane komputerowo. Mogą być zatem w dogodnej chwili poddawane dalszym analizom i obliczeniom statystycznym.

Koszty cytometrycznych analiz plemników z reguły nie przekraczają nakładów przeznaczonych na analizy mikroskopowe. Wyjątkiem są badania z wykorzystaniem drogich przeciwciał monoklonalnych. Zasadniczą przeszkodą w upowszechnieniu metody jest wysoka cena samego urządzenia oraz konieczność posiadania wysokich kwalifikacji do jego obsługi. Trudności te, jak się wydaje, są w dużym stopniu jednak rekompensowane szerokim zakresem zastosowań metody zarówno w diagnostyce, jak i w badaniach naukowych.

Literatura

1. Ashworth P. J. C., Harrison R. A. P., Miller N. G. A., Plummer J. M., Watson P. F., (1995), *Mol. Reprod. Dev.*, 40, 164.
2. Ballachey B. E., Hohenboken W. D., Evenson D. P., (1987), *Biol. Reprod.*, 36, 915.
3. Beernink F. J., Dmowski W. P., Ericsson R. J., (1993), *Fertil. Steril.*, 59, 382.
4. Bennett D., Boyse E. A., (1973), *Nature*, 246, 308.
5. Blottner S., Bostedt H., Hewes K., Schill W. B., (1992), *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod.*, Hague, 1, 411-414.
6. Bochenek M., (1996), *J. Physiol. Pharm.*, 47, Suppl.1, 144.
7. Cartwright E. J., Harrington P. M., Cowin A., Sharpe P. T., (1993), *Mol. Reprod. Dev.*, 34, 323.
8. Cran D. G., Johnson L. A., Miller N. G. A., Cochran D., Polge C., (1993), *Vet. Rec.*, 132, 40.
9. Cran D. G., McKelvey W. A. C., King M. E., Dolman D. F., McEvoy T. G., Broadbent P. J., Robinson J. J., (1997), *Theriogenology*, 47, 267.
10. Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F., (1997), *Cytometry*, 27, 1.
11. Darzynkiewicz Z., (1990), in: *Flow Cytometry and Sorting*, Wiley-Liss, New York, 315.
12. Evenson D., Jost L., Gaudou D., Rhodes L., Stanton B., Clausen O. P., de Angelis P., Coico R., Daley A., Becker K., Yopp T., (1995), *Cytometry*, 19, 295.
13. Evenson D. P., Darzynkiewicz Z., Melamed M. R., (1982), *J. Histochem. Cytochem.*, 30, 279.
14. Evenson D. P., (1990), in: *Methods In Cell Biology*, 33, Academic Press, San Diego, 401.
15. Fenichel P., Hsi B. L., Farahifar D., Donzeau M., Barrier-Delpech D., Yeh J. G., (1989), *J. Reprod. Fertil.*, 87, 699.
16. Garner D. L., Ericsson S. A., Thomas C. A., Marshall C. E., (1992), *12th Int. Congr. Anim. Reprod. Proc.*, 1, 467.
17. Garner D. L., Johnson L. A., Yue S. T., Roth B. L., Haugland R. P., (1994), *J. Androl.*, 15, 620.
18. Garner D. L., Pinkel D., Johnson L. A., Pace M. M., (1986), *Biol. Reprod.*, 34, 127.
19. Gledhill B. L., Evenson D. P., Pinkel D., (1990), in: *Flow Cytometry and Sorting*, Wiley-Liss, New York, 530.
20. Gorczyca W., Traganos F., Jesionowska H., Darzynkiewicz Z., (1993), *Exp. Cell Res.*, 207, 202.

21. Graham J. K., Kunze E., Hammerstedt R. H., (1990), *Biol. Reprod.*, 43, 55.
22. Han T., Ford J. H., Webb G. C., Flaherty S. P., Correl A., Matthews C. D., (1993), *Mol. Reprod. Dev.*, 34, 308.
23. Johnson L. A., Clark R. N., (1988), *Gamete Res.*, 21, 335.
24. Johnson L. A., Flook J. P., Hawk H. W., (1989), *Biol. Reprod.*, 41, 199.
25. Johnson L. A., Pinkel D., (1986), *Cytometry*, 7, 268.
26. Johnson L. A., (1991), *Reprod. Dom. Anim.*, 26, 309.
27. Karabinus D. S., Evenson D. P., Jost L. K., Baer R. K., Kaproth M. T., (1990), *J. Dairy Sci.*, 73, 2364.
28. Karabinus D. S., Evenson D. P., Kaproth M. T., (1991), *J. Dairy Sci.*, 74, 3836.
29. Keeler K. D., Mackenzie N. M., Dresser D. W., (1983), *J. Reprod. Fertil.*, 68, 205.
30. Medvedev S., Bossak N., Eckert J., Lucas-Hahn A., Niemann H., Johnson L. A., (1997), *Theriogenology*, 47, 270.
31. Morrell J. M., Dresser D. W., (1989), *Mut. Res.*, 224, 177.
32. Ogawa S., Yamakawa A., Yamanoi J., Nishida S., Kano Y., Takeshima T., Tauchi K., Nagashima H., (1988), *Theriogenology*, 29, 1083.
33. Peter A. T., Jones P. P., Robinson J. P., (1993), *Theriogenology*, 40, 1177.
34. Pinkel D., Lake S., Gledhill B. L., van Dilla M. A., Stephenson D., Watchmaker G., (1982), *Cytometry*, 3, 1.
35. Renard P., Drenou B., Griveau J. F., Le Lannou D., (1995), *Theriogenology*, 43, 927.
36. Sailer B. L., Jost L. K., Evenson D. P., (1996), *Cytometry*, 24, 167.
37. Schilling E., (1966), *J. Reprod. Fertil.*, 11, 469.
38. Seligman J., Shalgi R., Oschry Y., Kosower N. S., (1991), *Mol. Reprod. Dev.*, 29, 276.
39. Smorag Z., Bochenek M., (1995), *Biotechnologia*, 3(30), 54.
40. Smorag Z., Ryńska B., Kańska L., Słota E., (1993), *Anim. Sci., Papers and Reports*, 11, 117.
41. Tao J., Du J., Critser E. S., Critser J. K., (1993), *Human Reprod.*, 8, 1879.
42. Tateno H., Mikamo K., (1987), *J. Reprod. Fertil.*, 81, 119.
43. Uhler M. L., Leung A., Chan S. Y., Schmid I., Wang C., (1993), *Fertil. Steril.*, 60, 1076.
44. Yossefi S., Oschry Y., Lewin L., (1994), *Mol. Reprod. Dev.*, 37, 93.

Flow cytometry in mammalian sperm sexing and quality measurement

Summary

Flow cytometry is a powerful technique for measurements of many structural and functional cell parameters. In sperm analyses it offers several advantages over the formerly used methods: high accuracy, possibility of measuring two or even three parameters simultaneously and analysis of a high number of cells per second. Moreover, at present it is the only technique which allows sperm sorting of X- and Y-fractions with high purity.

The paper is a review of the flow cytometry applications in sperm sexing and measurements of quality parameters: membrane integrity, acrosome status, mitochondrial and esterase activity and sperm chromatin structure.

Key words:

flow cytometry, sperm sexing, sperm quality measurements.

Adres do korespondencji:

Michał Bochenek, Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa.