

MTA Doktori értekezés

**Gazdasági állatok spermaminőség-ellenőrzésének
automatizálási lehetőségei**

Dr. Nagy Szabolcs Tamás

Keszthely

2019

dc_1642_19

TARTALOM

| | |
|---|----|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 6 |
| BEVEZETÉS, CÉLKÖNYVÉsek | 8 |
| 1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS | 9 |
| 1.1. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán-stabilitásának értékelése Merocianin 540/Yo-PRO-1/Hoechst 33342 fluoreszcens festékkombinációval | 9 |
| 1.2. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán- és akroszóma-integritásának változásai multikolor flow citometria alkalmazásával értékelve | 10 |
| 1.3. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok mitokondriális aktivitásának értékelése MitoTracker Deep Red 633 festés és flow citometria alkalmazásával | 12 |
| 1.4. Magas környezeti hőmérséklet hatása halospermiumok plazmamembrán-integritására és mitokondriális aktivitására | 14 |
| 1.5. Spermium-kromatinszerkezet és morfológia: kapcsolat a fertilitással | 14 |
| 1.6. Alternatív DNS-károsodási tesztek összehasonlítása: TUNEL és Nicoletti-teszt | 17 |
| 1.7. Tenyészbikák gyors citogenetikai szűrővizsgálata spermiumok DNS-tartalmának flow citometeres hisztogramanalízisével..... | 18 |
| 2. ANYAG ÉS MÓDSZER | 21 |
| 2.1. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán-stabilitásának értékelése Merocianin 540/Yo-PRO-1/Hoechst 33342 fluoreszcens festékkombinációval | 21 |
| 2.1.1. Reagensek, médium összetevők..... | 21 |
| 2.1.2. Vizsgált állatok, spermaminták..... | 21 |
| 2.1.3. A spermaminták előkészítése laboratóriumi vizsgálatokhoz..... | 22 |
| 2.1.4. Motilitás- és koncentrációvizsgálatok | 22 |
| 2.1.5. Plazmamembrán-integritás | 22 |
| 2.1.6. Spermiummorfológia | 23 |
| 2.1.7. Merocianin 540/Yo-PRO 1/Hoechst 33342 festékkombináció | 23 |
| 2.1.8. Flow citometria | 23 |
| 2.1.9. Adatelemzés | 25 |
| 2.2. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán- és akroszóma-integritásának változásai multikolor flow citometria alkalmazásával értékelve | 25 |
| 2.2.1. Reagensek | 25 |
| 2.2.2. Spermaminták | 25 |
| 2.2.3. Hármas fluoreszcens festékkombináció | 26 |
| 2.2.4. Flow citometria | 26 |
| 2.2.5. Adatelemzés | 27 |
| 2.3. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok mitokondriális aktivitásának értékelése MitoTracker Deep Red 633 festés és flow citometria alkalmazásával | 29 |
| 2.3.1. Reagensek | 29 |
| 2.3.2. Vizsgált állatok, spermafeldolgozás | 29 |
| 2.3.3. A spermaminták előkészítése laboratóriumi vizsgálatokhoz..... | 29 |
| 2.3.4. Spermabírálat | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 2.3.5. Motilitás és koncentráció értékelése..... | 29 |
| 2.3.6. Fluoreszcens festékkombináció flow citométeres mérésekhez | 30 |
| 2.3.7. Flow citometria | 30 |
| 2.3.8. Adatelemzés | 31 |
| 2.4. Magas környezeti hőmérséklet hatása halspermiumok plazmamembrán-integritására és mitokondriális aktivitására | 32 |
| 2.4.1. Vizsgált állatok | 32 |
| 2.4.2 Plazmamembrán-integritás | 32 |
| 2.4.3. Mitokondriális aktivitás | 32 |
| 2.4.4. Flow citometria | 32 |
| 2.4.5. Adatelemzés | 33 |
| 2.5. Spermium-kromatinszerkezet és morfológia: kapcsolat a fertilitással | 33 |
| 2.5.1. Vizsgálatba vont apaállatok, mintavétel, termékenyítések | 33 |
| 2.5.2. Fertilitási mutatók | 34 |
| 2.5.3. Morfológiai értékelés..... | 34 |
| 2.5.4. Sperm Chromatin Structure Assay | 34 |
| 2.5.5. Akridin-narancs festés | 35 |
| 2.5.6. Flow citometria | 35 |
| 2.5.7. Adatértékelés | 36 |
| 2.5.8. Statisztikai elemzés | 36 |
| 2.6. Alternatív DNS-károsodási tesztek összehasonlítása: TUNEL és Nicoletti-teszt | 36 |
| 2.6.1. Spermaminták | 36 |
| 2.6.2. TUNEL teszt | 37 |
| 2.6.3. Nicoletti teszt | 38 |
| 2.6.4. Mikroszkópia | 39 |
| 2.6.5. Konfokális lézer pástázó mikroszkópia | 39 |
| 2.6.6. Adatelemzés | 39 |
| 2.7. Tenyészbikák gyors citogenetikai szűrővizsgálata spermiumok DNS-tartalmának flow citométeres hisztogramanalízisével..... | 39 |
| 2.7.1. Spermaminták | 39 |
| 2.7.2. Fluoreszcens DNS-jelölés..... | 39 |
| 2.7.3. Flow citometria | 40 |
| 2.7.4. Adatelemzés | 40 |
| 3. EREDMÉNYEK..... | 42 |
| 3.1. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán-stabilitásának értékelése Merocianin 540/Yo-PRO-1/Hoechst 33342 fluoreszcens festékkombinációval | 42 |
| 3.1.1. Életkor hatása a spermiummorfológiára, motilitásra, plazmamembrán-integritásra és -stabilitásra | 42 |
| 3.1.2. A swim-up kezelés hatása a spermiummorfológiára, motilitásra, membránintegritásra és- stabilitásra | 42 |
| 3.1.3. A plazmamembrán-destabilizáció és más spermiumparaméterek kapcsolata | 43 |
| 3.1.4. A laboratórium tesztek eredményei és az in vivo fertilitás kapcsolata | 43 |

| | |
|--|----|
| 3.2. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán- és akroszóma-integritásának változásai multikolor flow citometria alkalmazásával értékelve | 43 |
| 3.3. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok mitokondriális aktivitásának értékelése MitoTracker Deep Red 633 festés és flow citometria alkalmazásával | 45 |
| 3.3.1. Szenzorikus motilitás | 45 |
| 3.3.2. Számítógépes motilitásvizsgálat | 45 |
| 3.3.3. Spermiumkoncentráció | 45 |
| 3.3.4. Mitokondriumok állapotának értékelése | 45 |
| 3.3.5. A motilitási eredmények és a mitokondriális állapot (MMP) kapcsolata | 46 |
| 3.3.6. Kapcsolat a fertilitási eredményekkel | 46 |
| 3.4. Magas környezeti hőmérséklet hatása halspermiumok plazmamembrán-integritására és mitokondriális aktivitására | 46 |
| 3.5. Spermium-kromatinszerkezet és morfológia: kapcsolat a fertilitással | 47 |
| 3.6. Alternatív DNS-károsodási tesztek összehasonlítása: TUNEL és Nicoletti-teszt | 48 |
| 3.7. Tenyészbikák gyors citogenetikai szűrővizsgálata spermiumok DNS-tartalmának flow citométeres hisztogramanalízisével | 48 |
| 3.7.1. Első vizsgálat | 48 |
| 3.7.2. Második vizsgálat | 48 |
| 4. KÖVETKEZTETÉSEK | 49 |
| 4.1. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán-stabilitásának értékelése Merocianin 540/Yo-PRO 1/Hoechst 33342 fluoreszcens festékkombinációval | 49 |
| 4.2. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán- és akroszóma-integritásának változásai multikolor flow citometria alkalmazásával értékelve | 52 |
| 4.3. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok mitokondriális aktivitásának értékeléses MitoTracker Deep Red 633 festés és flow citometria alkalmazásával | 53 |
| 4.4. Magas környezeti hőmérséklet hatása halspermiumok plazmamembrán-integritására és mitokondriális aktivitására | 53 |
| 4.5. Spermium-kromatinszerkezet és morfológia: kapcsolat a fertilitással | 55 |
| 4.6. Alternatív DNS-károsodási tesztek összehasonlítása: TUNEL és Nicoletti-teszt | 58 |
| 4.7. Tenyészbikák gyors citogenetikai szűrővizsgálata spermiumok DNS-tartalmának flow citométeres hisztogramanalízisével | 59 |
| ÖSSZEFOGLALÁS | 60 |
| ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK | 61 |
| IRODALOM | 64 |
| KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS | 75 |
| A DOLGOZATBAN BEMUTATOTT PUBLIKÁCIÓK | 76 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|-----------|---|
| ASMA | Automatizált spermiummorphológiai analízis |
| ATP | Adenozin-trifoszfát |
| AUC | Görbe alatti terület |
| BrdUTP | Brómdezoxi-uridin trifoszfát |
| BSA | Bovin szérum albumin |
| CASA | Számítógépes spermiummotilitás-vizsgálat |
| CMTMROS | Klórmetil-tetrametil-rozamin |
| CR | Ellési százalék |
| DF | DNS-fragmentáció |
| DI | Elhalt, intakt akroszómájú spermium |
| DMSO | Dimetil-szulfoxid |
| DR | Elhalt, sérült akroszómájú spermium |
| DYR | Haldokló, sérült akroszómájú spermium |
| EDTA | Etilén-diamin-tetraacetsav |
| FCS | Standard flow citométeres fájlformátum |
| Fert-TALP | <i>In vitro</i> fertilizációs Tyrode albumin laktát piruvát tápfolyadék |
| FITC | Fluoreszcein izotio-cianát |
| FL | Fluoreszcens detektor |
| FSC | Egyenes irányú szórtfényintenzitás |
| H342 | Hoechst 33342 |
| HeCD | Hélium-kadmium lézer |
| HeNe | Hélium-neon lézer |
| HIGR | Magas intenzitású zöld fluoreszcenciát mutató spermiumok régiója |
| IVF | <i>In vitro</i> fertilizáció |
| JC-1 | 5,6-diklór-2-[3-(5,6-diklór-1,3-dietil-1,3-dihidro-2H-benzimidazol-2-ilidén)-1-propenil]-1,3-dietil-jodid |
| LI | Élő, ép akroszómájú spermiumok |
| LMD | List mode flow citométeres fájlformátum |
| LP | Long pass szűrő |

| | |
|--------|---|
| LR | Élő, sérült akroszómájú spermium |
| M-540 | Merocianin-540 |
| MMP | Mitokondrium membránpotenciál |
| MTG | Mitotracker Green |
| NRR | Non-return rate |
| PBS | Foszfát-pufferelt sóoldat |
| PE-PNA | Fikoeritrinnel konjugált földimogyoró agglutinin |
| PI | Propidium-jodid |
| PT | Mélyhűtés-felolvasztás után |
| R123 | Rodamin 123 |
| ROC | Receiver Operating Characteristic/vevő működési karakterisztika görbe |
| ROS | Reaktív oxigénszármazékok |
| SAS | Statistical Analysis Software |
| SCSA | Sperm Chromatin Structure Assay |
| SSC | Oldalirányú szórtfényintenzitás |
| SU | Swim-up |
| TdT | Terminális dezoxi-nukleotidil transzferáz |
| TRIS | Trisz-(hidroximetil)-amino-metán |
| TRITC | Tetrametil-rodamin izotiocianát |
| TUNEL | Terminális dezoxyi-nukleotidil transzferáz mediált nick end jelölés |
| VAP | Spermium sebessége az átlagolt útvonalra számítva |
| VCL | Spermium sebessége a ténylegesen megtett útvonalra számítva |
| VSL | Spermium sebessége a kezdő és végpont közötti egyenesre számítva |

BEVEZETÉS, CÉLKÖNYÍTÉSEK

A sikeres termékenyítés eléréséhez egyrészt az egyes spermiumoknak kell több szempontból is megfelelőnek lenniük (membránintegritás, akroszóma-állapot, mitokondriális aktivitás, kromatinintegritás stb.), másfelől az adott ejakulátumnak vagy mélyhűtött-felolvastott termékenyítő adagnak megfelelő arányban kell tartalmaznia ilyen ondósejteket. Az ideális *in vitro* fertilitási teszt egyidejűleg a lehető legtöbb tulajdonságot értékeli sejtszinten.

A spermiumok az alábbi doménekre oszthatók: fej, középrész és farok. Ezek további szubdoménekre bonthatók: a fejen a plazmamembrán szubdoménjei a gaméta-interakcióban játszanak szerepet (zóna-kötődés, akroszóma-reakció, zóna penetráció stb.). Az akroszóma a spermiumfej apikális részén található vezikulum, amely a zóna penetrációhoz szükséges enzimeket tartalmazza. A fej tartalmazza továbbá a spermium speciális, protamin-DNS komplexből álló kromatinját. A középrészben találhatók a mitokondriumok, amelyek az energiatermelésben játszanak szerepet. A farok szerepe a motilitás biztosítása. A spermiumok kromatin-állományának szerkezeti rendellenességei a termékenyítőképesség, illetve a hím pronukleusz-képződés zavarait okozhatják, továbbá káros hatással lehetnek az embrió fejlődésére is. Ezeket a rendellenességeket „nem kompenzálgató” tekintjük, mivel a szubfertilis hímek termékenyítőképessége nem javítható a termékenyítő adag sejtszámának növelésével. Azok az ondósejtek, amelyek nem kompenzálgató rendellenességekkel bírnak, képesek ugyan a petesejtbe hatolni és a termékenyítésre is, de az embriófejlődés szenvedhet zavart.

Vizsgálataim fő célja a mesterséges termékenyítésre használt sperma domén-specifikus minőségellenőrzésének automatizálása volt flow citometria – áramlási sejtanalízis – alkalmazásával. A flow citometria rövid idő alatt nagyszámú sejt ($> 10\,000$ sejt mintánként, másodpercenként akár 1000-2000 spermium) objektív értékelését teszi lehetővé. A spermiumok hordozófolyadékban áramolva lézersugáron haladnak keresztül. A spermiumok által visszavert fény a sejtek méretéről és belső összetettségéről ad információt, a lézer pedig a spermiumokhoz kötődő fluoreszcens festékeket is gerjeszti, lehetővé téve az egyes domének, sejszervek különböző színnel való jelölését, így a berendezések multiparaméteres analízisre is alkalmasak.

Vizsgálataim során a plazmamembrán-destabilizáció, a mitokondriális membránpotenciál, az akroszóma-integritás és a kromatinstruktúra (DNS-károsodások és kromatinkondenzációs zavarok) flow citométeres értékelését végeztem el.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán-stabilitásának értékelése Merocianin 540/Yo-PRO-1/Hoechst 33342 fluoreszcens festékkombinációval

A spermaminőség laboratóriumi értékelése során az olyan gyors és objektív eszközök, mint a számítógépes motilitásvizsgálat (CASA, Budworth és mtsai, 1988; Holt és mtsai, 1997) vagy a flow citometria egyre szélesebb körben terjednek el a gyakorlatban, felváltva a munkaigényes, lassú és szubjektív fénymikroszkópos motilitásbecslést. A flow citometria percenként akár több, mint ezer sejt értékelését teszi lehetővé, és sikerrel alkalmazták spermiumok strukturális és funkcionális értékelésére (Graham, 2001).

Köztudott, hogy a spermiumoknak aktiválódniuk kell a női nemi utakban annak érdekében, hogy a petesejthez kötődhessenek, ezen aktivációs élettani folyamatok gyűjtőneve a kapacitáció (Chang, 1951; Austin, 1952). A kapacitáció során a spermium plazmamembránja polarizálódik, foszfolipid-struktúrája átrendeződik (Gadella és Harrison, 2000). Mivel a kapacitáció folyamata során a plazmamembrán destabilizálódik, amennyiben ez a változás túl korán megy végbe, a spermium termékenyítőképessége elveszhet az akroszóma károsodása vagy végső esetben a sejt halála miatt (Januskauskas és mtsai, 2000; Cormier és mtsai, 1997). A spermiumok hűtve/mélyhűtve tárolása a plazmamembrán fiziológiai kapacitációjához hasonló változásokat eredményezhet (Cormier és mtsai, 1997). Vitatott, hogy e változások tényleges kapacitációs folyamatok, vagy attól független, hasonló membrándestabilizáció eredményei (Green és Watson, 2001). Újabb vizsgálatok arra utalnak, hogy a mélyhűtött-felolvasztott kanspermiumok plazmamembránjának foszfolipid-változásai (flip-flop mozgás) eltérnek a friss spermában található ondósejtek bikarbonáttal indukált kapacitájától (Guthrie és Welch, 2005).

Az adott spermamintában található élő, stabil plazmamembrán-szerkezetű spermiumok aránya kifejezetten értékes információt ad a minta minőségéről (Thundathil és mtsai, 1999), emellett érdekes lehet az is, hogy a membránstabilitást mélyhűtés-felolvasztás során megőrző ondósejtek képesek-e az olyan spermium-előszelekciós technikák, mint az úgynevezett swim-up során kapacitációra. A swim-up technika széles körben alkalmazott spermium előszelekciós eljárás *in vitro* fertilitációs (IVF) laboratóriumokban a fiziológiai spermiumtranszport során végbemenő szelekció imitációjára, motilis spermiumok arányának javítására. A kiválogatódó spermiumpopuláció olyan tulajdonságai, mint a lineáris motilitás vagy a procedúra során felúszó ondósejtek száma, korreláltak az *in vivo* fertilitási eredményekkel (Zhang és mtsai,

1998; Hallap és mtsai, 2005). Mivel az eljárás során alkalmazott IVF médium heparint is tartalmaz, amely köztudottan kapacitációt kiváltó hatású (Parrish és mtsai, 1988), a hipotézisünk az volt, hogy a swim-up procedúra után membrán-destabilizációt mutató (kapacitálódó) spermiumok aránya utalhat az azonos spermaminta *in vivo* fertilitására. A jelen vizsgálat célja egyrészt egy olyan fluoreszcens festékkombináció kidolgozása volt, amellyel értékelhető a mélyhűtött-felolvasztott bikasperma-minták membrán-destabilizációja, másrészt a swim-up technika valóban destabilizációt válthat ki a mélyhűtött-felolvasztott spermiumok plazmamembránjában. További cél volt annak megállapítása, hogy a bika életkora hatással van-e a felolvasztást követő membrán-destabilizációra és az instabil plazmamembránnal bíró, élő spermiumok aránya korrelál-e a mesterséges termékenyítést követő, *in vivo* fertilitási eredményekkel.

A plazmamembrán lipid kettősrétegének változásait nyomon követhetjük a Merocianin 540 fluoreszcens festék alkalmazásával (Gadella és Harrison, 2000; Harrison és mtsai, 1996). Ez a lipofil, hidrofób festék jelentős fluorescenciantenzitás-emelkedést mutat, ha a plazmamembrán szerkezete megváltozik. Ez a szerkezetváltozás a membrándestabilizáció jele, amely fisiológiai körülmények között a kapacitáció korai stádiumában következik be (Harrison és mtsai, 1996; Gadella és Harrison, 2002). A Merocianin 540 fluoreszcens spektrumának köszönhetően kombinálható a membrán-impermeábilis, DNS-specifikus Yo-PRO 1 festékkel, ami lehetővé teszi az élő és elhalt sejtek arányának egyidejű értékelését is. A nem spermium események megkülönböztetésére egyidejűleg más olyan, membrán-permeábilis, DNS-specifikus festékek is hozzáadhatók a kombinációhoz, mint a Hoechst 33342, így a spermiumok (Hoechst 33342 pozitív események) és nem spermium (Hoechst 33342 negatív) események megkülönböztethetők és az utóbbiak kizáráthatók az adatelemzésből.

1.2. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán- és akroszóma-integritásának változásai multikolor flow citometria alkalmazásával értékelve

Bár a spermamélyhűtés a szarvasmarha-tenyészés napi gyakorlatává vált, a mélyhűtései módszerek mind a mai napig empirikusak és a spermiumok jelentős hányada elpusztul a fagyaszta-felolvasztás során, ami csökkenti az adott termékenyítő anyag fertilitását, mivel a sikeres termékenyülés feltétele, hogy elegendő számú, teljesen termékenyítőképes spermium maradjon életben az ovuláció idejéig a női nemű utakban (Watson, 2000). Mindezeken túl, a mélyhűtést – felolvasztást túlélő spermiumok mind strukturális, mind funkcionális szempontból sérülnek, ami azt eredményezi, hogy túlélési rátájuk a frissen ejakulált ondósejteknek mintegy

fele (Watson, 2000; Holt, 2000a; Holt, 2000b; Medeiros és mtsai, 2002). Saacke és White (1972) friss és mélyhűtött-felolvasztott bikaondósejtek akroszómaváltozásait vizsgálta. Eredményeik azt mutatták, hogy a mélyhűtött-felolvasztott spermiumok esetében gyorsabb az akroszómadegradáció a friss ondósejtekhez képest, továbbá szignifikáns pozitív összefüggés áll fenn az ép akroszómájú spermiumok aránya és a termékenyítési eredmények között. Egy későbbi vizsgálatban den Daas (1997) nem talált ilyen pozitív összefüggést a fertilitás és a mélyhűtött-felolvasztott, inkubált bikaspermiumok akroszómaintegritása között, de eredményei arra utaltak, hogy azok a bikák produkáltak elfogadható üzemi fertilitási eredményeket még alacsony spermiumkoncentrációjú termékenyítő adagokkal is, amelyek testhőmérsékleten inkubált spermamintáiban nagyobb arányban és tovább maradtak életben a spermiumok. Az akroszómaintegritás és a fertilitás kapcsolatát vizsgáló további tanulmányok ellentmondó eredményeket közöltek (Whitfield és Parkinson, 1995; Januskauskas és mtsai, 2000).

A vonatkozó szakirodalom számos módszert ismertet az élő, ép akroszómájú spermiumok arányának megállapítására (Smith és Murray, 1997; Rodriguez-Martinez és mtsai, 1997). Kérdéses azonban az elhalt, sérült akroszómájú spermiumok értékelése. Eozin-anilinkék (Way és mtsai, 1995) illetve az ún. fix-vital festés (de Leeuw és mtsai, 1991) alkalmazásával értékelve a mélyhűtött-felolvasztott bikasperma elhalt, sérült akroszómájú spermiumpopulációja olyan sejteket tartalmaz, amelyek vagy spontán akroszóma-exocitózist követően elpusztultak, vagy akroszómájuk épségét a sejthalált követő degeneratív membránváltozások részeként veszítették el. Mivel azonban a sejtfestési eljárásokkal csak egy „pillanatképet” rögzíthetünk a preparátum elkészítésekor, a kétféle folyamat nem különíthető el, nem tudjuk eldöntenи, mi történt előbb, az akroszóma exocitózisa, vagy maga a sejthalál.

A tojássárgát tartalmazó spermahígítóban feldolgozott, mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán- és akroszómaintegritásának egyidejű értékelésére kidolgoztunk egy új fluoreszcens, flow citometrirel értékelhető festékkombinációt (Nagy és mtsai, 2003). Fikoeritinnel konjugált földimogyoró agglutinint, PE-PNA-t (amely a sérült/reaktált akroszómát jelöli) kombináltunk a spermatóliai vizsgálatokban széles körben alkalmazott Sperm Viability Kit-tel, amelyben SYBR 14 jelöli az élő, és propidium-jodid (PI) az elhalt sejteket. A SYBR 14 – PI (FL1 – FL3) ablakokon azt az alpopulációt, amelynek eseményei minden festék jelét mutatják, „haldokló” spermiumoknak szokás tekinteni. Korábbi vizsgálataink során feltűnt, hogy ezek az események jellemzően nem mutatnak PE-PNA jelet, ami arra utal, hogy a haldokló ondósejtek akroszómája még ép. Amennyiben ez valóban így van, akkor az akroszómasérülés csak a sejthalál után következik be a nekrotikus, degeneratív

membránváltozások részeként. A haldokló spermiumok akroszómaváltozásainak időbeni vizsgálata részletesebb bepillantást engedne a mélyhűtött-felolvasztott spermamintákban végbemenő membrándegeneráció folyamatába.

Annak bizonyítására, hogy a mélyhűtött-felolvasztott bikaspermamintákban detektálható akroszomasérülések a sejthalál után bekövetkező membránváltozások következtében alakulnak ki, a spermamintákat négy órán át inkubáltuk testhőmérsékleten, és SYBR 14/PE-PNA/PI fluroeszcens festékkombinációval, flow citometria alkalmazásával értékeltük 30-perces intervallumokban ismételt mérésekkel.

1.3. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok mitokondriális aktivitásának értékelése MitoTracker Deep Red 633 festés és flow citometria alkalmazásával

A termékenyülés komplex folyamata a spermiumok több sejtélettani funkciójának összehangolt működését követeli meg. Az egyik legfontosabb ilyen funkció a női nemi utakban való transzport, valamint a petesejt megközelítése és a zona pellucida-n való átjutás tekintetében az ondósejtek motilitása, ami a spermiumflagellum mozgásának eredménye. A mesterséges termékenyítő állomásokon leggyakrabban motilitásvizsgálatot végeznek a spermaminőség ellenőrzésére, az ondósejtek metabolikus aktivitásának és az élő sejtek arányának indirekt méréseként. A korábban csak szubjektíven végzett motilitásbecslés objektivitása jelentősen javult a számítógépes motilitásvizsgáló berendezések (CASA) bevezetésével, bár az egyes műszergyártók CASA-modelljei és az általuk értékelt paraméterek nem egységesek (Budworth és mtsai, 1988; Holt és mtsai, 1997). A napjainkra egyre inkább elérhetővé vált flow citometria jóval precízebb eszköze a spermaminőség – élő sejtek aránya, akroszómaintegritás, DNS-károsodások stb. értékelésének (Graham, 2001; Evenson és mtsai, 1982). Mivel a spermiumok flagelláris mozgása energiaigényes folyamat, az ATP-termelésért felelős, a spermium flagellumának középdarabjában található mitokondriumok állapotának értékelése a spermaminőség objektív mérési módszere lehet (Evenson és mtsai, 1982). A bikaspermium közel 100 mitokondriumot tartalmaz, amelyek specifikus fluoreszcens festékekkel megjelölhetők, vizsgálhatók. Az ilyen fluoreszcens festékeknek, mint a Rodamin 123 (R123), MitoTracker Green (MTG), JC-1, MitoTracker Orange (CMTMRos), MitoTracker Red (CMXRos), MitoTracker Red 580, MitoTracker Deep Red 633 stb., közös jellemzőjük az, hogy akkumulálódnak a mitokondriumokban, feltéve, hogy fennáll a mintegy 100-200mV belső negatív potenciál grádiens a mitokondriális membránban (mitokondriális membránpotenciál, MMP). Bár számos közlemény tartalmaz a fent említett festékekre vonatkozó módszertani

leírást, több fluoreszcens próba esetében is kérdéses az alkalmazhatóságuk. A R123 alacsony érzékenységű festék, és számos, energiaállapottól független kötőhelye van a mitokondriumokon (Troiano és mtsai, 1998). A MitoTracker Green gyakorlatilag minden mitokondriumot jelöl, függetlenül azok membránpotenciáljától, ezért inkább kontrasztfestékként alkalmazható a mitokondriumok sejten belüli lokalizációjának, méretének értékelésére (Gregory, 2002), de nem használható a mitokondriumok funkcionális állapotának vizsgálatára. A JC-1 előnye, hogy ugyanaz a festék eltérő színnel jelöli az aktív és inaktív mitokondriumokat, a mitokondriális membránpotenciál növekvésével a színe reverzibilisen zöldről narancssárgára változik. A festék nem működik megbízhatóan azonban mélyhútott-felolvasztott spermaminták esetében, valószínűleg a spermahígítóhoz való nem specifikus kötődése miatt (Garner és Thomas, 1999). Nem alkalmas továbbá multiparaméteres tesztekben való használatra, mivel egy festék – azaz egy spermiumtulajdonság - értékelése két detektort foglal le (Nagy és mtsai, 2003). A MitoTracker mitokondrium-specifikus festékcsalád (Molecular Probes) a korábban említett MitoTracker Green mellett egy sor, különböző emissziós spektrumú próbát tartalmaz, azonban a kötődési mechanizmusuk nem teljesen feltárt (Gregory, 2002). A MitoTracker Orange és Red festékek redukált változatai alkalmasak a membránpotenciál változásainak detektálására, a gerjesztési spektrumuk azonban nem teszi lehetővé az alapszintű, csak 488 nm-es lézerrel felszerelt flow citométerrel való alkalmazást. Egy korábbi tanulmányunkban (Nagy és mtsai, 2003) felvetettük a festékcsalád egy új tagjának, a MitoTracker Deep Red 633-nak az alkalmazhatóságát spermatológiai vizsgálatokhoz. A jelen vizsgálat célja ennek a festéknek a tesztelése volt bikaspermiumok flow citométeres értékelése során, közvetlenül mélyhútés-felolvasztást, illetve swim-up (SU) kezelést követően. Ez utóbbi kezelés az olyan asszisztált reprodukciós technikák eleme, mint az in vitro fertilizáció, ahol a SU segítségével a teljes spermiumtömegből kiszűrőnként az aktív motilitást mutató ondósejtek. Mivel a motilitás energiaigényes folyamat, a SU után kapott spermium populációnak elvileg magasabb mitokondriális aktivitást kell mutatnia. A flow citométeres mérési eredményeket szubjektív és számítógépes (CASA) motilitásvizsgálatokkal, valamint a laboratóriumi teszteredményeket az üzemi termékenyítési eredményekkel vetettük össze. Tekintve, hogy a motilitás az életkorral változik (Hallap és mtsai, 2004), a vizsgálatokat ugyanazon bikák 3, 5 és 7 éves korban gyűjtött spermamintáival is elvégeztük.

1.4. Magas környezeti hőmérséklet hatása halspermiumok plazmamembrán-integritására és mitokondriális aktivitására

A globális klímaváltozás következtében kialakuló lokális extrém klimatikus viszonyok több szinten is zavart okozhatnak a vad- és háziállatok élettani működésében, ide értve a szaporodásélettani folyamatokat is (Bradshaw és Holzapfel, 2006). Közismert például, hogy a túl magas és túl alacsony hőmérséklet a hímvarsejt-képződés zavarait okozhatja - több spermiumdefektus kiváltó okai között is szerepel az extrém hőmérséklet (Barth és Oko, 1989). A hőstressz sejtszintű elváltozások mellett a szervezet nemi hormon-háztartását is felboríthatja, és jelentős zavart okozhat termelés-élettani folyamatokban is (West, 2003).

A mérsékelt égövön számos állatfaj szigorú szezonális szaporodást mutat, ahol a szaporodási időszak közeledtét jelző prediktív faktor nem a hőmérséklet, hanem az évről évre biztosan ismétlődő naphossz-változás (Bronson, 1989), így fennáll az esélye annak, hogy a szaporodási időszakban nem optimális hőmérsékleti körülményekkel találkoznak az állatok (Bronson, 2009). Az ökológiai gazdálkodás tényerésével újra szerepet kapnak állattenyésztésünkben a régi, extenzív tartásra alkalmas állatfajták, melyek szintén több-kevesebb szezonálitást mutatnak. A szezonálitás emellett nem elhanyagolható az intenzív termelésű gazdasági állatfajok/fajták esetében sem.

Gazdasági állatfajaink közül a halak külső termékenyítőkként és szezonális szaporodásuknak köszönhetően különösen érzékenyek lehetnek az extrém környezeti viszonyokra. Szaporodási sikerüket és következésképp a halhús-termelés gazdaságosságát negatívan befolyásolhatja az ivarsejtek (spermiumokat, ikrát) érő szélsőséges hőmérséklet akár természetes környezetben, akár mesterséges szaporítás, ivarsejtgyűjtés és –feldolgozás során.

Vizsgálatunk során különböző (20, 25, 30 és 40 °C) hőmérsékleten 10 és 30 percig inkubált halspermiumok plazmamembrán-integritásának és mitokondriális membránpotenciál-változásainak flow citométeres értékelését végeztük el annak megállapítására, hogy a környezeti hőmérséklet emelkedése okozhat-e sejthalált és/vagy mitokondriális membrán-depolarizációt.

1.5. Spermium-kromatinszerkezet és morfológia: kapcsolat a fertilitással

A legtöbb mesterséges termékenyítő állomáson a frissen levett sperma rutin értékelése során csak a spermiumkoncentrációt és az ondósejtek motilitását értékelik (Garner, 1997; Rodriguez-Martinez és Larsson, 1998). A mélyhűtés-felolvasztás utáni minőség-ellenőrzés a legtöbb helyen szintén csupán motilitásvizsgálattal történik. Van, ahol a mikroszkópek használatát

felváltotta a flow citometria alkalmazása az intakt plazmamembránnal bíró spermiumok arányának megállapítására (Hossain és mtsai, 2011). A rutin andrológiai vizsgálatok során indokolt lenne a spermiummorphológia és az idegen sejtek jelenlétének értékelése is, azonban sajnálatos módon a gyakorlatban erre ritkán kerül sor. A spermiummorphológiai vizsgálatok fontosságát az indokolja, hogy segítségével képet kaphatunk a spermatogenezis folyamatának esetleges zavarairól, a járulékos nem mirigyek működésének rendellenességeiről éppúgy, mint a spermafeldolgozás és –tárolás hiányosságairól. Az ejakulátumban nagy számban jelen lévő rendellenes ondósejtek nem csak a herék, mellékherék vagy a járulékos nem mirigyek patológiás elváltozásaira utalhatnak (Veeramachaneni és Sawyer, 1996), hanem az adott spermaminta csökkent termékenyítőképességét is jelzik (Saacke, 2008). Mindezek ellenére morfológiai vizsgálatokat a mesterséges termékenyítő állomásokon csak ritkán, és általában akkor is szubjektív, nem reprodukálható módon végeznek. Az automatizált spermiummorphológiai eszközök (automatized sperm morphology analysis, ASMA) kifejlesztése (Gravance és mtsai, 1998) jelentősen csökkentette a vizsgálatok szubjektivitását, és lehetővé tette a spermiumfej méreteinek objektív mérését. Kifejezetten lényeges a bikaspermiumok morfometriája és a spermiumkromatin állapota (és közvetve a fertilitás) közötti kapcsolat (Sailer és mtsai, 1996). Az ASMA berendezések eredményei megbízható ismételhetőséget mutattak bika (Gravance és mtsai, 1999), kos (Rodriguez-Martinez, 2007), illetve kecskebak spermaminták vizsgálata során (Marco-Jimenez és mtsai, 2006). Többváltozós statisztikai adatelemzéssel kombinálva az ASMA alkalmassnak bizonyult az ejakulátumon belüli spermium-alpopulációk azonosítására (Pena és mtsai, 2005). Az ASMA mérések azonban csak a spermiumfej értékelésére korlátozódnak, így nem alkalmasak más jellegű spermiumdefektusok detektálására (Auger, 2010), és részben ezzel magyarázható, hogy nem mutatnak az eredmények szoros kapcsolatot a fertilitással (Saravia és mtsai, 2007; Gravance és mtsai, 1999).

Azon fajok esetében, ahol a hímeket intenzíven szelektálták a mesterséges termékenyítésben való használatra (tejelő szarvasmarha, sertés), a „normális” termékenyítő anyag nem tartalmaz 10%-nál nagyobb arányban spermiumfejet érintő rendellenességeket, és egyéb defektusok (akroszomasérülések, a középdarab vagy a flagellum rendellenességei, proximális citoplazmacseppek) aránya sem haladja meg összesen a 10 – 15%-ot (Rodriguez-Martinez, 2007). Más – domesztikált és vad – állatfajok esetében a „normalitás” küszöbértékei nagymértékben eltérnek, vagy nem is ismertek. Bizonyos rendellenességek, mint a disztalis citoplazmacseppek esetében elnözöbbek lehetünk, mivel nincs hatásuk a fertilitásra, de más abnormalitások, mint a diadém defektus (vakuólumok a sejtmagban), rendellenes akroszóma

(„knobbed” defektus), rövid, torzult flagellum („tail stump”), feltekeredett flagellum (Dag-defektus) esetében szigorúbban értékelünk, mivel ezek csökkentik a termékenyülés esélyét. A rendellenes fejű spermiumok képesek elérni a termékenyülés helyéig (Saacke és mtsai, 1998), és kapcsolatba hozhatók a csökkent termékenyítési eredményekkel, vagy rendellenes embriófejlődéssel (Thundathil és mtsai, 1998). Az olyan rendellenességek, mint a „knobbed” akroszómádefektus, meggyaljták a spermium és a zona pellucida kapcsolódását (Thundathil és mtsai, 2000), míg más rendellenességek, mint pl. körtefejű spermiumok esetében az ondósejtek zona pellucidán való átjutását zavarják meg, és termékenyülés esetén a zigóták osztódása szenvedhet zavart (Thundathil és mtsai, 1999). Másfelől megközelítve, a normális morfológiájú spermiumok aránya az ejakulátumban informatív a fertilitás szempontjából a mesterséges termékenyítésre használt tenyészbikák esetében (Phillips és mtsai, 2004; Al-Makhzoni és mtsai, 2008), mivel – a spermiumkoncentrációval és motilitással együtt – a spermatogenezis és spermiumérés zavartalanságát tükrözi.

A flow citometriával értékelhető Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) a spermiumkromatin *in situ* denaturációjának mértékét méri, amely kapcsolatba hozható a DNS-száltörések jelenlétével (Evenson, 1999). A kromatinkárosodások nem járnak együtt feltétlenül a spermiumfej morfológiai elváltozásaival, bár egyes esetekben, mint a körtefejű rendellenesség, kapcsolatba hozhatók (Sailer és mtsai, 1996). Annak ellenére, hogy a humán andrológiai vizsgálatokban egyre szélesebb körben alkalmazzák, a spermiumkromatin károsodásainak vizsgálata tenyészállatok esetében mindmáig marginálisnak tekinthető. A humán egészségügyi területtől eltekintve azonban a spermiumkromatin állapotának vizsgálata – például SCSA alkalmazásával (Evenson, 1999) – ritka. A fentiekben említett tesztek kombinációi ritkán, és szinte kizárolag kísérleti körülmények között kerülnek alkalmazásra a fertilitás előrejelzése érdekében. Egyes tesztek és a fertilitás között több publikáció is pozitív korrelációt közöl, de általában olyan esetekben, ahol az egyes tenyészállatok között jelentős különbség mutatkozott a termékenyítési eredményekben, és sok esetben az alkalmazott adatelemzés nem volt megfelelő (Amann, 2005). Az olyan változók kombinációja, mint a kromatinállapot és a spermiumfej morfológiai alakulása, ritka és jórészt olyan fajokon vizsgálták, ahol nagy egyedi variancia mutatkozik a spermatológiai paraméterek tekintetében (mint például tenyésmének esetében, Morrell és mtsai, 2008) ahol azonban a fertilitás mérése nem egyszerű. Bár bikák esetében is közöltek kapcsolatot az SCSA eredményei és a keskeny spermiumfej-alakulás között (Sailer és mtsai, 1996), a kapcsolat nem tekinthető egyértelműen bizonyítottnak (Rodriguez-Martinez és Barth, 2007).

A jelen vizsgálat célja a spermiummorphológiai vizsgálatok és az SCSA teszteredmények retrospektív összevetése különböző fertilitási paraméterekkel (non-return rate, korrigált non-return rate, ellési százalék) 22 szubfertilis és 21 normális fertilitású finn Ayrshire bika spermamintáinak értékelésével.

1.6. Alternatív DNS-károsodási tesztek összehasonlítása: TUNEL és Nicoletti-teszt

A termékenyítés sikere a spermiumok számos tulajdonságától függ, többek között az ondósejt DNS-tartalmának integritásától (Acharyya és mtsai, 2005). A fragmentálódott DNS-t tartalmazó spermiumok motilisak, képesek a petesejt megközelítésére és a megtermékenyítésre is, de megnő az esélye annak, hogy az embrionális fejlődés korai stádiumban megszakad (Ahmadi és Ng, 1999; Evenson, 1999; Fatehi és mtsai, 2006).

A DNS-károsodások, fragmentáció detektálására a standard eljárásnak is tekintett Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA; Evenson és mtsai, 1980) a legszélesebb körben alkalmazott módszer. A teszt lényege, hogy a DNS-specifikus akridin-naracs festék az ép, kétszálú DNS-hez kötődve zöld, a fragmentált, egyszálú DNS-szakaszokhoz kötődve vörös fluoreszcenciát mutat; a zöld és vörös fluorescencia-intenzitás aránya flow citometria alkalmazásával detektálva a kromatinállomány állapotáról, fragmentáltságáról ad információt (Evenson, 2013). A közelmúltban végzett tanulmányunk (Nagy és mtsai, 2013) eredményei azonban azt mutatták, hogy az SCSA teszt nem elég érzékeny a szubfertilis és fertilis tenyészbikák megkülönböztetésére. Mindemellett több flow citométer gyártója sem javasolja az akridin-narancs festék rendszeres használatát, mivel a festék a citométer belső csöveibe tapadhat, megzavarva a más festékekkel végzett méréseket (Beckman Coulter szervizszolgálat, személyes közlés), ráadásul a teszt biológiai alapelve is megkérőjelezhető (van der Schans és mtsai, 2000).

Az úgynevezett TUNEL (Terminál-dezoxi-nucleotidil-transzferáz-mediált dUTP nick end-jelölés) teszt lényege, hogy a TdT (terminál-dezoxi-nukleotidil-transferáz) enzim a DNS szabad 3'-hidroxil végéhez kötődik. Alapesetben az ép DNS-molekula két 3'-hidroxil véget tartalmaz, de a száltörések esetén több TdT-kötőhely alakul ki. Miután a TdT a szabad kötőhelyekhez kapcsolódott, BrdUTP-t (5-bróm-2'-dezoxiuridin-5'-trifoszfát) adunk a mintához, amely megjelöli a fragmentumok végeit. Végül fluoreszcens festékkel konjugált anti-BrdUTP antitest alkalmazásával, fluoreszcens mikroszkóp vagy flow citometter segítségével detektáljuk a száltöréseket. A TUNEL-teszt népszerű, széles körben alkalmazott eljárás az apoptotikus sejtek illetve a DNS-fragmentáció detektálására több szövet-, illetve sejttípus esetén is (Oberhaus,

2003). A népszerűség egyik fő oka az, hogy a metodika egyszerű és flow citometria alkalmazásával automatizálható, másfelől azonban egyes szerzők szerint nem kellően érzékeny, és fajlagossága is limitált (Evenson and Wixon, 2006).

Nicoletti és munkatársai (1991) egy egyszerű, flow citometriával értékelhető alternatívát dolgoztak ki. A teszt propidium-jodid festést alkalmaz a DNS-fragmentáció és apoptózis detektálására. A festék sztöchiometrikusan kötődik a DNS-hez, így a mért fluoreszcencia-intenzitás segítségével megállapítható a sejt DNS-tartalma, illetve a DNS-fragmentáció mértéke. Az ép DNS a mintapreparálás során a sejtben marad, és a fluoreszcencia-intenzitási hisztogramon egy jól definiált csúcs jelenik meg. A fragmentálódott DNS-darabkák azonban kijutnak a sejtből, amelynek így kevesebb DNS-tartalma lesz, ami az intenzitási hisztogramon alacsonyabb, szubdiploid (a spermiumok esetében szubhaploid) csúcsként jelenik meg. A tesztet több sejttípus értékelésére alkalmazták (Riccardi és Nicoletti, 2006), többek között humán spermiumok DNS-fragmentáltságának (Winkle és mtsai, 2009) és kromatinkondenzációjának (Vicari és mtsai, 2002) vizsgálatára is.

1.7. Tenyészbikák gyors citogenetikai szűrővizsgálata spermiumok DNS-tartalmának flow citométeres hisztogramanalízisével

Amann és Hammerstedt (1993) megállapítása szerint a termékenyítő spermiumnak egy sor tulajdonság tekintetében megfelelőnek kell lennie ahhoz, hogy teljesítse feladatát: ilyenek az elfogadható morfológia, megfelelő sejtanyagcsere az energiatermelés érdekében, progresszív motilitás, a hiperaktív motilitás aktiválásának képessége, továbbá a spermium genetikai csomagjának tartalmaznia kell a fejlődéshez szükséges géneket és mentesnek kell lennie letális mutációktól, extra genetikai anyagtól, amelyek a fejlődést gátolnák. Logikus feltételezni, hogy minél nagyobb a termékenyítő adagban az ép morfológiájú, élő, motilis, intakt kromatin hordozó ondósejtek aránya, annál nagyobb a termékenyülés esélye (Morrell és Rodriguez-Martinez, 2009). Bár a motilitást és az élő sejtek arányát (valamint kevésbé gyakran a morfológiát is) rutinszerűen értékelik a mesterséges termékenyítő állomásokon a sperma minőségellenőrzése során, a genetikai anyag állapotát gyakorlatilag egyáltalán nem vizsgálják. Az apai genom állapotát több szinten értékelhetjük: a genomszelekció növekvő szerepe (Amann és DeJarnette, 2012) mellett a kromatinszerkezet épségét és a haploid kromoszómagarnitúra állapotát is vizsgálhatjuk.

A spermiumkromatin szerveződése egyedi, a spermiumok képződése során a DNS-hez kapcsolódó hisztonfehérjék helyett protaminok épülnek be, különlegesen kompakt, kondenzált

kromatinstruktúrát eredményezve (Dadoune, 1995; Sakkas és mtsai, 1999). A megfelelő kondenzáció stabilizálja a DNS-t, amely így kevésbé érzékeny az oxidatív károsodásokra, az érett spermiumok azonban nem képesek az esetleges DNS-károsodások javítására. A spermiumkromatin rendellenességei a termékenyülés, pronukleusz formálódás, korai embriófejlődés zavarait okozhatják. Az ilyen rendellenességeket „nem kompenzálgató” tekintjük, mivel a szubfertilis hímek termékenyítőképessége nem javítható a termékenyítő adag sejtkoncentrációjának növelésével. A nem kompenzálgató defektust hordozó spermiumok képesek a petesejt megtermékenyítésére, de az embriófejlődés zavart szenved (Evenson, 1999). A spermiumok kromoszómagarnitúrájának rendellenességeit két szinten vizsgálhatjuk: strukturális (transzlokációk, deléciók, duplikációk stb.) és számbeli (a normális, haploid kromoszómaszám változásai) eltérések.

Az elmúlt évtizedekben a tenyészállatok citogenetikai vizsgálata egyre jelentősebbé vált (Ducos és mtsai, 2008). A tenyészbikák és –kanok citogenetikai állapotának közvetlen gazdasági jelentősége van (Larsen és mtsai, 2004). Az abnormális kariotípusok detektálásának klasszikus módszere a limfociták mikroszkópos vizsgálata (Matsson és mtsai, 1986). A mikroszkópos kromoszómaszámlálás azonban meglehetősen időigényes, továbbá speciális tapasztalatot igényel. A flow citometria precízebb és gyorsabb alternatívát kínál, és sikkerrel alkalmazták több emlősfaj, így juh, szarvasmarha és sertés (Dixon és mtsai, 1992), kutya (Langford és mtsai, 1996), valamint ember (van den Engh és mtsai, 1985) kariotipizálására. A flow citométeres kariotipizálás azonban nem vált a háziállatok rutin citogenetikai vizsgálatának eszközévé, mivel a technika meglehetősen bonyolult és eszközökigényes, továbbá a kariogramok felbontása nem tökéletes, azaz a kisebb kromoszómák nem különíthetők el egymástól, illetve az egyes kromoszómák esetleges polimorfizmusai miatt az egészséges egyedek esetében is eltérő kariogramot kaphatunk. A módszer érzékenysége a tradicionális fénymikroszkópos kromoszómasávozás és a DNS-tartalom flow citométeres meghatározása közé tehető (Givan, 2001).

A flow citometria alkalmazható a spermiumok DNS-tartalmának mennyiségi vizsgálatára is (Lewanski és mtsai, 1991), ez a megközelítés számos előnyt nyújt a tradicionális citogenetikai vizsgálatokhoz képest: nincs szükség vérvételre, a kérdéses állatok tesztelése gyakorlatilag téren és időben függetlenné válik. Flow citométeres spermavizsgálattal már sikerült transzlokációjához tenyészállatokat azonosítani (Lewanski és mtsai, 1991, 1993). A spermiumok citométeres kvantitatív DNS-vizsgálata vezetett az X- és Y-kromoszómát hordozó ondósejtek sikeres szeparálásához (Gledhill és mtsai, 1976; Meistrich és mtsai, 1978). Az emlősspermiumok különleges, lapátszerű fejalakulása azonban komoly technikai kihívást

jelentett, és speciális hidrodinamikus orientációra van szükség annak érdekében, hogy minden spermium azonos orientációval haladjon keresztül a detektálási ponton (Garner, 2001). Korábbi vizsgálatainkban sikkerrel alkalmaztuk a flow citometriát rendellenes kromoszómagarnitúrával rendelkező, illetve abnormális kromatinkondenzációjú ondósejtek detektálására (Revay és mtsai, 2009, 2010).

Larsen és mtsai (2004) egy olyan egyszerű teszt kidolgozását tűzte ki céljául, amely a drága és bonyolult spermiumorientációs fejjel kiegészített flow citométer nélkül, olcsóbb asztali citométerrel is alkalmas a citogenetikai rendellenességet hordozó tenyészállatok azonosítására a spermiumok DNS-tartalma alapján. Egy sor enzimatikus és kémiai kezelést alkalmaztak a spermiumfejek dekondenzációjához, amelyek így duzzadt, kerekded formát vettek fel, és így nem volt szükség a spermiumfejek orientációjára. Kidolgozták a spermium-DNS hisztogramok értékelésénél használható küszöbértékeket és követelményeket: a hisztogramok két csúcsot kell, hogy mutassanak (az X- és Y-kromoszómát hordozó ondósejtek eltérő DNS-tartalmának megfelelően) és a hisztogram CV-értékek küszöbértéke 1,3%. Megállapították azonban, hogy az általuk kidolgozott protokoll nem alkalmas rutinszerű tesztként való alkalmazásra. Több olyan kritikus pontot is megneveztek, amelyek változtatásával a teszt javítható lenne, de ezeket a változtatásokat nem hajtották végre.

Ma már olyan olcsó, egyszerű asztali flow citométerek is elérhetők, amelyek akár a mesterséges termékenyítő állomások rutin spermabírálati munkarendjébe is illeszthetők, a napi spermaminőség-ellenőrzés hatékonyságának javítására (Hossain és mtsai, 2011). Ezek a műszerek azonban általában 488 nm-es lézerrel kerülnek forgalomba, amely nem alkalmas az olyan fluoreszcens festékek gerjesztésére, amelyeket a DNS-mennyiségi vizsgálatok, illetve a spermaszexálás során használnak (Hoechst-festékek, DAPI).

A jelen vizsgálat célja egy olyan fluoreszcens festék tesztelése volt a citogenetikai terheltséget hordozó tenyészbikák spermamintáinak azonosítására, amely gerjeszthető 488 nm-es lézerrel, így adaptálható lenne rutinszerű szűrővizsgálatokra. A vizsgálatsorozat első lépéseként citogenetikailag egészséges tenyészbikák DNS-hisztogram paramétereit állapítottuk meg intraspecifikus genomméretük eltéréseit értékelve három egyed mintából három ismétlésben Dolezel és Bartos (2005) javaslata szerint, majd az így megállapított alapértékekhez viszonyítottuk ismert citogenetikai rendellenességet hordozó bikák hisztogramparamétereit.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán-stabilitásának értékelése Merocianin 540/Yo-PRO-1/Hoechst 33342 fluoreszcens festékkombinációval

2.1.1. Reagensek, médium összetevők

A vizsgálatban felhasznált reagensek és médium összetevők a következő gyártóktól származtak: Sigma, St. Louis, MO, USA; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA. A spermiumok előszelekciójához használt médium Tyrode oldat (Fert-TALP) volt (Parrish és mtsai, 1988).

2.1.2. Vizsgált állatok, spermaminták

A vizsgálatban hat észt holstein-fríz tenyészbika spermamintáit értékeltük. Az állatok az Észt Állattenyésztő Szövetség mesterséges termékenyítő állomásán termeltek (Kehta, Észtország). A spermavétel és -feldolgozás, mélyhűtés a mesterséges termékenyítő állomás rutin munkarendje szerint történt. A fiatal bikák ivadékvizsgálati programba való bevonásának feltétele, hogy az adott egyed ejakulátumában az összes sejtszám $>4 \times 10^9$ legyen, a friss sperma motilitása elérje a 60%-ot, és a normális morfológiájú spermiumok aránya meghaladja a 85%-ot (Söderquist és mtsai, 1991). A bikák életkora a jelen vizsgálat keretében végrehajtott első spermavételkor 32-44 hónap volt („3 éves”), ugyanezen egyedektől 63-66 („5 éves”) és 78-90 hónapos („7 éves”) korban is mintavétel történt. A bikáktól a jelen vizsgálattól függetlenül, rendszeresen vettek és dolgoztak fel spermamintákat rutin mesterséges termékenyítési céllal.

A spermavétel heti egyszeri alkalommal történt, műhűvelly alkalmazásával. Két egymást követő ejakulátum került összekeverésre és a hígításhoz kereskedelmi forgalomban elérhető spermahígítót alkalmaztak (Triladyl®, Minitüb, Németország). A termékenyítő adagokat műszalmákba töltötték $\sim 30 \times 10^6 /0,25$ ml spermiumkoncentrációval. A mélyhűtés programozható mélyhűtő berendezéssel történt. A fagyaszott műszalmákat a laboratóriumi tesztek elvégzéséig folyékony nitrogénben tárolták. A felolvasztást követő rutin minőség-ellenőrzés során a forgalomba hozatal feltétele a minimum 50% motilitás volt.

Mesterséges termékenyítésre a mélyhűtést követő egy éven belül sor került. A vizsgálatban a termékenyítési eredmények csak a 3 éves korban gyűjtött spermaminták esetében kerültek felhasználásra. A termékenyítési eredmények 60 napos Non-return index (60D NRR) formájában kerültek rögzítésre, spermamintánként 45 – 150 termékenyítés eredményeire építve.

2.1.3. A spermaminták előkészítése laboratóriumi vizsgálatokhoz

A spermaminták értékelése két időpontban történt: közvetlenül felolvasztást követően (post-thaw, PT), illetve felolvasztást, majd swim-up kezelést követően (SU). Spermamintánként két-két műszalmát olvasztottunk fel +35 °C-os vízfürdőben, 12 másodpercig, majd a műszalmák tartalmát összekevertük. A SU-kezeléshez 200 µl spermát rétegeztünk 400 µl Fert-TALP fertilizációs médium alá (13), amely 6 mg/ml zsírsavmentes BSA-t, 0,25 µM nátrium-piruvátot, 5 µg/ml heparint, 20 µM D-penicillamint, 10 µM hipotaurint és 1 µM epinefrint tartalmazott. Hatvan perc (39 °C, 5% CO₂) inkubációt követően a médium felső 300 µl-es rétegét begyűjtöttük a további spermavizsgálatokhoz.

2.1.4. Motilitás- és koncentrációvizsgálatok

Öt µl spermamintát helyeztünk Makler sejtszámláló kamrába (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel), és számítógépes motilitásvizsgáló berendezéssel (CASA, SM-CMA, MTM Medical Technologies, Montreaux, Switzerland) értékeltük. Mintánként legalább 100 – 100 spermium motilitási adatai kerültek rögzítésre +38 °C-os hőmérsékleten. Az összes motilis sejt aránya, a lineárisan, nem lineárisan és körkörösen mozgó ondósejtek aránya mellett a műszer a következő kinetikai paramétereket is rögzítette: straight linear velocity (VSL), average path velocity (VAP) és curvilinear velocity (VCL). A lineáris motilitást mutató spermiumok aránya manuális számítással került meghatározásra, a látómezőkben jelen lévő sejtek számát alapul véve.

A spermiumok motilitása szubjektíven is meghatározásra került, ugyanazon mintából, fáziskontraszt mikroszkóp alkalmazásával, 400-szoros nagyítással, +38 °C-os melegítő tárgyasztalon. Négy-négy látómező átlaga került rögzítésre.

A spermiumkoncentráció (10^6 /ml) megállapítása Bürker-hemocitométer használatával történt Bane (1952) szerint. Az összes analízist ugyanaz a szakember végezte el.

2.1.5. Plazmamembrán-integritás

Az élő és elhalt spermiumok arányát SYBR-14 és propidium-jodid (PI) fluoreszcens festékkombinációval (Sperm Viability Kit L-7011, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) értékeltük Januskauskas és mtsai (1999) leírása szerint. Száz-száz µl spermaminta került továbbhígításra 400 µl TRIS-citrát spermahígítóban, majd a sejtszuszpenzióhoz 2,7 µl PI és 10 µl SYBR-14 festékoldatot adtunk, így a minták végső festékkoncentrációja 24 µM és 100 nM volt. Tizenöt-húsz percig, 37 °C-on, sötétben inkubáltuk a mintákat, majd 2x100 spermiumot értékeltünk epifluoreszcens mikroszkóppal (Laborlux-11, Leitz, Jena, Germany), 600-szoros nagyítással. Az intakt, ép plazmamembránnal bíró, élőnek tekinthető ondósejtek sejtmagja zöld

SYBR-14 jelet mutat, az elhalt ondósejtek sejtmagja vörösre festődik a PI-dal. A vizsgálat során a zöld ondósejtek arányát rögzítettük.

2.1.6. Spermiummorphológia

A morfológiai vizsgálatokat vagy formalinnal fixált (Bane, 1952) folyékony mintákon végeztük, vagy légszáraz keneteken, karbol-fuchsin festést alkalmazva (Williams, 1920). A folyékony minták értékelése során fázis-kontraszt mikroszkóppal, 1000x nagyítás mellett 200-200 spermiumot értékeltünk, rögzítve a rendellenes akroszómák, középdarabok, illetve a feltekeredett flagellumok arányát. A spermiumfej rendellenességeit a festett, légszáraz keneteken értékeltük fénymikroszkóppal, 1000x nagyítás mellett. Mintánként 200-200 spermiumot osztályoztunk, rögzítve a körtefejű, keskeny, rendellenes alakú, -méretű, flagellum nélküli és fejletlen sejtek arányát.

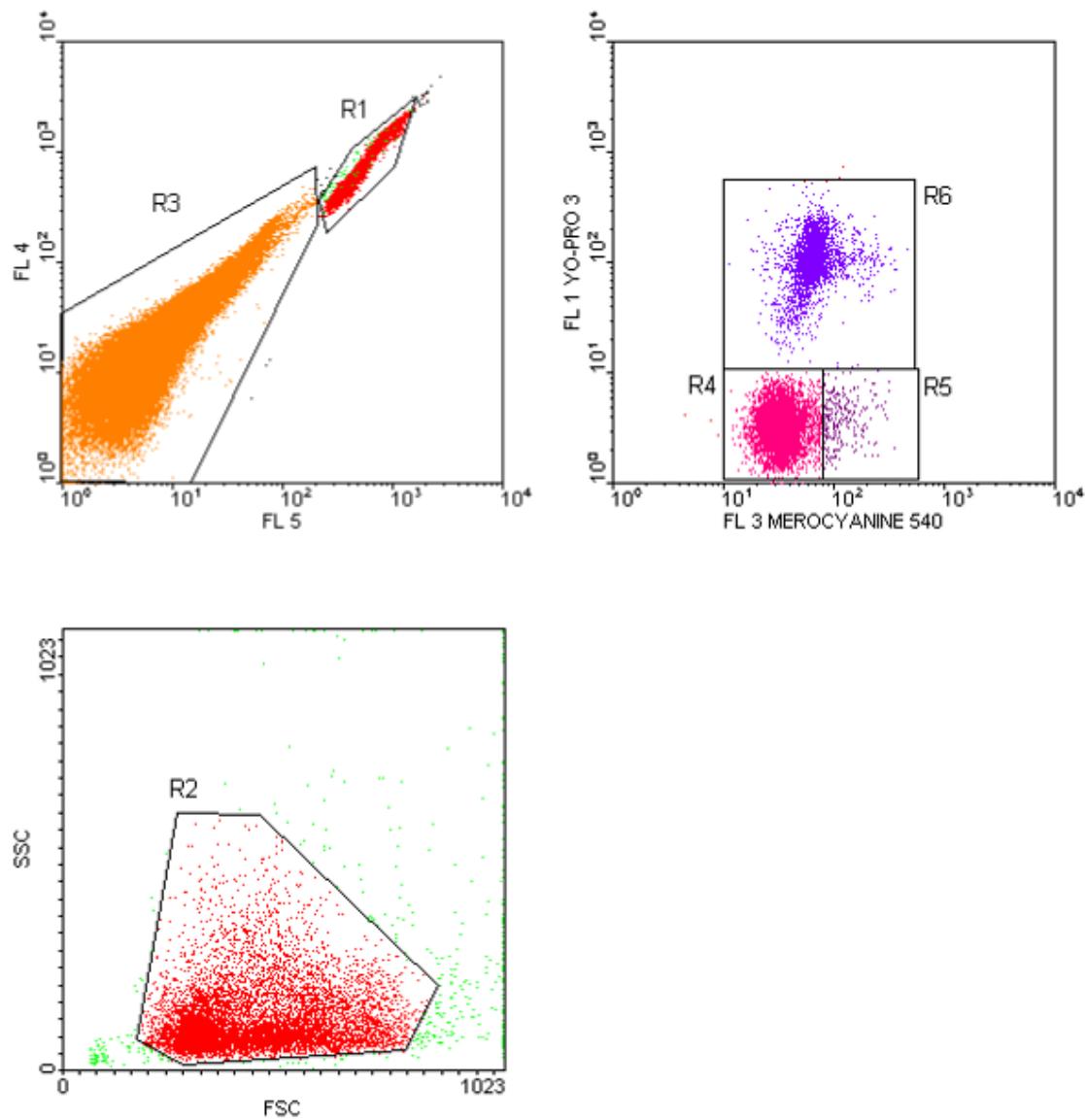
2.1.7. Merocianin 540/Yo-PRO 1/Hoechst 33342 festékkombináció

A membránstabilitás értékeléshez a következő fluoreszcens munkaoldatokat készítettük: Merocianin 540 (M-540, Molecular Probes, M 24571): 1 mM DMSO-ban; Yo-PRO 1 (Molecular Probes, Y 3603): 25 µM DMSO-ban; Hoechst 33342 (H342): 5 mg/ml desztillált vízben. A spermamintákat felolvasztást követően, illetve swim-up után kb. 1×10^6 /ml koncentrációra állítottuk be foszfát-pufferelt sóoldatban (CellWash optimalizált PBS, 34529, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 5 ml-es Falcon csövekben. A sejtszuszpenzióhoz 1 µl Yo-PRO 1, 2,6 µl M-540 and 2 µl H342 munkaoldatokat adtunk. A fluoreszcens festékekkel jelölt mintákat 10 percig inkubáltuk sötétkékben, 38 °C-on.

2.1.8. Flow citometria

A flow citométeres mérésekhez BD LSR flow citométert (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) alkalmaztunk. A M-540 és a Yo-PRO 1 festékeket 20 mW-os Argon ion 488 nm-es lézerrel, a H342 festéket 8 mW-os HeCD (hélium-kadmium) UV 325 nm-es lézerrel gerjesztettük. A Yo-PRO 1 fluoreszcens jelét az FL 1 (530/28 nm), a M-540 fluoreszcens jelét az FL 3 (670 LP), a H342 fluoreszcenciát az FL 4 (510/20 DF) és FL 5 (380 LP) detektorokkal rögzítettük. Az előremutató és oldalirányú szórtfényintenzitást lineáris, a fluoreszcens jeleket logaritmikus skálán rögzítettük. A spektrális kompenzációt Roederer (2000) szerint hajtottuk végre. Az adatrögzítést CellQuest 3.3 szoftverrel (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) végeztük. A spermiumok és egyéb események jeleinek szeparálására a H342 fluoreszcenciát (DNS-tartalom) alkalmaztuk. A flow citométert alacsony áramlási sebességgel futtattuk (6-24

$\mu\text{l}/\text{min}$), az adatgyűjtést 10 000 H342-pozitív esemény után állítottuk meg. Az adatokat standard fcs-fájlformátumban tároltuk. AZ FL1/FL3 (Yo-PRO 1/M-540) ablakokban a következő régiókat határoztuk meg: élő spermium, stabil plazmamembrán (Yo-PRO 1 negatív és M-540 negatív), élő, destabilizálódott membrán (Yo-PRO 1 negatív és M-540 pozitív), valamint elhalt (Yo-PRO 1 pozitív) események (1. ábra).



1. ábra. Merocianin 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 dot-plot citogram. Hoechst 33342 pozitív események (DNS-tartalmú sejtek, spermiumok) az R1 régióban azonosíthatók, az R3 régióban egyéb események (lipidszemcsék a spermahígítóból, sejttörmelék, citoplazmacseppek stb.) találhatók. Az R4 régióban az intakt, stabil plazmamembránnal bíró ondósejtek, az R5 régióban az intakt, destabilizálódott sejtek, az R6 régióban az elpusztult spermiumok találhatók. Az R2

régióban a DNS-tartalom alapján azonosított spermiumok szórtfény intenzitási képe látható (R1 régióból visszakapuzott fluoreszcens jel).

2.1.9. Adatelemzés

A leíró statisztika Microsoft® Excel 2000 alkalmazásával készült. Az eredmények statisztikai értékeléséhez Statistical Analysis Systems (SAS) szoftvercsomagot használtunk (SAS Institute, 1990) összesen 37 észlelésen (6 bika, 2-4 spermaminta/bika, 3 korcsoport). A bikakorcsoportok összehasonlítására, illetve a kezelések hatásának értékelésére a MIXED eljárást, az egyes bikák közötti egyedi eltérések értékelésére a GLM eljárást alkalmaztuk, a statisztikai modellben az egyed véletlen hatásnév szerepelt. Az egyes spermaminőségi paraméterek közötti kapcsolatot Pearson korrelációs koefficiens alkalmazásával vizsgáltuk.

2.2. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán- és akroszóma-integritá- sának változásai multikolor flow citometria alkalmazásával értékelve

2.2.1. Reagensek

A reagenseket az alábbi forrásokból szereztük be: Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA, LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, L-7011, SYBR-14 és PI), Bi meda Corp. (Foster City, CA, USA, fikoeritrinnel konjugált földimogyoró agglutinin, Phycprobe RPE-PNA, P44), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA, Dimetil-szulfoxid, DMSO, D-5879), Becton Dickinson (San Jose, CA, USA, CellWash optimalizált PBS, cat. no. 349524).

2.2.2. Spermaminták

A vizsgálatban hét svéd vöröstarka tenyészbika mélyhűtött-felolvasztott spermamintáját értékeltük. Az állatoktól két-két, egymást követő ejakulátumot keverték össze és dolgoztak fel kereskedelmi forgalomban elérhető spermahígítóban (Triladyl®, Minitüb, Németország). A termékenyítő adagokat 0,25 ml-es műszalmákba töltötték 15×10^6 spermium/adag koncentrációban. A műszalmákat programozható biológiai mélyhűtőberendezéssel fagyaszották, és a laboratóriumi vizsgálatokig folyékony nitrogénben tárolták őket. A műszalmák felolvasztása 35 °C –os vízfürdőben történt, 12 másodpercig. Spermamintánként három-három műszalma tartalmát kevertük össze és inkubáltuk sötétkékben, 37 °C hőmérsékleten. Harminc perces időközönként almintát vettünk a flow citometeres mérésekhez. A vizsgálatot három ismétlésben, különböző napokon végeztük el.

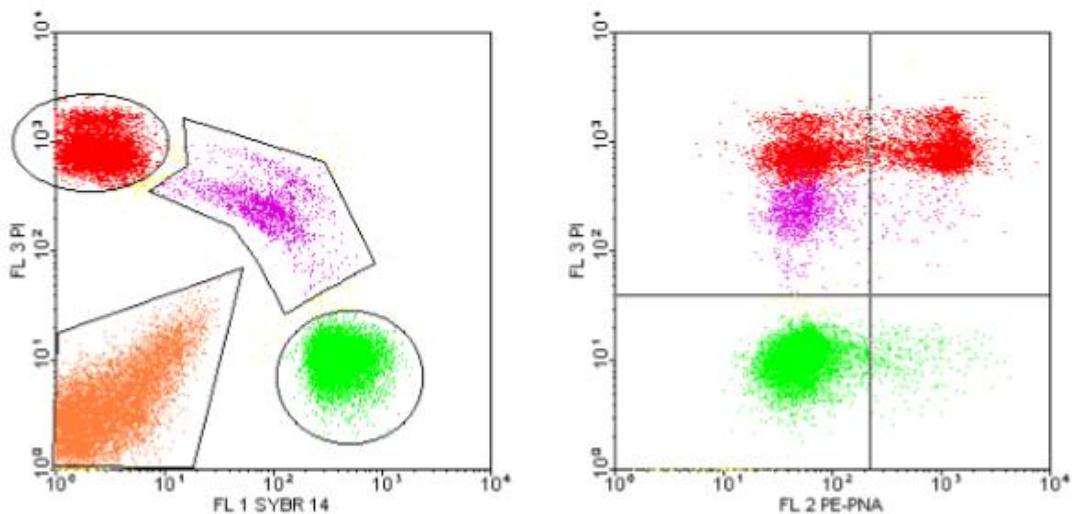
2.2.3. Hármas fluoreszcens festékkombináció

A fluoreszcens festés korábbi munkánk (Nagy és mtsai, 2003) alapján történt: 100 nM SYBR 14 munkaoldatot (Component A, LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, 10x hígítva DMSO-val), 2,5 µg/ml PE-PNA oldatot (1 mg /ml törzsoldat a következő összetételű pufferben: 3,0 M ammónium-szulfát, 50 mM nátrium-foszfát, 0,05% nátrium-azid, pH 7,0, továbbá 1 mM Ca²⁺ és Mn²⁺ ion), valamint 12 µM PI törzsoldatot (Component B, LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, hígítatlanul) adtunk 1 ml CellWASH pufferhez. Öt ml térfogatú Falcon csövekbe adagoltunk 450-450 µl, fluoreszcens festékeket tartalmazó puffert, és a csöveket 37 °C-on sötétkékben inkubáltuk a mintaelőkészítésig. A felolvastott és inkubált spermamintákból felkeverést követően 50-50 µl-t adtunk a pufferhez, és a fluoreszcens festékek kötődésének kialakulásához a mintákat tovább inkubáltuk 10 percig sötétkékben, majd a flow citometeres értékelés előtt közvetlenül újra homogenizáltuk.

2.2.4. Flow citometria

A méréseket Becton Dickinson LSR flow citométerrel (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) végeztük. A fluoreszcens festékeket 488 nm-es Argon ion lézerrel gerjesztettük. A SYBR 14 fluoreszcenciát (zöld jel, spermiumok intakt plazma membránnal, élő sejtek) az FL 1 detektoron (530/28 nm), a PI fluoreszcenciát (vörös jel, spermiumok sérült plazma membránnal, elhalt sejtek) az FL 3 detektoron (670 LP), a PE-PNA fluoreszcenciát (spermiumok sérült akroszómával) az FL 2 detektoron (575/25 nm) rögzítettük. Az előre mutató (FSC) és oldalirányú (SSC) szórásintenzitást lineáris skálán, a fluoreszcens jeleket logaritmikus skálán rögzítettük. A fluoreszcens kompenzáció értékeit Roederer (2000) szerint állítottuk be. Az adatrögzítéshez CellQuest 3.1 szoftvert (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) alkalmaztunk. A logikai kapukat korábbi publikációnk (Nagy és mtsai, 2003) alapján állítottuk be. A nem spermium események többségét a szórásintenzitási eloszlások alapján zártuk ki az analízisből, a spermiumokhoz hasonló szórásintenzitási értékeket mutató, de DNS-t nem tartalmazó eseményeket a SYBR 14 vagy PI fluorescencia-intenzitás alapján különböztettük meg az ondósejtektől. Azok a spermiumok, amelyek egyidejűleg intenzív SYBR 14 és PI jelet is mutattak, „haldokló” sejtekként lettek azonosítva (Garner és mtsai, 1994; 2. ábra).

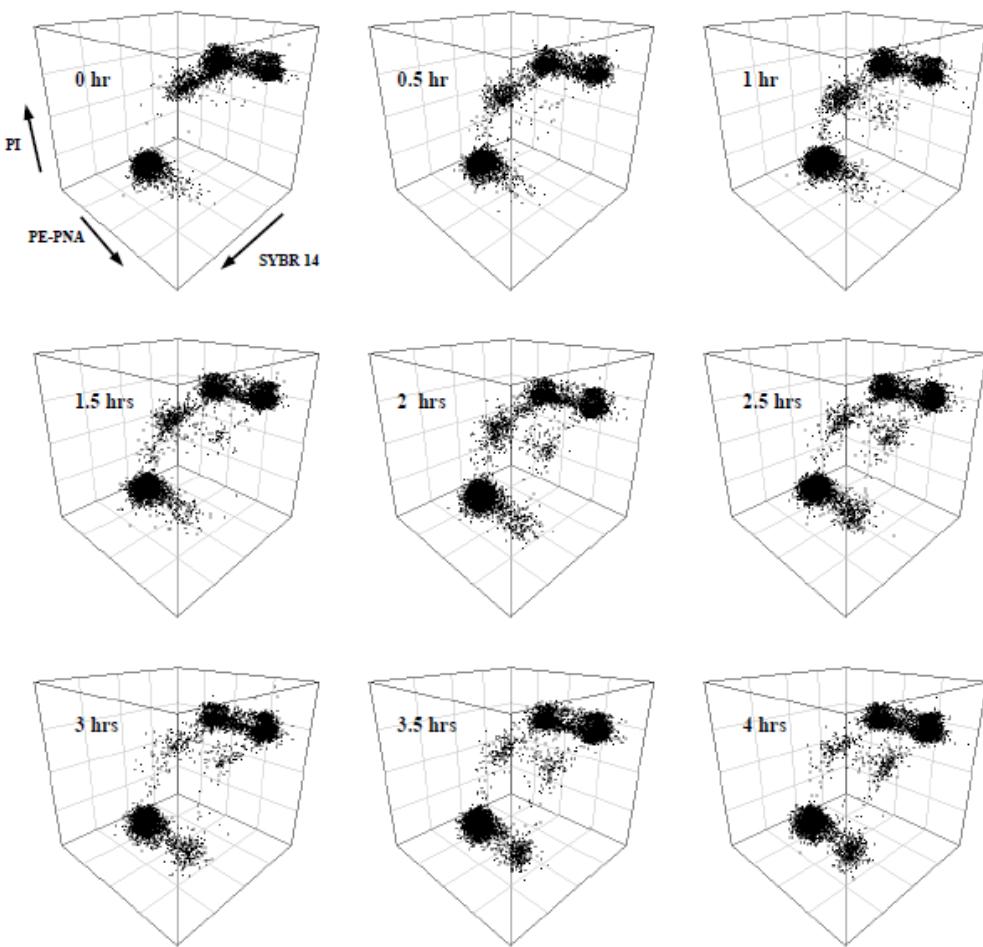
A flow citométert lassú áramlási sebességgel (6-24 µl /min) használtuk. Az adatrögzítést 3000 „haldokló” esemény elérése után állítottuk meg. Az adatokat standard list mode fájlformátumban tároltuk az adatelemzésig.



2. ábra. SYBR 14/PE-PNA/PI citogramok. A zöld szín az élő (intakt plazmamembránnal bíró) spermumokat, a vörös szín az elhalt ondósejteket jelzi. A lila szín a „haldokló” sejteket mutatja, a narancssárga színű események a DNS-t nem tartalmazó egyéb elemek (spermahígító lipidszemcséi, sejttörmelék stb.).

2.2.5. Adatelemzés

A SYBR 14/PI dot plot-okon régiók megrajzolásával állapítottuk meg az élő, elhalt és haldokló sejtek arányát. A PE-PNA/PI dot plot-okon kvadránsok kijelölésével azonosítottuk és állapítottuk meg a következő alpopulációk arányát: élő spermumok ép akroszómával (live, intact; LI), élő sejtek sérült akroszómával (live, ruptured; LR), elhalt spermumok intakt akroszómával (dead, intact; DI) és elhalt sejtek sérült akroszómával (dead, ruptured; DR). Mindezeken túl, a haldoklóként azonosított események régióját kapuként alkalmazva a PE-PNA/PI dot plot-okon, a kvadránsok pozíciójának változtatása nélkül megvizsgáltuk a haldokló spermumok akroszómaállapotát is. A három fluoreszcens próba egyidejű megjelenítéséhez háromdimenziós dot-plot-okat készítettünk az egyes időpontokban gyűjtött minták közötti változások vizualizálására (3. ábra).



3. ábra. 3D-citogramok – a 4 órás inkubáció során bekövetkező populációváltozások, félórás mintavételezéssel. 20 – 20 000 esemény megjelenítve az egyes ábrákon.

Az adatelemzéshez WinMDI 2.8 ingyenes szoftvert alkalmaztunk (J. Trotter, <http://facs.scripps.edu/software.html>). A leíró statisztikához Microsoft® Excel 2000 szoftvert használtunk. Az egyes bikák, napok, illetve az ismételt mérések közötti különbségek vizsgálatához ismétléses variaanalízist alkalmaztunk, a STATISTICA 5.5 programcsomag Within Subjects (Repeated Measures) ANOVA with Multiple Dependent Measures (MANOVA) opciójával (Statsoft Inc., 2000). A bikák független, random faktorként szerepeltek, míg a napok és az ismételt mérések egyedeken belüli (within-subject), ismétléses tényezőkként lettek beállítva, a napok esetében 3, az ismételt mérések esetében 9 szinttel. Az adatelemzést elvégeztük a LI, LR, DI és DR alpopulációkon, valamint a sérült akroszómájú, haldokló alpopulációon (dying, ruptured; DYR) is. Az egyes spermium-alpopulációk inkubáció előtti és utáni arányát a STATISTICA 5.5 program T-test for Dependent Samples opciójával értékeltük.

2.3. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok mitokondriális aktivitásának értékelése MitoTracker Deep Red 633 festés és flow citometria alkalmazásával

2.3.1. Reagensek

A vizsgálat során felhasznált reagenseket az alábbi forrásokból szereztük be: Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA, SYBR-14, a LIVE/DEAD Sperm Viability Kit részeként, L-7011 és MitoTracker Deep Red, M-22426), DMSO (Fluka, 41640), Becton Dickinson (San Jose, CA, USA, CellWash optimised PBS, cat. no. 349524), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.3.2. Vizsgált állatok, spermafeldolgozás

A vizsgálatban hat észtországi holstein-fríz tenyészbika termékenyítőanyagát értékeltük. Az állatok és a spermafeldolgozás menete megegyezett a dolgozat 2.1. alfejezetében ismertetettel.

2.3.3. A spermaminták előkészítése laboratóriumi vizsgálatokhoz

A spermaminták előkészítése és értékelése a 2.1. alfejezetben ismertetettel azonos módon, két időpontban történt: közvetlenül felolvasztást követően (post-thaw, PT), illetve felolvasztást, majd swim-up kezelést követően (SU). Spermamintánként két-két műszalmát olvasztottunk fel +35 °C-os vízfürdőben, 12 másodpercig, majd a műszalmát tartalmát összekevertük. A SU-kezeléshez 200 µl spermát rétegeztünk 400 µl Fert-TALP fertilizációs médium alá (13), amely 6mg/ml zsírsavmentes BSA-t, 0,25 µM nátrium-piruvátot, 5 µg /ml heparint, 20 µM D-penicillamint, 10 µM hipotaurint és 1 µM epinefrin tartalmazott. Hatvan perc (39 °C, 5% CO₂) inkubációt követően a médium felső 300 µl-es rétegét begyűjtöttük a további spermavizsgálatokhoz.

2.3.4. Spermabírálat

A mélyhűtés-felolvasztás (PT) és swim-up kezelés (SU) után a spermaminták motilitásvizsgálatát és koncentráció-értékelését végeztük el a 2.1. alfejezetben leírtak szerint:

2.3.5. Motilitás és koncentráció értékelése

Öt µl spermamintát helyeztünk Makler sejtszámláló kamrába (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) és számítógépes motilitásvizsgáló berendezéssel (CASA, SM-CMA, MTM Medical Technologies, Montreaux, Switzerland) értékeltük. A motilitásvizsgáló berendezés beállításait az 1. táblázat tartalmazza. Mintánként legalább 100 – 100 spermium motilitási adatai kerültek rögzítésre +38 °C-os hőmérsékleten. Az összes motilis sejt aránya, a lineárisan, nem lineárisan

és körkörösen mozgó ondósejtek aránya mellett a műszer a következő kinetikai paramétereket is rögzítette: straight linear velocity (VSL), average path velocity (VAP) és curvilinear velocity (VCL). A lineáris motilitást mutató spermiumok aránya manuális számítással került meghatározásra, a látómezőkben jelen lévő sejtek számát alapul véve.

A spermiumok motilitása szubjektíven is meghatározásra került, ugyanazon mintából, fáziskontraszt mikroszkóp alkalmazásával, 400-szoros nagyítással, +38 °C-os melegítő tárgyasztalon. Négy-négy látómező átlaga került rögzítésre.

A koncentráció megállapítása Bürker-hemocitométer használatával történt Bane (1952) szerint, a spermiumkoncentrációt $10^6/\text{ml}$ -ben kifejezve.

2.3.6. Fluoreszcens festékkombináció flow citométeres mérésekhez

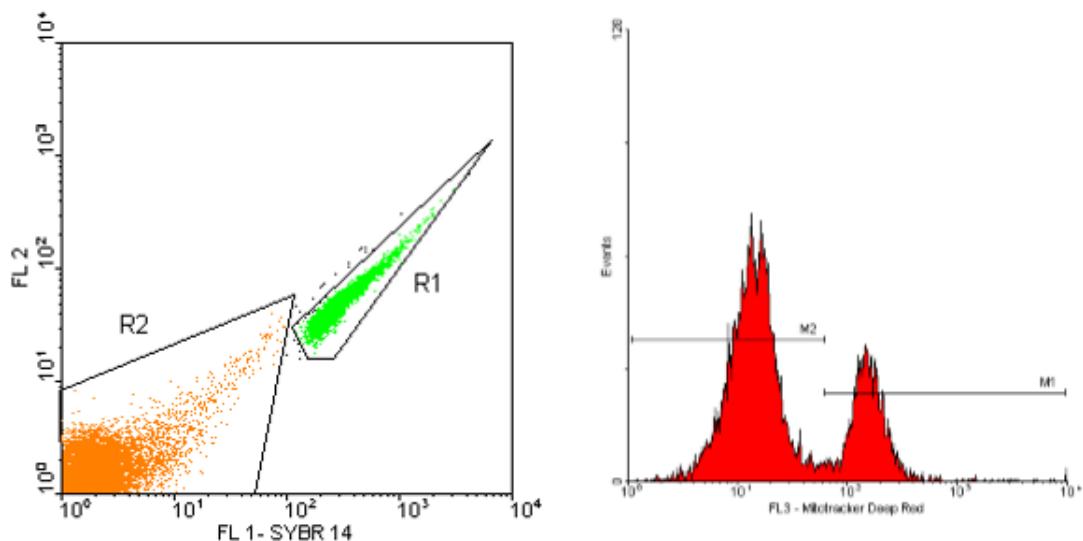
Száz μM SYBR-14 törzsoldatot készítettünk DMSO-ban, majd közvetlenül a minta előkészítés előtt a törzsoldatból 100 nM munkaoldatot készítettünk a törzsoldatot tovább hígítva CellWash optimalizált PBS-ben. Hasonlóan készítettük el a MitoTracker Deep Red oldatokat: 1 mM MitoTracker Deep Red törzsoldatot készítettünk DMSO-ban, majd közvetlenül mintaelőkészítés előtt 20 μM munkaoldatot CellWash optimalizált PBS-ben.

A fluoreszcens festés menete a következő volt: a spermamintákat CellWash optimalizált PBS-ben megközelítőleg $1 \times 10^6/\text{ml}$ koncentrációra állítottuk be 5 ml térfogatú Falcon csövekben. Öt nM SYBR-14 munkaoldatot és 100 nM MitoTracker Deep Red munkaoldatot adtunk a sejtsuszpenziókhöz, majd 38 °C-on, sötétben tartva inkubáltuk a mintákat 10 percig. Flow citométeres értékelés előtt a mintákat vortex-szel felkevertük, homogenizáltuk.

2.3.7. Flow citometria

A flow citométeres méréseket BD LSR flow citométerrel (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) végeztük. A SYBR 14 festék gerjesztése 488 nm, 20 mW Argon ion lézerrel, a MitoTracker Deep Red gerjesztése 633 nm 17 mW HeNe lézerrel történt. A SYBR 14 fluoreszcencia-intenzitást (zöld szín, DNS-t tartalmazó események) az FL 1 (530/28 nm), a MitoTracker Deep Red fluoreszcencia-intenzitást az FL 3 (670 LP) detektorral rögzítettük (4. ábra). Az egyenes irányú és oldalirányú szórtfényintenzitást lineáris, a fluoreszcens jelek intenzitását log skálán detektáltuk. A fluoreszcens jelek kompenzációját Roederer (2000) szerint állítottuk be. Az adatgyűjtést CellQuest 3.1 szoftverrel (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) végeztük el. A nem spermium események és mtsaiacsony SYBR 14 fluoreszcencia-intenzitásuk alapján azonosítottuk (DNS-tartalom nélküli események). A flow citométert alacsony áramlási sebességgel ($6\text{-}24 \mu\text{l}/\text{min}$) üzemeltettük. Az adatgyűjtést mintánként 10 000

SYBR-14-pozitív esemény elérése után állítottuk meg. Az adatokat standard fcs-fájlformátumban tároltuk.



4. ábra. SYBR 14/Mitotracker Deep Red analízis. A baloldali citogram R1 régiójában a SYBR 14-pozitív események (DNA-tartalmú sejtek, spermiumok) találhatók, az R2 régió a többi, DNA-t nem tartalmazó eseményt tartalmazza. A jobboldali hisztogram az aktív és inaktív mitokondriumokkal bíró ondósejtek eloszlását mutatja a Mitotracker Deep Red fluoreszcencia intenzitása alapján. M1 marker mutatja a spermiumokat aktív mitokondriumokkal, az M2 marker az inaktív mitokondriumokat tartalmazó sejteket.

2.3.8. Adatelemzés

Az FL 1/FL 2 dot plot citogramokon meghatároztuk a SYBR-14-pozitív események régióját, és ezt a régiót tekintettük „spermium” populációnak. A SYBR-14/MitoTracker Deep Red dot plot citogramokon külön régiókat határoztunk meg az alacsony és intenzív MitoTracker Deep Red fluoreszcenciát mutató eseményeknek.

A leíró statisztikát Microsoft® Excel 2000 alkalmazásával készítettük el. Az eredmények statisztikai értékeléséhez a 3. fejezetben leírtak szerint, Statistical Analysis Systems (SAS) szoftvercsomagot használtunk (SAS Institute Inc., 1990) összesen 37 észlelésen (6 bika, 2-4 spermaminta/bika, 3 korcsoport). A bikakorcsoportok összehasonlítására, illetve a kezelések hatásának értékelésére a MIXED eljárást, az egyes bikák közötti egyedi eltérések értékelésére a GLM eljárást alkalmaztuk, a statisztikai modellben az egyed véletlen hatásként szerepelt. Az egyes spermaminőségi paraméterek közötti kapcsolatot Pearson korrelációs koefficiens alkalmazásával vizsgáltuk.

2.4. Magas környezeti hőmérséklet hatása halspermiumok plazmamembrán-integritására és mitokondriális aktivitására

2.4.1. Vizsgált állatok

A vizsgálatokhoz az egyedi variancia csökkentése érdekében (Sood és mtsai, 2012) három ezüstkárász (*Carassius auratus*) kevert spermamintáját használtuk. A spermiációt ponty hipofízis kivonatával idéztük elő, az egyedeket spermavétel előtt szegfűszeg-olajjal bódítottuk. A spermamintákat vételt követően azonnal a laboratóriumba szállítottuk, ahol PBS-ben szuszpendáltuk az ondósejteket a flow citométeres mérésekhez szükséges sejtkonzcentráció ($<5 \times 10^6/\text{ml}$) elérése érdekében. Az ondósejtek esetleges aktivációját Olympus CX40 fáziskontraszt mikroszkóppal ellenőriztük, a sejtanalitikai mérésekhez csak aktiválatlan spermiumokat használtunk. A spermamintákat nyolc almintára osztottuk, és 20, 25, 30 és 40 °C-on inkubáltuk 10, illetve 30 percig. A vizsgálatot három ismétlésben végeztük el.

2.4.2 Plazmamembrán-integritás

Az élő, intakt plazmamembránnal bíró ondósejtek százalékos arányának megállapításához Live/Dead Sperm Viability Kit-et (Life Technologies, L-7011) alkalmaztunk Garner és mtsai (1994) szerint. Az intakt sejteket SYBR 14 fluoreszcens festék jelöli zöld színnel, az elhalt ondósejteket propidium-jodiddal jelöltük, amely vörös fluoreszcenciát mutat.

2.4.3. Mitokondriális aktivitás

Az alacsony és magas mitokondriális membránpotenciált mutató spermiumokat MitoTracker Deep Red FM (Life Technologies, M22426) fluoreszcens festék segítségével különítettük el Hallap és mtsai (2005) módszere szerint. A fluoreszcens próba az aktív mitokondriumokat intenzív, távoli vörös fluoreszcens fényvel jelzi.

2.4.4. Flow citometria

A flow citométeres mérésekhez Beckman Coulter FC-500 áramlási citométert alkalmaztunk. A fluoreszcens festékeket 488 nm-es és 635 nm-es lézerrel gerjesztettük, az emittált jeleket az adott festék emissziós spektrumának megfelelő detektorokkal rögzítettük (SYBR 14: FL1; propidium-jodid: FL3; MitoTracker Deep Red FM: FL4). Mintánként 10 000 ondósejt szórtfényintenzitási és fluoreszcens jeleit rögzítettük Beckman Coulter CXP szoftver alkalmazásával.

2.4.5. Adatelemzés

A standard FCS formátumban tárolt adatfájlok elemzéséhez Flowing 2.5.1. ingyenes szoftvert (www.flowing.com) használtunk. A plazmamembrán-integritás vizsgálata során az egyes minták SYBR 14-pozitív eseményeinek százalékos arányát (élősejt%) rögzítettük. A mitokondriális aktivitás értékelése során a MitoTracker Deep Red FM hisztogramok medián fluoreszcencia-intenzitását (MFI – dimenzió nélküli érték) számítottuk ki. Mivel a spermiumok több mitokondriumot tartalmaznak sejtenként, ez a mutató érzékenyebben jelzi a mitokondriális membránpotenciál változásait, mint a magas vagy alacsony MitoTracker Deep Red FM fluoreszcenciát mutató sejtek százalékos aránya, hiszen az adott sejt mitokondrium-állományán belül is lehetnek eltérések a membránpotenciál tekintetében.

Az adatértékeléshez az élősejt% esetében ismétléses ANOVA-t (Repeated Measures ANOVA) és post-hoc Newman-Keuls tesztet alkalmaztunk Statistica for Windows 8.0 (StatSoft, Inc., 2007. STATISTICA data analysis software system, www.statsoft.com) használatával. A különböző időpontokban és hőmérsékleten rögzített MitoTracker Deep Red FM hisztogramok profiljának összevetésére a flow citométer CXP Analysis szoftver hisztogramelemző moduljában elérhető Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk, a 20 °C-on 10 percig inkubált spermamintát alkalmazva kontrollként. A teszt alkalmazásával az egyes kumulatív hisztogramokat egymásra vetítve megállapíthatjuk a két hisztogram közötti maximális abszolút különbséget (Dmax), illetve azt, hogy az összevetett sejtpopulációk közötti különbség szignifikáns-e (Young, 1977; Cox és mtsai, 1988).

2.5. Spermium-kromatinszerkezet és morfológia: kapcsolat a fertilitással

2.5.1. Vizsgálatba vont apaállatok, mintavétel, termékenyítések

A termékenyítőképességet érintő vizsgálatban 43 Ayrshire tenyészbika azonos életkorban gyűjtött és mélyhűtött spermamintáját használtuk fel. A termékenyítő adagok 0,25 ml-es műszalmákban, kb. 15 millió/műszalma sejtkoncentrációval kerültek mélyhűtésre 1999 és 2006 között. A kiválasztott egyedek mintegy fele (n=22) szubfertilis volt, a többi bika (n=21) fertilisnek bizonyult, öket tekintettük kontrollnak a vizsgálatban. A szubfertility – fertilitás a 60 napos non-return rate (NRR) alapján került megállapításra, a szub- és normális fertilitás közötti küszöbérték 55% volt. minden egyes bika spermájával legalább 1200 mesterséges termékenyítést hajtottak végre, és a termékenyítési eredményeket statisztikailag korrigálták egy sor (lásd alább) zavaró tényező tekintetében. A 43 bika spermamintáival összesen több, mint 256000 termékenyítés történt (minimum 1202, maximum 81644, átlag bikánként 5964). A fenti

állatok mellett három további bikát is bevontunk a vizsgálatba: egy egyed reciprok transzlokációjához kötődő volt, a másik két állat esetében a spermatogenezis során meiotikus zavarok léptek fel, így az ejakulátumaikban mintegy 20%-ban jelentek meg diploid spermiumok.

2.5.2. Fertilitási mutatók

Az alábbi fertilitási eredmények kerültek rögzítésre minden vizsgált bika esetében: (1) korrigálatlan 60-napos non-return rate (NRR%), (2) korrigált non-return rate index (NRR-index), ahol a NRR% korrekciója során figyelembe vették az ellések számát, az évszakot, az inszeminátort és a tenyészetet, valamint (3) az ellési % (calving rate - CR), ahol az újra inszeminált, selejtezett és eladott állatok nem vemhesültként kerültek az adatbázisba. A fertilitási eredményeket az Agricultural Data-Processing Centre Ltd., Vantaa, Finland bocsátotta rendelkezésünkre.

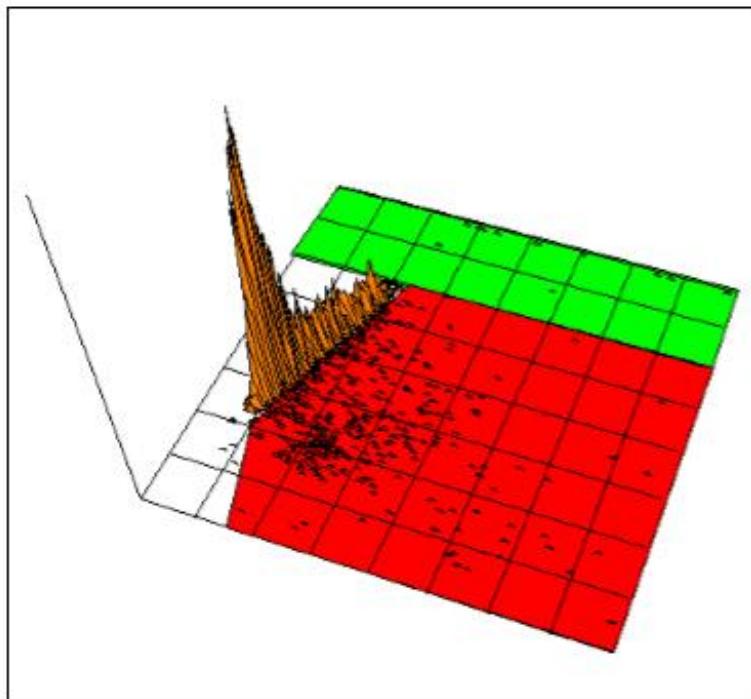
2.5.3. Morfológiai értékelés

A spermiummorphológiai vizsgálatokat légszáraz keneteken, Giemsa-festést (Watson, 1975) követően végeztük. Kenedenként 300 -300 spermiumot osztályoztunk Blom (1983) szerint, az egyes spermiumokon csak a termékenyítőképesség tekintetében legsúlyosabb rendellenességet rögzítve. A spermiumokat négy osztályba soroltuk: nagy hatású defektus (Major), proximális citoplazmacsepp (Prox), kis hatású defektus (Minor) és normális spermium (Normal). A nagy hatású osztályba az alábbi rendellenességeket soroltuk: fejletlen, dupla fej vagy flagellum, görcsös akroszóma, fej nélküli spermium, diadém defektus, körtefej, keskeny fej, rendellenes kontúr, kicsi, rendellenes fej, dugóhúzó defektus, rövid flagellum, álcsepp, Dag-defektus. A morfológiai értékelést minden egyed esetében ugyanaz a személy végezte.

2.5.4. Sperm Chromatin Structure Assay

A spermiumok kromatinszerkezeti sérüléseinek detektálására akridin-narancs festést alkalmaztunk (Evenson és Jost, 2000). A festék egyszálú DNS-hez kötődve vörös, kétszálú, intakt DNS-hez kötődve zöld fluoreszcens jelet ad. A kromatindenaturáció mértékét a vörös (denaturált, egyszálú DNS) és a vörös+zöld (a sejt teljes DNS-tartalma) fluorescencia-intenzitás aránya fejezte ki. A denaturációs arányt spermiumonként számítottuk ki, és az eredményeket a magas denaturációs arányt mutató spermiumok arányával és szórásával (DNS fragmentáció – DF% és SD DF) fejeztük ki. A magas zöld fluorescencia-intenzitás (high green

fluorescence - HIGR) is rögzítésre került (5. ábra), ez a mutató nem teljes hiszton-protamin kicsérélődésre utal a spermatogenezis során (Evenson és mtsai, 2000).



5. ábra. SCSA 3D citogram. Az intakt kromatinállományú ondósejtek a fehér régióban találhatók (narancsszánnal jelölve). A fragmentált DNS-tartalmú ondósejtek a vörös régióban, a nem megfelelően kondenzált kromatin tartalmazó spermiumok a zöld régióban találhatók.

2.5.5. Akridin-narancs festés

A felolvasztott spermaminták sejtkoncentrációját $1\text{-}2 \times 10^6/\text{ml}$ -re állítottuk be TNE pufferben (0,01M TRIS, 0,15M NaCl, 1mM EDTA, pH 7,4) szuszpendálva. Egy perccel később 200 µl sejtszuszpenzióhoz 400 µl sav-detergens oldatot (0,15 M NaCl, 0,08 N HCl, 0,1% Triton-X 100, pH 1,2) adtunk. Pontosan 30 másodperc után a spermiumokat 1,2 ml akridin-narancs festékoldattal (0,2M Na₂HPO₄, 1mM EDTA, 0,15M NaCl, 0,1 M citromsav, 6 mg/ml akridin-narancs, Merck Kebo Lab, Stockholm, Sweden, pH 6,0) jelöltük. A flow citometeres méréseket 3 perccel a savas kezelést követően kezdtük.

2.5.6. Flow citometria

A méréseket Becton Dickinson FACSStar Plus flow citométerrel (Becton Dickinson Immunochemistry Systems, San Jose, CA, USA) végeztük. Az akridin-narancs gerjesztéséhez Ar ion lézert (Innova 90, Coherent, Santa Clara, CA, USA) használtunk, 488 nm gerjesztési

hullámhosszon. A kétszálú DNS-hez kötődő festék zöld fluoreszcens jelét az FL 1 (530/28 nm) detektorral, az egyszálú DNS vörös fluoreszcens jelét az FL3 (> 630 nm) detektorral rögzítettük. Az adatgyűjtést CellQuest 3.1 szoftverrel (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) végeztük el. Az adatrögzítést mintánként 10 000 esemény elérése után állítottuk meg. Az adatokat standard fcs fájlformátumban tároltuk értékelésig.

2.5.7. Adatértékelés

Az adatalemzéshez és a paraméterszámításokhoz FCSExpress szoftvert (version 2, DeNovo Software, Thornhill, Ontario, Canada) használtunk. A kromatinkondenzáció értékeléséhez a zöld fluorescenciaintenzitást vizsgáltuk, egy egészséges bika mintáját használva kontrollként (Revay és mtsai, 2009). A nagy zöld fluorescencia intenzitást (high green fluorescence - HIGR) mutató eseményeket olyan spermiumoknak tekintettük, amelyeknek nem teljes a kromatinkondenzációja.

2.5.8. Statisztikai elemzés

Az adatalemzéshez STATISTICA szoftvert (version 8.0., StatSoft, Inc., 2007) használtunk. A szubfertilis és fertilis bikacsoportok összehasonlításához nemparaméteres Mann-Whitney U-tesztés mtsaikalmaztunk. Az egyes spermatológiai paraméterek és a fertilitás kapcsolatának feltárását nemparaméteres Spearman rangkorrelációval végeztük el. Emellett a szubfertilis és fertilis bikacsoportokat ROC-görbe analízissel (Aitken és mtsai, 2010) is összevetettük, XIstat Life program (Addinsoft, USA) alkalmazásával. A görbe alatti terület (Area under the curve - AUC) kiszámításával vizsgáltuk meg, hogy az egyes spermatológiai paraméterek milyen mértékben képesek a szubfertilis és fertilis csoportok közötti diszkriminációra. A fertilis és szubfertilis csoportok elkülönítésére alkalmazandó küszöbértékeket Youden index, J (Greiner és mtsai, 2000) kiszámításával állapítottuk meg a következő képlettel:

$$J = (\text{érzékenység} + \text{fajlagosság}) - 1.$$

2.6. Alternatív DNS-károsodási tesztek összehasonlítása: TUNEL és Nicoletti-teszt

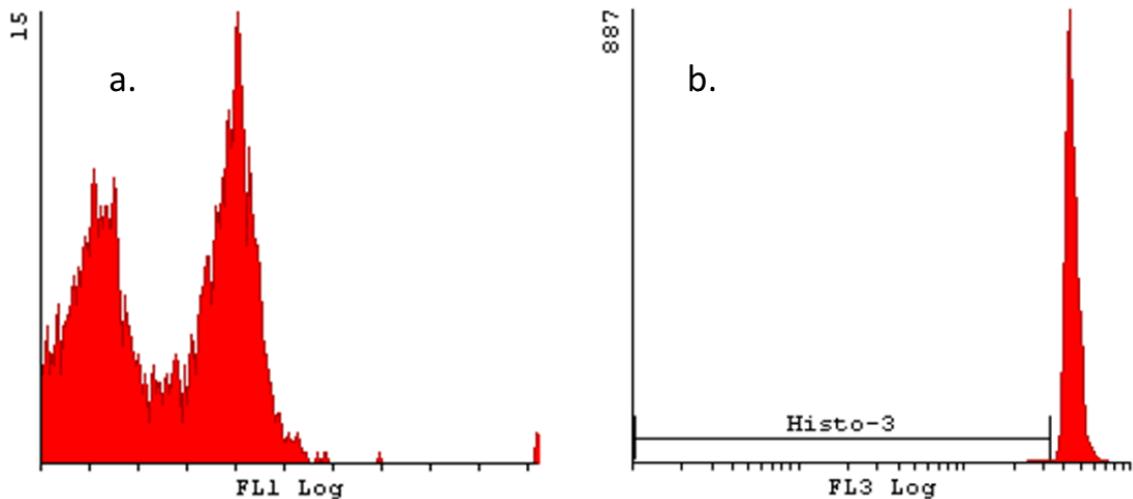
2.6.1. Spermaminták

Tizenkét, véletlenszerűen kiválasztott tenyészstmén 500 µl-es műszalmában tárolt, folyékony nitrogénenben mélyhűtött spermamintáját használtuk fel a vizsgálatban. A műszalmákat 37 °C-os vízfürdőben olvasztottuk fel 60 másodperc alatt, majd a tartalmukat 2 ml-es Eppendorf csövekbe töltöttük.

2.6.2. TUNEL teszt

A flow citométeres TUNEL teszthez a kereskedelmi forgalomban elérhető APO-BrdU™ TUNEL Alexa Fluor® 488 anti-BrdU Assay Kit-et (A23210, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) használtuk a gyártó által javasolt protokoll szerint. Spermamintánként $1\text{-}2 \times 10^6$ sejtet szuszpendáltunk 0,5 ml PBS-ben (Phosphate Buffered Saline, P-4417, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), majd 1,5 ml 1% paraformaldehid hozzáadásával fixáltuk a mintákat 15 percig -20 °C-on. A mintákat kétszer átmostuk 2 ml PBS-ben (400 x g, 10 perc centrifugálás), majd a sejteket reszuszpendáltuk 0,5 ml PBS-ben és permeabilizáltuk 1,5 ml 70% etanolral, és -20 °C-on tároltuk egy éjszakán át. Másnap a mintákat háromszor átmostuk a TUNEL Kit mosópufferével (Wash Buffer, 400 x g, 10 perc centrifugálás), majd reszuszpendáltuk 50 µl frissen elkészített DNS jelölő oldatban (Labeling Solution, a TUNEL kitben) és egy órán át inkubáltuk 37 °C-on, a mintákat felkeverve minden 15 percben. Az inkubációs idő leteltével 1 ml öblítőpuffert (Rinse Buffer a TUNEL kitben) adtunk a mintákhoz és a sejtszuszpenziókat kétszer átmostuk (400 x g, 10 perc centrifugálás). Ezt követően a sejteket reszuszpendáltuk 100 µl frissen elkészített antitest oldatban (Antibody Solution a TUNEL kitben) és 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, sötétben. Végül 0,5 ml propidium-jodid/RNáz A jelölőpuffert aTUNEL kit része) adtunk a mintákhoz és további 30 percig inkubáltuk sötétben, majd elvégeztük a flow citométeres méréseket.

A méréseket Beckman Coulter FC 500 flow citométerrel (Beckman Coulter, Inc. Brea CA, USA) végeztük. A gerjesztő fényforrás 488 nm 20 mW Ar ion lézer volt. A spermium és egyéb események megkülönböztetését a szórtfényintenzitás és propidium-jodid fluoreszcenciaintenzitás alapján különítettük el. Az Alexa Fluor 488 konjugátum fluoreszcenciaintenzitását a citométer FL1 (525 nm BP) detektorán rögzítettük, log módban. Az egyes minták futtatását 300 másodperc futtatási idő vagy 20 000 esemény elérése után állítottuk le. Az adatfájlokat list mode (LMD) formátumban tároltuk. Az adatelemzést Flowing ingyenes adatelemző szoftverrel (Version 2.5.1, <http://www.flowingsoftware.com>) végeztük el. A DNS-fragmentációt az Alexa Fluor 488 konjugátum zöld fluoreszcenciaintenzitásának emelkedése jelezte, amit egydimenziós FL1 hisztogramokon értékeltünk (6.a ábra).



6. ábra. Spermiumok DNS-fragmentációjának értékelése TUNEL (6.a.) és Nicoletti (6.b.) tesztekkel.

2.6.3. Nicoletti teszt

A Nicoletti teszt gyors verzióját alkalmaztuk a jelen vizsgálatban, Riccardi és Nicoletti (2006) leírása alapján. A spermamintákból felolvasztást követően azonnal $1-2 \times 10^6$ spermiumot szuszpendáltunk 1 ml PBS-ben, Eppendorf csövekben, majd centrifugáltuk ($400 \times g$, 10 perc). A mosást követően a sejteket reszuszpendáltuk 1ml előzetesen elkészített fluorokróm oldatban, amely 0,1% nátrium-citrátot (wt/v; 27833.237, VWR International, Radnor, PA, USA), 0,1% Triton X-100-at (v/v; 9002-93-1, G-Biosciences, St. Louis, MO, USA), 50 mg l-1 PI-ot (Component B, LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, L-7011, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) tartalmazott desztillált vízben. A spermiumokat egy órán át inkubáltuk az oldatban szobahőmérsékleten ($20^\circ C$), sötétben tartva, majd a fent leírt flow citométerrel értékeltük a festett mintákat. A PI-fluoreszcencia intenzitást a citométer FL3 (620 nm SP) detektorán rögzítettük. A mérési adatfájlokat list mode (LMD) formátumban tároltuk.

A spermiumokat a többi eseménytől a szórtfényintenzitási (FSC vs SSC) jellemzőik alapján különböztettük meg, és a spermiumok fluoreszcenciaintenzitási értékeit egydimenziós FL3 hisztogramokon jelenítettük meg. A DNS-fragmentációt a sejtek alacsonyabb fluoreszcenciaintenzitása jelezte (6.b ábra).

2.6.4. Mikroszkópia

A flow citométeres méréseket követően a mintákat Olympus CX31 fluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztük (Olympus Europe, Hamburg, Germany). A mikroszkóp fényforrása higanygózlámpa (U-RFLT50) volt, és standard FITC/TRITC szűrőkockákkal volt felszerelve.

2.6.5. Konfokális lézer pásztázó mikroszkópia

A TUNEL-kit alkalmazásával a fentiek szerint jelölt spermiumokat konfokális mikroszkóppal is ellenőriztük. Egy csepp festett sejtszuszpenziót Superfrost mikroszkóp tárgylemezre cseppentettünk, majd lefedve azonnal értékeltük egy BioRad MRC 1024 konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

2.6.6. Adatelemzés

A kétféle teszt eredményei közötti egyezést Bland-Altman módszeregyezési teszttel (Bland, Altman, 1986) Microsoft Excel 2013 szoftverrel értékeltük.

2.7. Tenyészbikák gyors citogenetikai szűrvizsgálata spermiumok DNS-tartalmának flow citométeres hisztogramanalízisével

2.7.1. Spermaminták

Az első vizsgálatban három, citogenetikai rendellenességektől mentes tenyészbika mélyhűtött-felolvasztott spermáját értékeltük. A második vizsgálatban ezen bikák egyike szolgált kontrollként (A), és mellette a következő rendellenességeket hordozó bikákat teszteltük: a B bika 2;4 reciprok transzlokáció hordozó volt (Switonski és mtsai, 2008); a C bika 20;24 reciprok transzlokáció hordozó volt (Andersson és mtsai, 1992); a D bika ondósejtjeinek mintegy 20 – 25%-a diploid spermium volt (Revay és mtsai, 2010); az E bika a 6. és 29. kromoszómákat érintő komplex transzlokációt hordozta (Venhoranta és mtsai, 2013).

2.7.2. Fluoreszcens DNS-jelölés

A spermiumok DNS-ét propidium-jodid (PI) festéssel jelöltük. A PI az FXCycle PI/RNase kit (F10797, Molecular Probes) része volt.

A jelölés során a gyártó által megadott módszert követtük: a spermiumokat 70%-os etanolban fixáltuk, majd 10 percig 400 x g centrifugálással kimostuk a sejteket a fixálóból. A pellethez 500 µl FXCycle PI/RNase festékoldatot adtunk, a sejtszuszpenzió koncentrációja így

megközelítőleg 1 millió/ml volt. A szuszpenziókat vortex-szel homogenizáltuk, majd 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, sötétben.

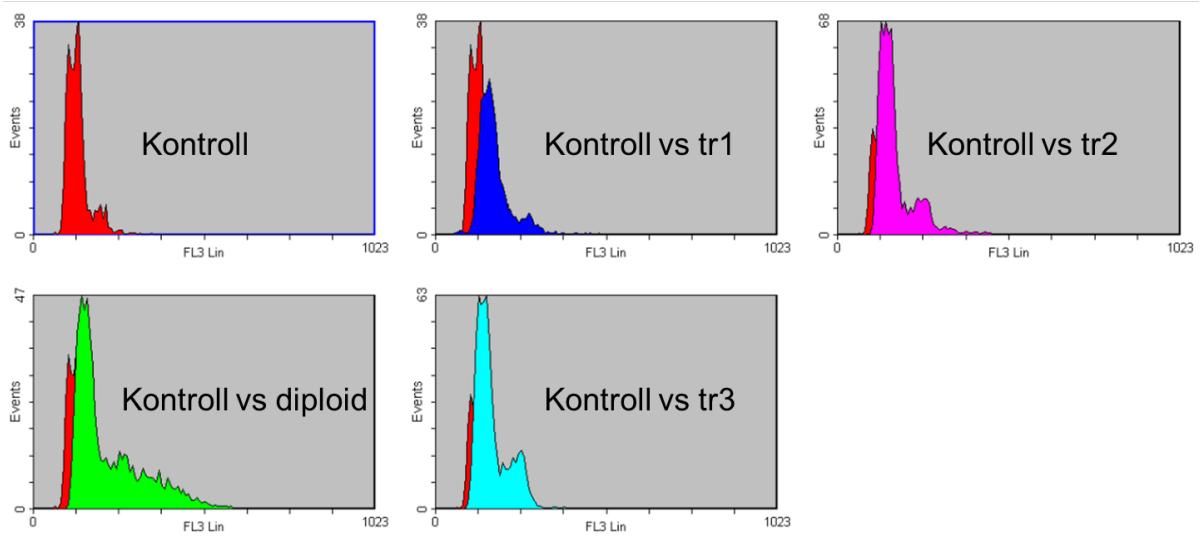
2.7.3. Flow citometria

A PI-fluoreszcenciantenzitással kifejezett DNS-mennyiséget Beckman Coulter FC500 flow citométerrel értékeltük. A készülék gerjesztő fényforrása 488 nm 20 mW argon ion lézer volt, a PI-fluoreszcenciát az FL3 detektoron (655 nm LP) rögzítettük lineáris módban. A spermiumfejek orientációját nem állt módunkban befolyásolni, mivel a citométer nem rendelkezett speciális orientáló fejjel. Az összetapadt sejtek fluoreszcens jelének elkülönítésére a gyártó (Beckman Coulter) javaslatait követtük. Mintánként 5000 esemény szórófény- és fluoreszcencia-intenzitási értékeit rögzítettük és tároltuk list mode (LMD) fájlként. A flow citométer optikai stabilitását naponta ellenőriztük FlowCheck fluoreszcens mikrogyöngyök segítségével (6605359, Beckman Coulter), továbbá az egyes minták közötti véletlenszerű fluoreszcencia-intenzitási ingadozás ellenőrzése érdekében minden egyes 10 µl FlowSet fluoreszcens mikrogyöngyöt (6607007, Beckman Coulter) adtunk belső kontrollként.

2.7.4. Adatelemzés

Az 1. vizsgálat elemzése során egydimenziós hisztogramokon jelenítettük meg az egyes minták PI-fluoreszcencia intenzitását, majd az egyes hisztogramprofilokat a citométer CXP Analysis szoftvere Kolmogorov-Smirnov opciójának alkalmazásával hasonlítottuk össze. Ez az adatelemzési módszer két eseménypopuláció eltérését vizsgálja és megmutatja az egyes eseménypopulációk kumulatív gyakorisági hisztogramjainak maximális eltérését (Dmax érték; Young, 1977, Watson, 2001). Kiszámítottuk az egyes hisztogrampárok (három bika, három ismétlés, n=36 hisztogrampár) Dmax értékeit, majd ezen értékek normalitását Lilliefors teszt alkalmazásával értékeltük, illetve leíró statisztikai elemzést végeztünk Statistica for Windows (version 8., Statsoft Inc.) szoftver segítségével.

A 2. vizsgálat során a citogenetikai rendellenességeket hordozó bikák és a kontroll bika hisztogramprofiljait (7. ábra) a fentiekben leírtak alapján, Kolmogorov-Smirnov teszttel hasonlítottuk össze. Az egészséges és valószínűsíthetően rendellenességet hordozó egyedek megkülönböztetésére használható Dmax küszöbértéket az 1. vizsgálat leíró statisztikai vizsgálatából származó eredményekre építve számítottuk ki (átlag + 2SD; Indrayan, 2012).



7. ábra. A kontroll bika és a terhelt egyedek DNS-hisztorogramprofiljainak összevetése Kolmogorov-Smirnov teszt alkalmazásával.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán-stabilitásának értékelése Merocianin 540/Yo-PRO-1/Hoechst 33342 fluoreszcens festékkombinációval

3.1.1. Életkor hatása a spermiummorphológiára, motilitásra, plazmamembrán-integritásra és -stabilitásra

A spermium-rendellenességek aránya egyik korcsoportban sem haladta meg az egészséges tenyészbikák esetében jellemző, elfogadható értéket. A szubjektív motilitásbecslés eredményei nem különböztek szignifikánsan az egyes korcsoportok között ($p>0,05$), de a motilitás növekedése volt észlelhető a 3 és 5 éves, illetve 3 és 7 éves korcsoportok között a swim-up kezelést követően ($p<0,05$). A CASA-val végzett motilitásértékelés szignifikáns eltérést tárt fel a 7 éves korcsoport egyes egyedei között swim-up kezelés után ($p<0,05$), de az egyes korcsoportok között nem volt szignifikáns eltérés sem közvetlenül felolvasztást követően, sem swim-up után. Nem észleltünk korcsoporttól függő eltérést a lineáris motilitást mutató sejtek aránya és a VAP paraméter esetében sem. Spermiumkoncentráció tekintetében az 5 és 7 éves korcsoport között találtunk szignifikáns eltérést ($p<0,05$). Az élő, intakt plazmamembránnal bíró ondósejtek aránya nem különbözött szignifikánsan az egyes bikák között, de szignifikánsan magasabb volt a 7 éves korcsoportban a 3 éves (felolvasztás után) és az 5 éves (swim-up után) csoporthoz képest ($p<0,05$). Az élő, destabilizált plazmamembránnal bíró ondósejtek (magas M-540 fluoreszcencia-intenzitás) aránya nem különbözött szignifikánsan az egyes egyedek között egyik korcsoport esetében sem ($p>0,05$). Nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes korcsoportok között sem, kivéve a 3 és 7 éves korcsoportot, amelyek között felolvasztás után $p<0,05$ szinten szignifikáns volt az eltérés.

3.1.2. A swim-up kezelés hatása a spermiummorphológiára, motilitásra, membránintegritásra és- stabilitásra

A swim-up kezelés után szignifikánsan kevesebb flagellum-rendellenességet észleltünk, mint közvetlenül felolvasztást követően ($p<0,001$). Mind a szubjektív motilitásbecslés, mind a CASA-val végzett mérések szignifikánsan magasabb motilitást mutattak a swim-up kezelést követően: $p<0,01$ szinten a 3 és 5 éves korcsoport esetében; $p<0,001$ szinten a 7 éves korcsoport esetében, illetve az összes korcsoport együttes értékelése során. A swim-up kezelést követően a lineáris motilitást mutató spermiumok aránya csökkent ($p<0,01$), ezzel egyidejűleg nőtt a

VAP értéke ($p<0,001$). Az élő ondósejtek aránya szignifikánsan ($p<0,001$) nőtt a swim-up kezelés után.

A hármas fluoreszcens festékkombinációval végzett membrán-stabilitási vizsgálatok eredményei szerint az összes korcsoport együttes értékelése esetén mind a stabil ($p<0,05$), mind a destabilizálódott ($p<0,01$) plazmamembránnal bíró spermiumok aránya nőtt a swim-up kezelés hatására, mivel a kezelés szignifikánsan csökkentette az elhalt sejtek arányát ($p<0,01$). Az egyes korcsoportok külön-külön végrehajtott értékelése során azonban a destabilizálódott plazmamembránnal bíró spermiumok aránya csak a 3 éves korcsoport esetében nőtt jelentősen ($p<0,001$).

3.1.3. A plazmamembrán-destabilizáció és más spermiumparaméterek kapcsolata

A plazmamembrán-destabilizáció aránya és a vizsgált többi spermiumminőségi paraméter közötti kapcsolat vizsgálata során a konvencionális spermiumminőségi paraméterek szorosabb korrelációt mutattak az élő, stabil plazmamembránnal bíró ondósejtek arányával, mint a membrándestabilizációt mutató spermiumok arányával.

3.1.4. A laboratórium tesztek eredményei és az in vivo fertilitás kapcsolata

A 60 napos Non-return indexek (bikánként 2-4 ejakulátum) értéke 52,2-76,0% között mozgott (141-392 termékenyítés bikánként), az egyes ejakulátumok közötti eltérés csak két bika esetében volt szignifikáns ($p<0,05$). A fertilitás csak swim-up kezelés után mért eredményekkel mutatott szignifikáns korrelációt: VAP ($r=0,886$; $p<0,001$), összes motilis sejt aránya CASA-val értékelve ($r=0,804$; $p<0,01$), motilis sejtek koncentrációja CASA-val értékelve ($r=0,741$; $p<0,01$), lineáris motilitást mutató spermiumok aránya CASA-val értékelve ($r=0,762$; $p<0,01$), valamint a destabilizált plazmamembránnal bíró élő ondósejtek aránya ($r=0,629$; $p<0,05$).

3.2. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán- és akroszóma-integritásának változásai multikolor flow citometria alkalmazásával értékelve

A különböző napokon végrehajtott ismétlések között kisebb eltéréseket észleltünk ugyan, de ez egy esetben sem volt szignifikáns ($p=0,65, 0,09, 0,28$ és $0,88$ a LI, LR, DI and DR alpopulációk esetében).

A négyórás inkubáció alatt az élő, ép akroszómájú (LI) alpopuláció esetében összességében csak mintegy 5 % csökkenést tapasztaltunk (49,4% a felolvasztást követő 30. percben, 44,3% a 4 órás mintavétel esetében, $p<0,01$). Jóval drámaibb változás volt tapasztalható az elhalt,

intakt akroszómájú alpopuláció esetében: 34,4%-ról 17,4%-ra csökkent ($p<0,01$). Ezzel egyidejűleg az elhalt, sérült akroszómájú ondósejtek (DR) aránya 18%-ról 35%-ra emelkedett ($p<0,01$). Végül, az élő, sérült akroszómájú spermiumok (LR) aránya csak kis mértékben változott, 1,5%-ról 4,1%-ra, $p<0,01$).

Az egyes bikák közötti különbségek a négy (LI, LR, DI, DR) alpopuláció tekintetében minden esetben szignifikánsnak bizonyultak ($p<0,01$). Az ismételt mérések közötti eltérések is szignifikánsak voltak $p<0,01$ szinten mind a négy (LI, LR, DI, DR) alpopuláció esetében.

Bár bikánként eltérő mértékben, de minden vizsgált egyed esetében észlelhető volt az élő, ép akroszómájú (LI) alpopuláció arányának emelkedése az inkubáció első 30 perce során: közvetlenül felolvasztás követően a hat bika átlagában 45,3 % volt, ami a 30 perces mintavételeknél átlag 49,4%-ra nőtt ($p<0,01$). Ennek megfelelő, éles csökkenést észleltünk az élő, intakt akroszómájú alpopuláció (DI) esetében: 34,4% felolvasztást követően, és 26,9% a 30. percben ($p<0,01$).

A pozitív PE-PNA-jelet adó sejtek arányának vizsgálata során a haldokló alpopulációt belül (DYR) az egyes bikák esetében egyedenként eltérő mintázatú görbéket kaptunk. minden egyes bika esetében az volt látható, hogy a haldokló, sérült akroszómájú (DYR) alpopuláció aránya markánsan nőtt az inkubáció alatt (a hat bika átlagában a felolvasztást követő 3,5%-ról a 4 órás inkubáció végére 66,9%-ra emelkedett, $p<0,01$). A bikák közötti eltérések szignifikánsak voltak ($p<0,01$), ahogy az egyes mérési időpontok között is az inkubáció ideje alatt ($p<0,01$) de az ismétlések (napok) között nem ($p=0,33$).

A háromdimenziós ábrák lehetővé tették az inkubáció alatt végbenemő membránváltozások rekonstrukcióját. Közvetlenül a felolvasztást követően egy jól körülhatárolható élő, ép akroszómájú (LI) alpopuláció látható, alacsony PE-PNA és PI, illetve magas SYBR 14 fluoreszcencia-intenzitással. Nagyon kevés olyan esemény jelenik meg, amely élő, sérült akroszómájú ondósejtként (LR) interpretálható. Az elhalt, PI-pozitív spermiumok esetében két, egyértelműen elkülönülő alpopuláció látható, ami azt mutatja, hogy az elhalt spermiumok egy részének az akroszómája is sérült. Végül, egy kisebb eseménycsoport is kivehető, amely egyidejű SYBR 14 és PI pozitív jelet is mutat: ezek haldokló spermiumokként értelmezhetők. Feltűnő, hogy ezek mindegyike alacsony PE-PNA fluoreszcenciát mutat, ami azt jelzi, ép az akroszómájuk. Hasonló képet látunk 30 perc inkubációt követően. Egy óra után egy kisebb csoport jelenik meg a haldokló spermiumok között, magas PE-PNA fluoreszcenciát mutatva. Mivel hasonló akroszóma-sérült csoport az élő sejtekben belül nem jelent meg, ezen spermiumok akroszómája már a nekrotikus plazmamembrán-változások során/után sérült, vagy nagyon gyorsan elpusztultak a sejtek az akroszóma-exocitózis után. Két óra múltán egy kicsi, de

egyértelműen elkülönülő csoport mutatott pozitív akroszóma-jelet az élő spermiumokon belül. Ezzel egy időben egy haldokló, akroszóma-sérült csoport is elkülönül, amelynek PI-fluoreszcencia-intenzitása némileg alacsonyabb, mint a haldokló, ép akroszómájú spermiumoké. A haldokló, sérült akroszómájú sejtek 2,5 – 3 óra után elvesztették SYBR 14-intenzitásukat és magasabb PI-intenzitást mutattak a sejthalál előrehaladtával. Ez a változás lassabbnak tűnt az elhalt, élő akroszómájú alcsoportban. Végül, 4 óra után a haldokló spermiumok jelentős hányada sérült akroszómát mutatott (3. ábra).

3.3. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok mitokondriális aktivitásának értékelése MitoTracker Deep Red 633 festés és flow citometria alkalmazásával

3.3.1. Szubjektív motilitás

A szubjektív motilitásbecslés eredményei nem különböztek szignifikánsan az egyes bikák között egyik korcsoport esetében sem ($p>0,05$). Emelkedő motilitási értékek ($p<0,05$) voltak tapasztalhatók mind az 5 éves, mind a 7 éves korcsoportban a 3 éveshez képest, de csak SU-kezelést követően.

3.3.2. Számítógépes motilitásvizsgálat

Az egyes korcsoportok között nem volt szignifikáns eltérés sem felolvasztás, sem swim-up kezelés után. Mind a szubjektív motilitásbecslés, mind a CASA a motilitás szignifikáns javulását mutatta a swim-up kezelés után a felolvasztás utáni állapothoz képest $p<0,01$ (3 éves), $p<0,01$ (5 éves), $p<0,001$ (7 éves) szinten, és $p<0,001$ szinten, ha az összes korcsoportot összevontan értékelünk.

3.3.3. Spermiumkoncentráció

A swim-up kezelést követően kapott spermiumkoncentráció a mélyhűtött-felolvasztott spermaminták koncentrációjának százalékában kifejezve az egyes korcsoportok esetében az alábbiak voltak: 2,3 – 3,7% (3 éves), 2,7 – 5,5% (5 éves), 3,5 – 5,4% (7 éves). Ahogy várható volt, a swim-up kezelés szignifikánsan ($p<0,001$) csökkentette a spermaminták sejtkoncentrációját.

3.3.4. Mitokondriumok állapotának értékelése

Az intenzív MitoTracker Deep Red fluoreszcenciát mutató ondósejtek aránya felolvasztás utána a 3 éves korcsoport esetében 37,5-59,7%, az 5 éves korcsoportban 44,4-49,7% és a 7 éves

korcsoportban 45,8-49,8% volt, swim-up kezelés után a megfelelő értékek 33,3-78,6%, 78,2-78,8%, illetve 72,3-83,9% voltak. A korcsoportokon belüli, bikák közötti különbségek csak a 3 éves korcsoportban, swim-up kezelést követően voltak szignifikánsak ($p<0,05$). A mélyhűtés-felolvasztást követően az egyes korcsoportok között nem volt szignifikáns az eltérés, swim-up után azonban a 7 éves korcsoport esetében szignifikánsan javult a mitokondriális működés a 3 éves korcsoporthoz képest ($p<0,05$). Hasonló, nem szignifikáns tendencia volt látható az 5 éves korcsoport esetében is a 3 éveshez viszonyítva ($p=0,06$). A swim-up kezelés hatására az egyes korcsoportokon belül minden esetben szignifikánsan emelkedett az intenzív MitoTracker Deep Red fluoreszcenciát mutató spermiumok aránya (a 3 éves korcsoport esetében $p<0,05$, az 5 és 7 éves korcsoportok esetében $p<0,001$).

3.3.5. A motilitási eredmények és a mitokondriális állapot (MMP) kapcsolata

A motilitás és a MMP között szignifikáns ($p<0,01$) pozitív kapcsolat állt fenn minden felolvasztást, minden a swim-up kezelést követően, előbbi esetben minden a szubjektív motilitásbecslési, minden a CASA-eredmények, az utóbbi esetben csak a szubjektív motilitási eredmények tekintetében.

3.3.6. Kapcsolat a fertilitási eredményekkel

A 60-napos Non-Return Rate eredmények (bikánként 2-4 ejakulátum; 141-392 inszemináció) 52,2-76,0% között mozogtak, két bika esetében volt szignifikáns ($p<0,05$) eltérés az egyes ejakulátumok között. A mitokondriális membránpotenciál-mérések eredményei és a termékenyítési eredmények között nem találtunk szignifikáns korrelációt.

3.4. Magas környezeti hőmérséklet hatása halspermiumok plazmamembrán-integritására és mitokondriális aktivitására

A plazmamembrán-integritás esetében nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes időpontok, illetve inkubációs hőmérsékleti értékek esetében sem, az intakt plazmamembránnal bíró ondósejtek százalékos aránya mindenkorban 99% körülbelül értéket mutatott.

A mitokondriális aktivitás vizsgálata során a MitoTracker Deep Red FM hisztogramok MFI-értéke a 10 perces inkubációs idő elteltével a 40 °C-on inkubált spermiumok esetében emelkedett, a többi hőmérséklet mellett nem tért el jelentősen (MFI: 285, 287, 275 és 364 a 20, 25, 30 és 40 °C-os inkubáció mellett). 30 perc inkubációt követően a 30, illetve 40 °C-on inkubált minták esetében jelentős fluoreszcenciaintenzitási csökkenést tapasztaltunk (MFI: 262,

296, 151 és 160 a 20, 25, 30 és 40 °C- os inkubáció mellett). A Kolmogorov-Smirnov teszt minden esetben szignifikáns ($p<0,001$) különbséget mutatott ki a MitoTracker Deep Red FM hisztogramok profiljában a kontrollnak tekintett, 20 °C-on 10 percig inkubált spermamintához képest.

3.5. Spermium-kromatinszerkezet és morfológia: kapcsolat a fertilitással

Az egyes fertilitási mutatók között szignifikáns korrelációt találtunk, ami azt jelezte, hogy a NRR% alapján végrehajtott, szub- és normális fertilitású csoportkialakítás megfelelő volt, mivel az NRR% szorosan korrelált a CR%-kal. A fertilitással a spermatológiai paraméterek közül a normális morfológiájú spermiumok aránya mutatta a legszorosabb korrelációt, és ez volt az egyetlen olyan paraméter, amely a többi fertilitási mutatóval szignifikáns (de csak közepes) pozitív korrelációt mutatott. Hasonlóan gyenge, de szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a major spermiumdefektusok aránya és a NRR-index, illetve a HIGR és a CR% között. A DNS-fragmentáció mértéke (DF%) szignifikáns negatív korrelációt mutatott a normális morfológiájú ondósejtek arányával, a fertilitási mutatókkal azonban nem. A mitotikus rendellenességet mutató, és a transzlokációhordozó egyedeknél magasabb HIGR értéket mértünk a többi egyedhez képest.

A Mann-Whitney U-teszt szerint szignifikáns ($p<0,05$) különbség volt a két bikacsoport között a normális morfológiájú spermiumok aránya, a major spermiumdefektusok aránya és a HIGR érték esetében.

Az egyes spermatológiai tesztek fertilitás tekintetében fennálló diagnosztikai értékét ROC analízis alkalmazásával vizsgáltuk. A görbe alatti terület (Area Under the Curve, AUC) azt mutatja meg, hogy az adott teszt mennyire alkalmas két populáció (esetünkben a fertilis és szubfertilis bikák) diszkriminációjára. A 0,6 alatti AUC érték azt mutatja, az adott teszt nem képes diszkriminációra. A jelen vizsgálatban az SCSA egyik paramétere sem volt képes a két bikapopuláció elkülönítésére, csak a morfológiailag normális és a major defektust mutató spermiumok aránya mutatott statisztikailag szignifikáns diszkriminációt a fertilis és szubfertilis bikák között. Következő lépésként Youden index alkalmazásával kiszámítottuk a fertilis és szubfertilis bikák megkülönböztetésére használható küszöbértékeket: a normális morfológiájú spermiumok aránya esetében 89%, míg a major defektusok aránya esetében 6% volt az optimális küszöbérték.

3.6. Alternatív DNS-károsodási tesztek összehasonlítása: TUNEL és Nicoletti-teszt

A TUNEL teszt jelentősen magasabb DNS-fragmentációs arányt jelzett, mint a Nicoletti teszt ($\text{átlag} \pm \text{SD}$: $30,77 \pm 13,03\%$, illetve $1,93 \pm 0,89\%$). A két módszer között a Bland-Altman próba szerint nagymértékű eltérés volt: a méréspárok közötti különbség átlaga -28,84% volt.

3.7. Tenyészbikák gyors citogenetikai szűrővizsgálata spermiumok DNS-tartalmának flow citométeres hisztogramanalízisével

3.7.1. Első vizsgálat

A Kolmogorov-Smirnov teszt szignifikáns ($p < 0,05$) különbségeket tárt fel az egyes bikák, sőt, ugyanazon egyedek egyes ismételt mérései között a 2. bika kivételével, ahol az ismételt mérések között nem volt szignifikáns eltérés. Mivel azonban több szerző szerint is a Kolmogorov-Smirnov teszt túlerzékeny (Parikh és mtsai, 1999, Lampariello, 2000), nem tekintettük ezt az adatelemzési megközelítés hibájának.

A Dmax értékek normális eloszlást mutattak ($p > 0,2$, Lilliefors test), a leíró statisztikai eredmények a következők voltak: számtani átlag: 0,087; SD: 0,037; variancia: 0,001; minimum: 0,018; maximum: 0,155. A számított Dmax küszöbérték 0,161 (átlag + 2SD).

3.7.2. Második vizsgálat

A hordozó egyedek hisztogramprofiljai szignifikánsan ($p < 0,01$) eltértek a kontroll bika profiljától, és a Dmax értékek a következők voltak: A - B: 0,245; A - C: 0,128; A - D: 0,416; A - E: 0,166.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

4.1. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán-stabilitásának értékelése Merocianin 540/Yo-PRO 1/Hoechst 33342 fluoreszcens festékkombinációval

A jelen vizsgálat fő célja annak megállapítása volt, hogy az alkalmazott hármas fluoreszcens festékkombináció (Merocianin 540/Yo-PRO 1/Hoechst 33342) mennyire alkalmazható a mélyhűtött-felolvasztott bikasperma korai membránváltozásainak detektálására. A flow citométeres mérései eredményeket más, konvencionális spermiumminőség-ellenőrzési módszerek eredményeivel vetettük össze. A fentiek mellett megvizsgáltuk a tenyészállatok korának, illetve a swim-up előkezelésnek a spermaminőségre gyakorolt hatásait is. Eredményeink azt mutatták, hogy az élő, stabil plazmamembránnal bíró ondósejtek flow citométeres mérésekkel megállapított aránya szignifikáns összefüggést mutat a motilitással, a normális feji morfológiát mutató spermiumok arányával, illetve a plazmamembrán-integritással, ami az új festékkombináció megbízható voltát jelzi. Hasonló összefüggést találtak Januskauskas és mtsai (2005) a kapacitáció-szerű membránváltozások és a konvencionális spermatológiai vizsgálatok eredményei között.

Közismert, hogy a mélyhűtéssel folyamata a spermiumok plazmamembránjában a fiziológiai kapacitációhoz hasonló változásokat eredményezhet (Cormier és mtsai, 1997; Watson, 1995), de a folyamat más szabályozó mechanizmusok irányítása alatt áll (Cormier és Bailey, 2003). A kapacitáció során a spermiumok plazmamembránja erősen polarizálódik, és dinamikus átrendeződésen esik át. A Merocianin 540 fluoreszcens festék, amelyet Harrison és mtsai (1996) alkalmaztak először spermiumok értékelésére, olyan plazmamembrán-változásokat jelez, amelyek a membrán lipidszerkezeti átrendeződésének, destabilizálódásának eredményei (Gadella és Harrison, 2000). Ezen membránváltozások vizsgálata a mélyhűtött-felolvasztott spermaminták minőségellenőrzése során azért fontos, mert amennyiben túl korán mennek végbe, az adott sejt élettartama megrövidül (Watson, 1995), csökkentve a sikeres megtermékenyülés esélyét (Januskauskas és mtsai, 2000; Thundathil és mtsai, 1999), mivel a fertilizáció helyét kevesebb spermium éri el. Ebből következik, hogy az adott termékenyítő adagban található élő, stabil plazmamembrán-szerkezzel bíró spermiumok aránya fontos minőségi mutató lehet. Bár a fiziológiai körülmények között végbemenő kapacitáció és a mélyhűtés-felolvasztás okozta membránváltozások („kriokapacitáció”, Pommer és mtsai, 2003) hasonlósága továbbra is vitatott, egyre több bizonyíték gyűlik össze amellett, hogy bár a

krioprezerváció okozta membrán-destabilizáció nem azonos a kapacitációs folyamatokkal, sok tekintetben hasonlóak (Green és Watson, 2001; Guthrie és Welch, 2005).

Az általunk vizsgált bikapopuláció esetében az élő, stabil membránnal bíró („nem kapacitálódott”) spermiumok aránya $53,1 \pm 9,7\%$ volt, ami hasonló, vagy éppen magasabb is, mint más hasonló vizsgálatokban (Thundathil és mtsai, 1999; Januskauskas és mtsai, 2005). Ezt a spermiumpopulációt tovább teszteltük swim-up kezelést követően is. A petevezető (a fiziológiai kapacitáció helyszíne) elektrolitviszonyait heparint tartalmazó közeg, Fert-TALP alkalmazásával modelleztük. A szarvasmarha petevezetőjében a heparin és a heparinnal rokon egyéb glükózamino-glikánok az *in vivo* kapacitáció kiváltói (Parrish és mtsai, 2001). Ahogy várható volt, a magas M540 fluoreszcencia-intenzitást mutató, élő (ép, de destabilizálódott membránnal bíró, feltehetően a kapacitáció korai stádiumába kerülő) spermiumok aránya nőtt a swim-up kezelést követően a felolvasztás utáni állapothoz képest $1,1 \pm 0,9\%$ -ról $5,9 \pm 6,6\%$ -ra ($p < 0,01$) amellett, hogy az élő spermiumpopuláció aránya is nőtt. Az, hogy a felolvasztást követően alacsonyabb volt a destabilizálódott élő sejtek aránya, mint a heparin-kezelést követően, azt támasztja alá, hogy a fiziológiai kapacitáció és a „kriokapacitáció” valójában eltérő élettani folyamatok (Guthrie és Welch, 2005).

A Merocianin 540 alkalmazásával detektált membrán-destabilizáció kisebb mértékben emelkedett a swim-up kezelés során, mint egy korábbi vizsgálatban (36%), ahol klór-tetraciklin (CTC) tesztet alkalmaztak (Thundathil és mtsai, 1999). Az eltérés magyarázatához fontos szem előtt tartani, hogy a két teszt eltérő pontjait jelzi a kapacitáció folyamatának. Az M-540 által detektált foszfolipid-aszimmetriaváltozások a kapacitáció korai stádiumára jellemzők és fő kiváltójuk a bikarbonát, a CTC-teszt viszont a kapacitáció kései stádiumát, illetve az akroszóma exocitózisát jelzi, amely folyamatokat az intracelluláris Ca^{2+} -szint változása váltja ki (Gadella és Harrison, 2000; Rathi és mtsai, 2001; Rodriguez-Martinez és mtsai, 2001). A mintegy 30% elhalt sejt jelenléte a mintákban swim-up kezelés után a fluorescens jelöléshez és a flow citometeres mérésekhez szükséges idő hosszával (15-20 perc) magyarázható, mivel ez idő alatt a sejtek CO_2 -kiegészítést nem kaptak, a mérések pedig szobahőmérsékleten történtek (bár a mérés előtti utolsó pillanatig testhőmérsékleten tároltuk őket). Ilyen körülmények között várható a spermiumok egy részének spontán akroszomasérülése és halála (Gadella és Harrison, 2000).

Mivel a swim-up kezelés során a spermiumoknak aktív mozgásra képeseknek kell lenniük, várható volt a kezelés során a flagelláris rendellenességek csökkenése és a motilitási paraméterek növekedése. Ezt láttuk a CASA által rögzített VAP-értékek esetében is, és a jelen eredmények hasonlóak a korábbi vizsgálataink eredményeivel (Hallap és mtsai, 2004). A

mozgás linearitásának egyidejű csökkenése megfelel a hiperaktív motilitási mintázatnak, ami a kapacitáció velejárója. A hiperaktív motilitást mutató spermiumok mozgása kevésbé lineáris és progresszív, viszont sokkal intenzívebb, nagyobb amplitúdóval (Yanagimachi, 1994). Nem szabad figyelmen kívül hagyni azonban, hogy a kapacitáció és a hiperaktív motilitás – különösen *in vitro* körülmények között – egymástól függetlenül is kialakulhat (Ho és mtsai, 2002). A swim-up kezelés mindezek mellett javította az élő spermiumok arányát is, hasonlóan korábbi vizsgálatok eredményeihez (Shamshuddin és Rodriguez-Martinez, 1994).

Az egyes bika korcsoportok összehasonlítása során az egyetlen olyan spermaminőségi paraméter, amely mind mélyhűtés-felolvasztás után, mind a swim-up kezelést követően szignifikáns eltérést mutatott, a membránintegritás volt, ami megegyezett Hallap és mtsai (2004) korábbi eredményeivel. A többi paramétert tekintve vagy a mélyhűtés után vizsgált minták között volt szignifikáns eltérés (destabilizálódott membránnal bíró spermiumok), vagy a swim-up kezelést követően (motilitás). Az első esetre a magyarázatunk az, hogy ez a paraméter valószínűleg nem korfüggő a spermiumok azon alpopulációján belül, amelyek képesek elérni a fertilizáció helyszínét; abban az esetben, amikor az eltérések csak a swim-up kezelést követően jelentkeznek, feltételezhető, hogy a felolvasztott mintában lévő sok, eltérő fisiológiai állapotban lévő spermium miatt a szórások nagyok, elfedve a termékenyítésre képes spermium szubpopuláció korfüggő eltéréseit.

A morfológiai rendellenességek közül legnagyobb arányban az akroszómasérülések voltak észlelhetők, ami inkább a sperma feldolgozása során alakul ki, és nincs szoros kapcsolata a fertilitással (Rodriguez-Martinez és mtsai, 1997), a többi morfológiai rendellenesség aránya messze alatta maradt a mesterséges termékenyítésre használt spermaminták esetében elfogadható küszöbértéknek.

Összefoglalásul, a Merocianin 540/Yo-PRO 1/Hoechst 33342 hármas fluoreszcens festékkombinációja flow citometriával értékelve alkalmas módszer a mélyhűtött-felolvasztott, élő bikaspermiumok membránstabilitásának értékelésére. A plazmamembrán stabilitása szignifikáns korrelációt mutatott több konvencionálisan alkalmazott spermatológiai teszttel, mint a motilitás, a spermiumok feji morfológiájának értékelése és a membránintegritás. A swim-up kezelés lehetővé tette annak értékelését, hogy az élő, stabil membránnal bíró spermium alpopuláció milyen mértékben képes kapacitálódásra. A swim-up kezelés alternatív módszer lehet a rutin spermavizsgálati paraméterek tekintetében meglehetősen homogén bikapopulációk egyedei közötti fertilitási rangsor megállapításában.

4.2. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok plazmamembrán- és akroszóma-integritásának változásai multikolor flow citometria alkalmazásával értékelve

A jelen vizsgálatban alkalmazott multikolor flow citométeres sejtanalitikai megközelítés lehetővé tette, hogy részletesebb bepillantást nyerjünk a plazmamembrán és az akroszóma integritásának dinamikus változásaiba. Az értékelt események nagy számának köszönhetően tanulmányozhattuk a mélyhűtött-felolvasztott bikaspermában jellemzően kis arányú (általában kevesebb, mint 10%-ban jelen lévő) haldokló spermiumok akroszóma-integritását.

A négyórás inkubáció során végbemenő membránváltozások rekonstruálása alapján arra következtethetünk, hogy felolvasztást követően az összes haldokló spermiumnak intakt az akroszómája, de az inkubáció során nő az akroszóma-deteriorációt követően elhaló sejtek aránya.

A mélyhűtött-felolvasztott spermiumok úgy viselkednek, mint a kapacitáción átesett ondósejtek (Holt, 2000b); újabb eredmények szerint a hűtés-felolvasztás hatása inkább úgy értelmezhető, hogy a spermiumok „átlépik”, kihagyják a kapacitációt (Green és Watson, 2001). A jelen vizsgálat során nem távolítottuk el a spermahígítót az inkubáció során, ami maga is kapacitációs ágensként viselkedhet (den Daas, 1997), és a kapacitációs állapotot nem mértük direkt módon, az általunk használt földimogyoró agglutinin az akroszóma exocitózisának legkorábbi stádiumát detektálja, amint a plazmamembrán és az akroszóma membránja közötti fúziós pórusok megjelennek (Gadella és Harrison, 2000).

A jelen fejezetben bemutatott flow citométeres teszt a hőtűrő próba precíz eszköze lehet, köszönhetően az értékelt sejtek nagy számának. A korábbi vizsgálatokban (Saacke és White, 1972; den Daas, 1997) mikroszkópos sejtértékelési módszereket alkalmaztak mintánként 200 – 200 spermiumot értékelve, ellentétben a jelen tanulmányban értékelt mintánkénti 10 000 sejttel. Az általunk kidolgozott fluoreszcens teszt nem igényel speciális minta-előkészítési lépeseket, standard asztali flow citométerrel (kék lézer, zöld, narancssárga és vörös fluoreszcens detektorok) értékelhető, tehát elég egyszerű ahhoz, hogy akár a mesterséges termékenyítő állomások rutin laboratóriumi munkarendjébe illeszthető legyen. A teszt hasznos lehet továbbá új mélyhűtési technikák kidolgozásában is a nekrózis és akroszóma-exocitózis lépéseihez gyors és precíz követésével. További, nagyobb mintaszámmal végrehajtott kísérletek szükségesek azonban a teszt prediktív értékének megállapítására a fertilitás szempontjából, illetve a szub- és infertilitás küszöbértékeinek meghatározására.

4.3. Mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok mitokondriális aktivitásának értékeléses MitoTracker Deep Red 633 festés és flow citometria alkalmazásával

A jelen vizsgálat célja az volt, hogy értékeljük a MitoTracker Deep Red 633 (M-22426) fluoreszcens festék alkalmazhatóságát mélyhűtött-felolvasztott bikaspermiumok mitokondriális membránpotenciáljának flow citométeres értékelésére. Az eredményeket összevetettük konvencionális szubjektív motilitásbecsléssel, illetve számítógépes motilitásvizsgálattal is. A vizsgálatot swim-up spermakezelés után is elvégeztük.

A flow citométeres mitokondriális membránpotenciál-mérési eredmények átlagosan 10 – 15%-kal alacsonyabb értéket mutattak, mint a szubjektív vagy számítógépes motilitásvizsgálatok. Hasonló különbségeket publikáltak más mitokondriális próbák alkalmazásával (Garner és mtsai, 1997; Gravance és mtsai, 2000; Wu és mtsai, 2003). Az eltérés magyarázatául korábban elsősorban az emberi hibát említették a szubjektív motilitásbecslés kapcsán (Garner és mtsai, 1997; Gravance és mtsai, 2000). Tekintve azonban, hogy a számítógépes motilitásvizsgálat – elvileg – precízebb a szubjektív értékelésnél, hasonló eltérést nem vártunk a motilitás és a flow citometria eredményei között – ennek magyarázatául további vizsgálatok szükségesek.

Mind a motilitásvizsgálatok, mind a flow citométeres mérések kimutatták, hogy a swim-up kezelés hatására megnő az intenzív motilitást, illetve magas mitokondriális aktivitást mutató spermiumok aránya a termékenyítő adagban. A MitoTracker Deep Red 633 (M-22426) festéket elsőként alkalmaztuk bikaspermiumok értékelésére, és véleményünk szerint objektív alternatívája a szubjektív vagy számítógépes motilitásvizsgálatoknak, tekintve, hogy mintánként több ezer sejt értékelhető rövid idő alatt.

4.4. Magas környezeti hőmérséklet hatása halspermiumok plazmamembrán-integritására és mitokondriális aktivitására

A frissen gyűjtött halsperma közel 100%-os plazmamembrán-integritását korábbi vizsgálatainkban is tapasztaltuk (Nagy és mtsai, 2013a), és hasonlóan magas elősejt-arány tapasztalható más fajok esetében is (ponty - Horváth és mtsai, 2010; csíkos sügér – Guthrie és mtsai, 2008, 2011; zebradánió – Hagedorn és mtsai, 2009). A plazmamembrán sérülése a nekrotikus sejthalál folyamatának késői végpontja, a jelen kísérlet során 30 percig 40 °C-on inkubált sejtek esetében sem csökkent az intakt sejtek aránya az aktiválatlan spermamintákban. A mitokondriumok membránpotenciál-változásai arra engednek következtetni, hogy a jelen kísérletben alkalmazott inkubációs idő- és hőmérsékletértékek mellett a plazmamembrán-integritással ellentétben a spermiumok szubletális károsodásokat szenvednek, amelyeket a

konvencionális vitális festési eljárásokkal nem detektálhatunk. Ez legmarkánsabban a 40 °C-on inkubált sejtek esetében észlelhető, ahol a szobahőmérsékleten inkubált spermiumokhoz képest a 10 percig inkubált sejtek mitokondriumai hiperpolarizálódnak, majd a 30 perces inkubáció végén észlelt MFI-csökkenés a mitokondriális membrán depolarizációjára utal. Kevésbé markánsan, de hasonló tendencia volt tapasztalható a 30 °C-on inkubált spermiumok esetében is. A kapott eredményeket biológiai szempontból relevánsnak tartjuk, amit alátámaszt a Kolmogorov-Smirnov teszt eredménye is, amely szerint az időpontokban és hőmérsékleti értékeken kapott MitoTracker Deep Red hisztogramok profiljai minden esetben szignifikánsan eltérnek a kontrollnak tekintett, szobahőmérsékleten 10 percig inkubált ondósejtek hisztogramprofiljától. A spermiumok mitokondriumainak károsodásai egy sor további intracelluláris degeneratív folyamat kiváltói lehetnek. Az aktiválatlan halspermiumok mitokondriumainak fő szerepe a sejten belüli ATP-szint fenntartása egy sor más homeosztatikus szerep mellett. Az aktivációt követően a spermiumok a tárolt ATP-t használják fel, nem a mitokondriumok által *de novo* előállított ATP-t, az aktivációval egyidejűleg nem tapasztalható az oxidatív foszforiláció emelkedése (Ingermann, 2008). Hasonló tapasztalható azon emlősfajok esetében is, amelyeknek spermiumai kevés mitokondriumot tartalmaznak (pl. ember – kb. 10-15 mitokondrium sejtenként): a motilitáshoz szükséges ATP-szintézis elsősorban glikolízis útján történik, a mitokondriumok ATP-termelése elsősorban a plazmamembrán-homeosztázis fenntartásához szükséges (Cummins, 2009). Az ezüstkárász spermiumai 10 mitokondriumot tartalmaznak sejtenként (Jamieson, 1991), az aktív motilitásban betöltött szerepük tehát hasonlóan a humán spermiumokhoz limitáltnak tekinthető. A sérült mitokondriumok azonban a sejten belüli oxidatív károsodások fő forrásai – a sérült, fragmentált mitokondriumokból kiszabaduló reaktív oxigénszármazékok (ROS) lipid-peroxidációt és oxidatív DNS-károsodást, majd DNS-fragmentációt okozhatnak (Aitken és mtsai, 2010). Emellett a mitokondriumoknak fontos szerepe van az intracelluláris Ca^{2+} -homeosztázis fenntartásában is - a mitokondriumok membrán-depolarizációja pedig csökkent Ca^{2+} -beáramlást eredményez (Pizzo és mtsai, 2012). A Ca^{2+} -beáramlás, intracelluláris Ca^{2+} -szint emelkedés halspermiumok esetében az aktiváció fontos eleme (Inaba, 2008), emlős-spermiumok esetében pedig a kapacitációhoz szükséges (Hossain és mtsai, 2011).

Tekintve, hogy eredményeink szerint már akár 5 °C-os hőmérséklet emelkedés is hatással lehet a halspermiumok mitokondriumainak épségére, működésére, további vizsgálatainkban az extrém hőmérsékletnek kitett spermiumok intracelluláris Ca^{2+} -szintjének változásait és az oxidatív DNS-károsodások, illetve DNS-fragmentáció flow citometrikeres detektálását végezzük el. Emellett korábbi időparaméteres flow citometriára épülő vizsgálataink (Nagy és mtsai,

2013a, 2013b) metodikáját követve a különböző hőmérsékletű közegben lezajló spermiumaktiváció sejtélettani folyamatainak feltárása is célunk. Véleményünk szerint eredményeink hasznos adalékkal szolgálhatnak mind környezet- és természetvédelmi szempontból, mind a gyakorlatban halszaporítást végző szakemberek munkájának hatékonysága szempontjából.

4.5. Spermium-kromatinszerkezet és morfológia: kapcsolat a fertilitással

A jelen vizsgálatban olyan termékenyítő adagokat értékelünk, amelyek a mesterséges termékenyítő állomások rutin spermaértékelése során forgalomba hozhatónak bizonyultak. A vizsgálatba vont egyedek mintegy fele szubfertilisnek bizonyult (55% alatti NNR). Az egyetlen spermatológiai paraméter, amely mindenkor vizsgált fertilitási mutatóval szignifikáns korrelációt mutatott, a morfológiailag normális spermiumok aránya volt. A major spermiumdefektusok aránya csak a NR index esetében mutatott szignifikáns, negatív korrelációt. A spermiummorfológia és a mesterséges termékenyítés eredményessége közötti kapcsolat ismert, azonban ez a kapcsolat rendkívül változó, sokban függ az adott vizsgálatba bevont bikák számától, az adott laboratóriumtól és az ott alkalmazott vizsgálati módszerektől. Mesterséges termékenyítésre használt bikák esetében 10% spermiumfej-rendellenesség tekinthető küszöbértéknek (Al-Makhzoomi és mtsai, 2008), a fertilitás szempontjából a körtefű rendellenességet tekintve a legsúlyosabb abnormalitásnak. A jelen vizsgálat eredményei megerősítik ezt, és aláhúzzák a mesterséges termékenyítésre használt bikák rendszeres, rutinszerű spermiummorfológiai vizsgálatainak fontosságát, illetve olyan, alternatív tesztek alkalmazását, amelyekkel a spermiumfej morfológiai rendellenességei és a kromatinállomány defektusai közötti kapcsolat feltárható. A flow citometriával értékelhető SCSA az egyik ilyen szóba jövő teszt.

A jelen vizsgálat megerősítette azt a korábbi tanulmányt, amelyben 10% morfológiai rendellenesség bizonyult megfelelő küszöbértéknek a fertilitás szempontjából (Al-Makhzoomi és mtsai, 2008). Mindezek alapján továbbra is javasolható a klasszikus morfológiai vizsgálatok alkalmazása a mesterséges termékenyítő állomásokon, küszöbértékként a normális alakú ondósejtek minimum 90%-os arányát alkalmazva. A normális spermiumokat az egyes laboratóriumokban használt eltérő festési technikák, osztályozási módszerek ugyanúgy értékelik, tehát, ha erre a sejtcsoportra koncentrálunk, az javíthatja a különböző mesterséges termékenyítő állomások eredményeinek összevethetőségét.

A DNS-fragmentáció aránya szignifikáns, közepes negatív korrelációt mutatott ugyan a normális morfológiájú spermiumok arányával, azonban a fertilitási mutatók egyikével sem, ami az SCSA alacsony prognosztikai értékére utal. Egy másik SCSA paraméter, a HIGR azon bikák esetében volt a legmagasabb, amelyek esetében meiotikus zavarok vagy kromoszóma-rendellenességek álltak fenn. A magas zöld fluoreszcencia-intenzitás a nem teljes hiszton-protamin kicserélődés jele (Evenson és Jost, 2000), amelynek eredménye a spermiumkromatin tökéletlen kondenzációja. A HIGR érték hasznos lehet például annak eldöntésére, hogy az adott egyed esetében további citogenetikai vizsgálatok szükségesek, de a szubfertilitás prognosztizálására nem alkalmas. Kissé meglepő módon a normális fertilitású bikacsoport esetében szignifikánsan magasabb HIGR értéket mértünk, mint a szubfertilis csoportnál, azonban a normális csoport HIGR értékének mediánja 1% alatt volt, ami nem jelez biológiaileg szignifikáns eltérést a két csoport között.

A fentiek összefoglalva, a spermiummorphológiai vizsgálat a jövőben is a bikasperma rutin minőségellenőrzésének fontos eszköze lesz, különösen, ha a rutinszerű vizsgálatok a normális morfológiájú ondósejtek arányára koncentrálnak. A major spermiumdefektusok aránya valamelyest gyengébb, de szintén szignifikáns diszkriminatív paraméternek bizonyult, azonban a mesterséges termékenyítő állomások napi gyakorlatában való alkalmazását mégsem ajánljuk, mivel az eredmények értelmezése mélyebb spermatológiai ismereteket igényel, és az egyes laboratóriumok, értékelő személyek, alkalmazott mintapreparálási eljárások és osztályozási módszerek eltérései miatt az ismételhetősége gyengébb. A részletes morfológiai vizsgálatok szerepe akkor válik hangsúlyossá, ha az adott egyed a rutin vizsgálat során nem éri el a fentiekben meghatározott küszöbértéket, ekkor az előforduló rendellenességek vizsgálata hasznos információval szolgálhat a spermatogenezis zavarainak feltárássában. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni, hogy a vizsgálat megfelelő statisztikai erejének biztosítása érdekében mintánként több száz sejt értékelése szükséges.

Az SCSA paraméterek meglepően gyenge diagnosztikai értéket mutattak a fertilitás tekintetében. Bár a kromatinállomány állapota egyre nagyobb hangsúlyt kap mind a humán, mind az állatorvosi andrológiában, és számos alternatív teszt áll rendelkezésre, ezek mindegyikének megvannak a maga gyenge pontjai (Zini és Sigman, 2009). Az SCSA fő előnye a többi módszerhez képest, hogy egyidejűleg képes az egyes és kettős DNS-száltörések és a kromatinkondenzáció gyors értékelésére nagyszámú spermiumon. Az SCSA (ill. más hasonló módszerek) és a fertilitás kapcsolatát vizsgáló tanulmányok eredményei meglehetősen ellentmondóak. Egyes emlősfajok esetében hasznosnak tűnnék (pl. szarvasmarha: Ballachey és mtsai, 1987; Puglisi és mtsai, 2012; Karoui és mtsai, 2012), míg más fajok esetében, mint pl. a

sertés, az eredmények kevésbé meggyőzőek (Waberski és mtsai, 2011), bár Broekhuijse és mtsai (2012) eredményi szerint a kanspermiumok DNS-károsodásai befolyással vannak az alomszámra és a fialási arányra. Collins és mtsai (2008) humán andrológiai vizsgálataiban a DNS-integritási tesztek alacsony diagnosztikai értéket mutattak. A saját korábbi, mesterséges termékenyítésre használt bikákon végzett vizsgálataink sem mutattak szoros kapcsolatot az SCSA-eredmények és a fertilitás között (Hallap és mtsai, 2005).

Természetesen a szubfertilitás nem csupán a DNS-károsodások miatt alakulhat ki, és kicsi az esélye annak, hogy egy tulajdonságra fókuszáló spermatológiai tesztnek nagy prediktív értéke lehetne a fertilitás szempontjából (Amann és Hammerstedt, 1993; Graham, 2001). A spermiumkromatin károsodásait konvencionálisan nem kompenzálgatóan tekintjük (Evenson, 1999), mivel az ilyen rendellenességeket hordozó spermiumok képesek a petesejtbe való bejutásra és az embriogenezis elindítására, azonban az embrionális fejlődés abnormális lesz, sok esetben korai embrióelhalást eredményezve (Fatehi és mtsai, 2006). Egyre több információnk van azonban arról, hogy a petesejt képes a spermium DNS-károsodásainak bizonyos mértékig történő javítására (Olsen és mtsai, 2005; Barton és mtsai, 2007; Marchetti és mtsai, 2007; Hourcade és mtsai, 2010). Lehetséges, hogy egyes vizsgálatok során a DNS-károsodást értékelő tesztek a petesejt DNS-javító mechanizmusainak aktivitása miatt szerepeltek gyengén (hamis pozitív eredmények, azaz nagymértékű DNS-károsodás és elfogadható fertilitás esetén). Hamis negatív eredmény esetén, azaz ha az adott teszt szerint a spermium kromatinállománya nem károsodott, de a fertilitási eredmények gyengék, a háttérben más olyan okok is állhatnak, amelyeket a jelenleg alkalmazott tesztekkel nem tudunk kimutatni. Ilyen például a spermiumkromatin szuperkondenzációja (Rodriguez és mtsai, 1985): az ilyen kromatinnal rendelkező ondósejtek a termékenyítést követően nem képesek a petesejtben dekondenzálódni, és ez korai embrióelhalást eredményez.

A jelen vizsgálat fő eredménye az, hogy az SCSA teszt HIGR paramétere hasznos eszköz lehet a kvantitatív kromoszómarendellenességet (meiotikus zavarok, transzlokációk) hordozó tenyészbikák felismerésére. Azon egyedek esetében, amelyek magas HIGR értéket mutatnak, további, részletes citogenetikai vizsgálatok elvégzése szükséges. A spermiumkromatin kondenzációs zavarainak értékelésére további alternatív tesztek keresése is indokolt a legolcsóbb, de nagy prediktív értékkel bíró módszer kidolgozása érdekében. A klasszikus módszer a fénymikroszkóppal értékelhető Feulgen festés (Barth és Oko, 1989; Dobrinski és mtsai, 1994), de a nagyobb precizitás és gyorsaság érdekében az olyan flow citométeres módszerek fejlesztése indokolt, mint például a propidium-jodidos DNS-jelölés (Vicari és mtsai,

2002), amely diagnosztikai értékének megállapításához azonban további, fertilis és szubfertilis állatokon végzett vizsgálatok szükségesek.

4.6. Alternatív DNS-károsodási tesztek összehasonlítása: TUNEL és Nicoletti-teszt

A jelen vizsgálat célja a flow citometriára épülő TUNEL és Nicoletti tesztek összevetése volt ménspermiumok DNS-fragmentációjának detektálása szempontjából. Az eredményeink arra utalnak, hogy a két teszt az alkalmazott módszeregyezési próba szerint nagymértékben eltérő eredményt mutat. Mindkét módszer elvileg a DNS-fragmentáció arányát detektálja, azonban nem adnak azonos biológiai információt.

A TUNEL teszt az egyes és kettős DNS-száltörések 3'-OH végeit jelöli antitest és fluoreszcens festék segítségével. A száltörések azonban nem jelentenek minden esetben DNS-fragmentációt, és a TUNEL teszt nem alkalmas az egyes és kettős száltörések megkülönböztetésére (Ribeiro és mtsai, 2006). Az egyes száltörések kialakulása megelőzi a fragmentációt (Walker és mtsai, 1997; Iglesias-Guimarais és mtsai, 2013). Így a TUNEL teszt a DNS-degradációs folyamat korábbi állomását detektálja, a Nicoletti teszt a tényleges DNS-fragmentáció kimutatására alkalmas. Ez utóbbi tesztnél a DNS-t propidium-jodiddal jelöljük, amely nukleinsav-specifikus, interkaláló festék. Amennyiben a DNS fragmentálódott, töredézet, a festési eljárás során a fluoreszcens festékkel jelölt DNS-fragmentumok kijutnak a sejtből, amelynek az ép sejtekhez képest alacsonyabb fluorescencia intenzitása lesz (Riccardi és Nicoletti, 2006).

A két módszer eredményei közötti nagymértékű eltérés annak a valószínűségét is felveti, hogy valamelyik teszt esetleg a fragmentálódott DNS mellett nem specifikusan mást is jelöl a sejtekben/sejtekben. A minták fluoreszcens mikroszkópos ellenőrzése során azt észleltük, hogy a TUNEL kit Alexa Fluor 488 konjugátuma a spermiumok plazmamembránjához, illetve mitokondriumaihoz is kötődött, hamis TUNEL-pozitív jelet eredményezve. Más szerzők is beszámoltak hasonló hamis TUNEL-pozitív eredménnyről különböző sejttípusok esetében is, mint pl. máj- és vese sejtek (Stahelin és mtsai, 1998; Pulkkanen és mtsai, 2000). A TUNEL teszt érzékenységét és fajlagosságát több kritika is érte, továbbá a módszernek számos eltérő változatát is használják és nincsenek egyezményes iránymutatások a korrekt kivitelezésre és az eredmények értékelésére vonatkozóan (Perreault és mtsai, 2000). A citométeres mérések hamis pozitív eredményei arra hívják fel a figyelmet, hogy a citométer nem képes a fluoreszcens jel helyének lokalizálására (DNS vagy mitokondrium például), ezért minden flow citométeres kísérlet során kritikus fontosságú a fluoreszcens jelölések mikroszkópos ellenőrzése. A Nicoletti teszt viszont jóval egyszerűbb és gyorsabb, a vizsgálat során nem tapasztaltunk hamis

pozitív jelölést, diagnosztikai értékének megállapítására azonban a fertilitás tekintetében további vizsgálatok szükségesek.

4.7. Tenyészbikák gyors citogenetikai szűrővizsgálata spermiumok DNS-tartalmának flow citométeres hisztogramanalízisével

A C bika kivételével mindegyik hordozó egyed esetében magasabb Dmax értéket kaptunk, mint az 1. vizsgálat során megállapított küszöbérték. Mivel e bika esetében a transzlokáció a kisebb kromoszómákat (20. és 24.) érintette, valószínűleg a hiányzó, vagy extra DNS az érintett sejtekben túl kevés volt ahhoz, hogy detektálható legyen.

A flow citométeres citogenetikai gyorstesztnak véleményünk szerint több előnye is van: a fluoreszcens jelölő kit egyszerűen használható, nem igényel bonyolult minta-előkészítési lépéseket, és az egyszerű asztali flow citométerek standard optikai rendszerével értékelhető. A Kolmogorov-Smirnov opció a legtöbb flow citométeres adatelemző szoftverben elérhető, így nincs szükség további szoftverbeszerzésre. Az egyes apaállatok, sőt, egyes ejakulátumok is könnyen vizsgálhatók, a tesztet akkor is használhatjuk, ha a kérdéses állat nem érhető el (pl. spermaimport esetén). A javaslatunk az, hogy a teszt adaptálása esetén minden laboratórium állapítsa meg a saját állományára vonatkozó Dmax küszöbértéket a jelen tanulmányban ismertetett kísérlettervezési megközelítést alkalmazva, mivel a különböző gyártók flow citométerei nem feltétlenül azonos optikai paraméterekkel rendelkeznek, továbbá az egyes szarvasmarha fajták eltérő hisztogramprofilokat mutathatnak (például az Y-kromoszóma polimorfizmusai miatt). A teszt illeszthető az olyan, mesterséges termékenyítő állomásokon működő rutin spermalaboratóriumok munkarendjébe, ahol a flow citometriát már alkalmazzák, a vizsgálatot pedig elegendő a bika élete során egyszer elvégezni.

ÖSSZEFOGLALÁS

Vizsgálataim eredményei alapján megállapítottam, hogy a flow citometriára épülő spermatózis analízis hasznos eleme lehet a szaporodásbiológiai kutatólaboratóriumoknak, és a mesterséges termékenyítő állomások rutinszerű, napi spermabírálati rendszerébe is illeszthető.

Kidolgoztam egy új fluoreszcens festékkombinációt a korai membránváltozások (plazmamembrán-destabilizáció) detektálására (Hallap és mtsai, 2006); a spermiumok mitokondriális membránpotenciál-változásainak (a mitokondriumok aktivitásának) mérésére (Hallap és mtsai, 2005a). Egy általunk korábban kifejlesztett hármas fluoreszcens festékkombináció alkalmazásával (amely egyidejűleg jelzi a plazmamembrán és az akroszóma integritását, sérüléseit, Nagy és mtsai, 2003) felderítettem a mélyhütést, felolvasztást és inszeminációt követő időszakban végbemenő membránváltozások kinetikáját, a plazmamembrán és az akroszóma deteriorációjának időbeli sorrendjét (Nagy és mtsai, 2004). Megállapítottam, hogy a tenyészbikák kromatinintegritása nem változik az életkor előrehaladtával (Hallap és mtsai, 2005b). A humán andrológia területén standard laboratóriumi technikának tekintett Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) azonban nem bizonyult alkalmasnak a fertilis és szubfertilis tenyészbikák megkülönböztetésére (Nagy és mtsai, 2013). Az SCSA analízis során a DNS fragmentációja mellett értékelhető a spermiumkromatin kondenzáltsági állapota is, amely citogenetikai terheltséget hordozó bikákon végzett vizsgálataink (Révay és mtsai, 2009) szerint alkalmas lehet a spermiumokból történő gyors citogenetikai szűrővizsgálatok elvégzésére (Nagy és mtsai, 2013).

Kidolgoztam egy olyan fluoreszcens kontrasztfestési technikát, amellyel az ondósejtek plazmamembránjának integritása értékelhető úgy, hogy a flow citométeres alkalmazások során a korábbi technikáktól eltérően az élő és elhalt sejtek detektálása azonos detektorral történhet, így a többi detektor szabadon alkalmazható más fluoreszcens próbák jeleinek rögzítésére. Ezen technika alkalmazásával megnyílik a lehetőség olyan multiparaméteres flow citométeres spermatózis tesztek kidolgozására, amelyek egyidejűleg több domén állapotának értékelésére alkalmasak, emellett az élő/elhalt állapot egyidejű értékelése fontos kiegészítője lehet más sejtélettani vizsgálatoknak is, mint például a mitokondriális aktivitás, vagy a kromatinállapot felmérése. A jelenleg folyó és jövőben tervezett kutatásaim egyik fő irányvonala a multiparaméteres spermatózis tesztek továbbfejlesztése, az új tesztek fertilitásra vonatkozó diagnosztikai-prognosztikai értékének megállapítása.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Az általam kidolgozott fluoreszcens plazmamembrán- és akroszóma-integritási teszt nem igényel speciális minta-előkészítési lépéseket, standard asztali flow citométerrel (kék lézer, zöld, narancssárga és vörös fluoreszcens detektorok) értékelhető, tehát elég egyszerű ahhoz, hogy akár a mesterséges termékenyítő állomások rutin laboratóriumi munkarendjébe illeszthető legyen. A teszt hasznos lehet továbbá új mélyhűtési technikák kidolgozásában is a nekrózis és akroszóma-exocitózis lépéseinél gyors és precíz követésével.
2. A spermiummorphológiai vizsgálat a jövőben is a bikasperma rutin minőségellenőrzésének fontos eszköze lesz, különösen, ha a rutinszerű vizsgálatok a normális morfológiájú ondósejtek arányára koncentrálnak. A major spermiumdefektusok aránya valamelyest gyengébb, de szintén szignifikáns diszkriminatív paraméternek bizonyult, azonban a mesterséges termékenyítő állomások napi gyakorlatában való alkalmazását mégsem ajánlom, mivel az eredmények értelmezése mélyebb spermatológiai ismereteket igényel, és az egyes laboratóriumok, értékelő személyek, alkalmazott mintapreparálási eljárások és osztályozási módszerek eltérései miatt az ismételhetősége gyengébb. A részletes morfológiai vizsgálatok szerepe akkor válik hangsúlyossá, ha az adott egyed a rutin vizsgálat során nem éri el a fentiekben meghatározott küszöbértéket, ekkor az előforduló rendellenességek vizsgálata hasznos információval szolgálhat a spermatogenezis zavarainak feltárásában. Nem szabad azonban figyelmen kívül hagyni, hogy a vizsgálat megfelelő statisztikai erejének biztosítása érdekében mintánként több száz sejt értékelése szükséges. Az SCSA paraméterek meglepően gyenge diagnosztikai értéket mutattak a fertilitás tekintetében. Az SCSA teszt HIGR paramétere azonban hasznos eszköz lehet a kvantitatív kromoszóma rendellenességet (meiotikus zavarok, transzlokációk) hordozó tenyésbikák felismerésére. Azon egyedek esetében, amelyek magas HIGR értéket mutatnak, további, részletes citogenetikai vizsgálatok elvégzése szükséges.
3. Az általam kidolgozott flow citométeres citogenetikai gyorsteszttel felismerhetők a kromoszóma traszlokációt heterozigóta formában hordozó és a diploid spermiumokat termelő bikák. A fluoreszcens jelölő kit egyszerűen használható, nem igényel bonyolult minta-előkészítési lépéseket, és az egyszerű asztali flow citométerek standard optikai rendszerével értékelhető. A Kolmogorov-Smirnov opció a legtöbb flow citométeres

adatelemző szoftverben elérhető, így nincs szükség további szoftverbeszerzésre. Az egyes apaállatok, sőt, egyes ejakulátumok is könnyen vizsgálhatók, és a tesztet akkor is használhatjuk, ha a kérdéses állat nem érhető el. A teszt illeszthető az olyan, mesterséges termékenyítő állomásokon működő rutin spermalaboratóriumok munkarendjébe, ahol a flow citometriát már alkalmazzák, és a vizsgálatot elegendő a bika élete során egyszer elvégezni.

4. A TUNEL-teszttel végzett DNS-károsodási mérések hamis pozitív eredményei arra hívják fel a figyelmet, hogy a citométer nem képes a fluoreszcens jel helyének (DNS vagy mitokondrium például) lokalizálására, ezért minden flow citométeres kísérlet során kritikus fontosságú a fluoreszcens jelölések mikroszkópos ellenőrzése. A Nicoletti teszt viszont jóval egyszerűbb és gyorsabb, a vizsgálat során nem tapasztaltam hamis pozitív jelölést, diagnosztikai értékének megállapítására azonban a fertilitás tekintetében további vizsgálatok szükségesek.
5. A Merocianin 540/Yo-PRO 1/Hoechst 33342 hármas fluoreszcens festékkombinációja flow citometriával értékelve alkalmas módszer a mélyhűtött-felolvásztott, élő bikaspermiumok membránstabilitásának értékelésére. A plazmamembrán stabilitása szignifikáns korrelációt mutatott több konvencionálisan alkalmazott spermatológiai teszttel, mint a motilitás, a spermiumok feji morfológiájának értékelése és a membránintegritás. A swim-up kezelés lehetővé tette annak értékelését, hogy az élő, stabil membránnal bíró spermium alpopuláció milyen mértékben képes kapacitálódásra. A swim-up kezelés alternatív módszer lehet a rutin spermavizsgálati paraméterek tekintetében meglehetősen homogén bikapopulációk egyedei közötti fertilitási rangsor megállapításában.
6. Mind a motilitásvizsgálatok, mind a flow citométeres mérések kimutatták, hogy a swim-up kezelés hatására megnő az intenzív motilitást, illetve magas mitokondriális aktivitást mutató spermiumok aránya a termékenyítő adagban. A MitoTracker Deep Red 633 (M-22426) festéket elsőként alkalmaztam bikaspermiumok értékelésére, és véleményem szerint megfelelő teszt flow citométerrel rendelkező rutin spermavizsgáló laboratóriumokban, tekintve, hogy mintánként több ezer sejtet értékel rövid idő alatt, így objektív alternatívája a szubjektív vagy számítógépes motilitásvizsgálatoknak.
7. Eredményeim szerint már akár 5 °C-os hőmérséklet emelkedés is hatással lehet a halspermiumok mitokondriumainak épségére, működésére. A mitokondriumok membránpotenciál-változásai arra engednek következtetni, hogy a jelen kísérletben

alkalmazott inkubációs idő- és hőmérséklet értékek mellett a plazmamembrán-integritással ellentétben a spermiumok szubletális károsodásokat szenvednek, amelyek a konvencionális vitális festési eljárásokkal nem detektálhatók.

IRODALOM

- Acharyya S, Kanjilal S, Bhattacharyya AK Does human sperm nuclear DNA integrity affect embryo quality? *Indian J. Exp. Biol.* 2005 43, 1016-1022.
- Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 1999 284, 696-704.
- Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod.* 2010 25(10):2415-26.
- Al-Makhzoomi A, Lundeheim N, Haard M, Rodriguez-Martinez H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology* 2008 70:682-91.
- Amann RP. Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. *Theriogenology*. 2005 63(3):698-715.
- Amann RP, Hammerstedt RH. In-vitro evaluation of sperm quality - an opinion. *J Androl* 1993 14:397-406.
- Amann RP, DeJarnette, JM. Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: a paradigm shift. *Theriogenology* 2012 77, 795-817.
- Andersson M, Aalto J, Gustavsson I. Embryo quality and andrological study of two subfertile bulls versus five control bulls with normal fertility. *Theriogenology* 1992 38, 623-631.
- Auger J. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? *Asian J Androl* 2010 12:36-46.
- Austin CR. The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature* 1952 170:326.
- Ballache BE, Hohenboken WD, Evenson DP. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol Reprod* 1987 36:915-25.
- Bane A. A study on the technique of hemocytometric determination of sperm motility and sperm concentration in bull semen. *Cornell Veterinarian*. 1952 42: 518-531.
- Barth, AD, Ok, RJ. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, 1989, 285 pages.
- Barton TS, Robaire B, Hales BF. DNA damage recognition in the rat zygote following chronic paternal cyclophosphamide exposure. *Toxicol Sci* 2007 100:495-503.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986 1, 307-310.
- Blom E. [Pathological conditions in genital organs and sperm as a cause for the rejection of breeding bulls for import into and export from Denmark (an andrologic retrospective, 1958-1982)]. *Nord Vet Med* 1983 35:105-30.
- Bradshaw WE, Holzapfel CM. Evolutionary response to rapid climate change. *Science* 2006 312, 1477-1478.
- Broekhuijse ML, Šoštarić E, Feitsma H, Gadella BM. Relationship of flow cytometric sperm integrity assessments with boar fertility performance under optimized field conditions. *J Anim Sci*. 2012 90(12):4327-36.

- Bronson F. H. Mammalian reproductive biology, pp. 51–52 Chicago, IL: The University of Chicago Press. 1989.
- Bronson FH. Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Nov 27, 2009 364(1534): 3331–3340.
- Budworth PR, Amann RP, Chapman PL. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *Journal of Andrology* 1988 9:41-54.
- Chacon J, Perez E, Rodriguez-Martinez H. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos indicus*) bulls in the tropics. *Theriogenology* 2002 58:41-50.
- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951 168:697-698.
- Christensen K, Pedersen JO. Chromosome C-band polymorphism in relation to fertility in boars of the Duroc breed. *Hereditas* 1990 113, 183–187.
- Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008 89:823-31.
- Cormier N, Bailey JL. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 2003 69: 177–185.
- Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology* 1997 18: 461-468
- Cox C, Reeder JE, Robinson RD, Suppes SB, Wheless LL. Comparison of frequency distributions in flow cytometry. *Cytometry*. 1988 9(4):291-8.
- Cummins J. Sperm motility and energetics. In Sperm biology: an evolutionary perspective (eds Birkhead TR, Hosken DJ, Pitnick S), pp. 185–206. Oxford, UK: Academic Press. 2009.
- Dadoune J-P. The nuclear status of human sperm cells. *Micron* 1995 26, 323-345.
- de Leeuw J, den Daas JHG, Woelders H. The fix-vital stain method; simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *Journal of Andrology* 1991 12:112-118.
- Den Daas, JHG. Prediction of bovine male fertility. PhD-thesis, Wageningen, the Netherlands, 1997.
- Dixon SC, Miller NGA, Carter NP, Tucker EM. Bivariate flow cytometry of farm animal chromosomes: a potential tool for gene mapping. *Anim. Genet.* 1992 23, 203–210.
- Dobrinski I, Hughes HPA, Barth AD. Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *J Reprod Fertil* 1994 101:531-8.
- Dolezel J, Bartos J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.* 2005 95, 99-110.
- Ducos A, Revay T, Kovacs A, Hidas A, Pinton A, Bonnet-Garnier A, Molteni L, Slota E, Switonski M, Arruga MV, van Haeringen WA, Nicolae I, Chaves R, Guedes-Pinto H, Andersson M, Iannuzzi L. Cytogenetic screening of livestock populations in Europe: and overview. *Cytogenet. Genome Res.* 2008 120, 26-41.

- Ericsson SA, Garner DL, Thomas CA, Downing TW, Marshall CE. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1993;39:1009-1024.
- Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci* 2000;22:169-89.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1982;30:279-80.
- Evenson DP, Jost LK, Corzett M, Balhorn R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: A case study. *J Androl* 2000;21:739-46.
- Evenson DP. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fert Dev* 1999;11:1-15.
- Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol. Biol.* 2013;927:147-164.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980;210:1131-1133.
- Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 2006;65:979-991.
- Fatehi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BA, Colenbrander B, Gadella BM. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl* 2006;27:176-88.
- Gadella BM, Harrison RA. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction* 2002;67:340-350.
- Gadella BM, Harrison RAP. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 2000;127:2407-2420.
- Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR 14 and propidium iodide. *Journal of Andrology* 1994;15:620-629.
- Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette M, Marshall CE. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1997;57:1401-1406.
- Garner DL, Thomas CA. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Molecular Reproduction and Development* 1999;53:222-229.
- Garner DL. Ancillary tests of bull semen quality. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997;13:313-&.
- Garner DL. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *J. Androl.* 2001;22:519-526.
- Givan AL. *Flow Cytometry: First Principles*. Wiley-Liss, Inc., 2001, 273 pp.

- Gledhill BL, Lake S, Steinmetz LL, Gray JW, Crawford JR, Dean PN, Van Dilla MA. Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution. *J. Cell Physiol.* 1986 87, 367-375.
- Graham JK. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science* 2001 68:239-247.
- Gravance CG, Champion ZJ, Casey PJ. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology* 1998 49:1219-30.
- Gravance CG, Garner DL, Miller MG, Berger T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reproductive Toxicology* 2000 15:5-10.
- Gravance CG, Garner DL, Pitt C, Vishwanath R, Sax-Gravance SK, Casey PJ. Replicate and technician variation associated with computer aided bull sperm head morphometry analysis (ASMA). *Int J Androl* 1999 22:77-82.
- Green CE, Watson PF. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 2001 122: 889-898
- Gregory J. Handbook of fluorescent probes and research products. Eugene OR, USA: Molecular Probes, 2002.
- Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000 45:23-41.
- Guthrie HD, Welch GR. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology* 2005 63: 396-410
- Guthrie HD, Welch GR, Theisen DD, Woods LC. Effects of hypothermic storage on intracellular calcium, reactive oxygen species formation, mitochondrial function, motility, and plasma membrane integrity in striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Theriogenology* 2011 75. 951-961.
- Guthrie HD, Woods LC, Long JA, Welch GR. Effects of osmolality on inner mitochondrial transmembrane potential and ATP content in spermatozoa recovered from the testes of striped bass (*Morone saxatilis*). *Theriogenology* 2008 69. 1007-1012.
- Hagedorn M, Ricker J, McCarthy M, Meyers SA, Tiersch TR, Varga ZM, Kleinhans FW. Biophysics of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *Cryobiology* 2009 58. 12-19.
- Hallap T, Haard M, Jaakma U, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? *Theriogenology* 2004 62: 702-713.
- Hallap T, Håård MCh, Jaakma Ü, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish Red and White AI sires at one and four years of age. *International Journal of Andrology* 2004 27:166-171.
- Hallap T, Nagy S, Haard M, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in al bulls. *Theriogenology* 2005 63:1752-63.
- Hallap T, Nagy Sz, Jaakma Ü, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology*. 2005 63(8):2311-22.

- Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev.* 1996; 45(3):378-91.
- Ho H-C, Granish KA, Suarez SS. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Developmental Biology* 2002; 250: 208-217.
- Holt C, Holt WV, Moore HDM, Reed HCB, Curnock RM. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *Journal of andrology* 1997; 18:312-323.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 2000a; 62:3-22.
- Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000b; 53:47-58.
- Horváth Á, Martínez-Páramo S, Kovács ÁI, Urbányi B, Herráez P. A ponty (*Cyprinus carpio Linnaeus*) ovariális folyadékának hatása a friss és mélyhűtött pontysperma motilitására. *Állattani Közlemények* 2010; 95:(1) 25-33.
- Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J Androl* 2011; 13:406-19.
- Hourcade JD, Perez-Crespo M, Fernandez-Gonzalez R, Pintado B, Gutierrez-Adan A. Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8:9.
- Iglesias-Guimaraes V, Gil-Guinon E, Sanchez-Osuna M, Casanelles E, Garcia-Belinchon M, Comella JX, Yuste VJ. Chromatin collapse during caspase-dependent apoptotic cell death requires DNA fragmentation factor, 40-kDa subunit-/caspase-activated deoxyribonuclease-mediated 3'-OH single-strand DNA breaks. *J Biol Chem* 2013; 288, 9200-9215.
- Inaba, K. Molecular mechanisms of the activation of flagellar motility in sperm. in: Fish Spermatology, pp 267-280. Alavi SMH, Cosson JJ, Coward K, Rafiee G, eds. Alpha Science international Ltd, Oxford, 2008. ISBN 978-1-84265-369-2.
- Indrayan, A. Medical Biostatistics. Chapman & Hall/CRC Press, 2012, 1024 pp.
- Ingermann RL. Energy metabolism and respiration in fish spermatozoa. in: Fish Spermatology, pp 215-240. Alavi SMH, Cosson JJ, Coward K, Rafiee G, eds. Alpha Science international Ltd, Oxford, 2008. ISBN 978-1-84265-369-2.
- Jamieson BGM. Fish Evolution and Systematic Evidence from Spermatozoa. pp. 230–295, Cambridge University Press, Cambridge, 1991.
- Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Håård MGH, Håård MCh, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 1999; 52: 641-658.
- Januskauskas A, Johannisson A, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to the fertility of Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 2000; 53:859-875.

- Januskauskas A, Lukoseviciute K, Nagy S, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. Theriogenology 2005; 63: 160-178.
- Karoui S, Díaz C, González-Marín C, Amenabar ME, Serrano M, Ugarte E, és mtsai. Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility? J Anim Sci 2012; 90:2437-49.
- Lampariello F. On the use of the Kolmogorov-Smirnov statistical test for immunofluorescence histogram comparison. Cytometry 2000; 39, 179-188.
- Langford CF, Fischer PE, Binns MM, Holmes NG, Carter NP. Chromosome-specific paints from a high-resolution flow karyotype of the dog. Chromosome Res. 1996 Feb;4(2):115-23.
- Larsen J, Christensen K, Larsen JK, Jensen PØ, Gustavsson I, Christensen IJ. High resolution DNA flow cytometry of boar sperm cells in identification of boars carrying cytogenic aberrations. Theriogenology. 2004 Aug;62(3-4):501-11.
- Lewalski H, Otto FJ, Kranert T, Wassmuth R. Flow cytometric detection of unbalanced ram spermatozoa from heterozygous 1;20 translocation carriers. Cytogenet Cell Genet. 1993; 64(3-4):286-91.
- Lewalski H, Otto FJ, Kranert T, Glahn-luft B, Wassmuth R. Analysis of the 1/20 translocation in ram spermatozoa by flow cytometry. Genet. Sel. Evol. 1991; 23, Suppl. 152-156.
- Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104:17725-9.
- Marco-Jimenez F, Viudes-de-Castro MP, Balasch S, Moce E, Silvestre MA, Gomez EA, és mtsai. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. Cryobiology 2006; 52:295-304.
- Matsson P, Annerén G, Gustavsson I. Flow cytometric karyotyping of mammals, using blood lymphocytes: Detection and analysis of chromosomal abnormalities. Hereditas 1986; 104, 49-54.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology 2002; 57:327-344.
- Meistrich ML, Göhde W, White RA, Schumann J. Resolution of X and Y spermatids by pulse cytophotometry. Nature 1978; 274, 821-823.
- Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, Hammar L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. Acta Vet Scand 2008;50.
- Morrell JM, Rodriguez-Martinez H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. Open Androl. J. 2009; 1, 1-9.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. Biology of Reproduction 2003; 68:1828-35.
- Nagy S, Johannisson A, Wahlsten T, Ijas R, Andersson M, Rodriguez-Martinez H. Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. Theriogenology 2013; 79, 1153-1161.

- Nagy Sz, Kakasi B, Havasi M, Németh S, Pál L, Bercsényi M, Husvéth, F. Dynamic cellular changes during fish sperm activation as measured by flow cytometry. Diversification in Inland Finfish Aquaculture II., Vodňany, Czech Republic, 2013b. 09. 24.
- Nagy Sz, Pál L, Németh S, Bercsényi M. Kinetics of fish sperm activation - application of flow cytometry and time parameter analysis: Notes on technic / short communication. Georgikon for Agriculture 2013a 17:(2) pp. 41-52.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J. Immunol. Methods 1991 139, 271-279.
- Oberhaus SM. TUNEL and immunofluorescence double-labeling assay for apoptotic cells with specific antigen(s). Methods Mol. Biol. 2003 218, 85-96.
- Olsen AK, Lindeman B, Wiger R, Duale N, Brunborg G. How do male germ cells handle DNA damage? Toxicol Appl Pharmacol 2005 207:521-31.
- Parikh HH, Li WC, Ramanathan M. Evaluation of an alternative to the Kolmogorov-Smirnov test for flow cytometric histogram comparisons. J. Immunol. Methods 1999 229, 97-105.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. Biology of Reproduction 1989 40: 1020-1025.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biology of Reproduction 1988 38:1171-1180.
- Peña F, Saravia F, Johannisson A, Walgren M, Rodríguez-Martínez H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. Int J Androl 2005 28:107-14.
- Perreault, S.D., Rubes, J., Robbins, W.A., Evenson, D.P., Selevan, S.G., (2000): Evaluation of aneuploidy and DNA damage in human spermatozoa: applications in field studies. Andrologia 32, 247-254.
- Petrie A, Watson P. Statistics for Veterinary and Animal Science. Blackwell Science Ltd. 1999. 243 pp.
- Phillips NJ, McGowan MR, Johnston SD, Mayer DG. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. Ani Rep Sci 2004 81:47-61.
- Pizzo P, Drago I, Filadi R, Pozzan T. Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis: mechanism, role, and tissue specificities. Pflugers Arch. 2012 Jul;464(1):3-17.
- Pommer AC, Rutllant J, Meyers SA. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. Biol Reprod. 2003 68(4):1208-14.
- Puglisi R, Pozzi A, Foglio L, Spano M, Eleuteri P, Grollino MG, és mtsai. The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. Ani Rep Sci 2012;132:17-28.
- Pulkkanen KJ, Laukkanen MO, Naarala J, Yla-Herttuala S, False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. Apoptosis 2000 5, 329-333.
- Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. Biology of Reproduction. 2001; 65: 462-470.

- Revay T, Nagy S, Kopp C, Flyckt A, Rens W, Rath D, és mtsai. Macrocephaly in Bull Spermatozoa Is Associated with Nuclear Vacuoles, Diploidy and Alteration of Chromatin Condensation. *Cytogenet Genome Res* 2009;126:202-9.
- Revay T, Kopp C, Flyckt A, Taponen J, Ijäs R, Nagy Sz, Kovacs A, Rens W, Rath D, Hidas A, Taylor JF, Andersson M. Diploid spermatozoa caused by failure of the second meiotic division in a bull. *Theriogenology* 2010 73, 421-429.
- Ribeiro GF, Corte-Real M, Johansson B. Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. *Mol. Biol. Cell* 2006 17, 4584-4591.
- Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* 2006 1, 1458-1461.
- Rodriguez H, Ohanian C, Bustos-Obregon E. Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen. *Int J Androl* 1985 8:147-58.
- Rodriguez-Martinez H, Barth A. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007 64:39-54.
- Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Pertoft H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction Fertility and Development* 1997 9:297-308.
- Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Zhang BR, Söderquist L. In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development* 1997 43: 1-11.
- Rodriguez-Martinez H, Larsson B. Assessment of sperm fertilizing ability in farm animals. *Acta Agric Scand A Anim Sci* 1998 12-8.
- Rodriguez-Martinez H. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fert Dev* 2007 19:91-101.
- Roederer M. Compensation (An Informal Perspective). 2000; <http://www.drmr.com/compensation>, 24 May 2000.
- Saacke RG, DeJarnette JM, Bame JH, Karabinus DS, Whitman SS. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology* 1998 50:117-28.
- Saacke RG, White JM. Semen quality tests and their relationship to fertility. Proc. IVth Tech. Conf. Anim. Reprod., NAAB, 1972 22-27.
- Saacke RG. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 2008 70:473-8.
- Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 1996 24:167-73.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in human spermatozoa. *Reviews Reprod.* 4, 31-37.
- Saravia F, Nunez-Martinez I, Moran JM, Soler C, Muriel A, Rodriguez-Martinez H, Pena FJ. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology* 2007 68:196-203.

SAS Institute Inc. SAS® Language and Procedures: Introduction, Version 6, First Edition, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1990.

Shamsuddin M, Rodriguez-Martinez H. A simple, non-traumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine. *Animal Reproduction Science* 1994 36: 61-75.

Smith JF, Murray GR. Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. *Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod.* 1997 57:246-250.

Sood S, Malecki IA, Tawang A, Martin GB. Survival of emu (*Dromaius novaehollandiae*) sperm preserved at subzero temperatures and different cryoprotectant concentrations. *Theriogenology*. 2012 78(7):1557-69.

Söderquist L, Janson L, Larsson K, Einarsson S. Sperm morphology and fertility in A.I.bulls. *Zentralbl Veterinarmed A* 1991 38:534-543.

Stähelin BJ, Marti U, Solioz M, Zimmermann H, Reichen J. False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *Mol Pathol.* 1998 51(4):204-8.

StatSoft, Inc. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK USA, 2000.

Switonski M, Andersson M, Nowacka-Woszuk J, Szczerbal I, Sosnowski J, Kopp C, Cernohorska H, Rubes J. Identification of a new reciprocal translocation in an AI bull by synaptonemal complex analysis, followed by chromosome painting. *Cytogenet Genome Res.* 2008 121(3-4):245-8.

Thundathil J, Gil J, Januskauskas A, Larsson B, Söderquist L, Mapletoft R, Rodriguez-Martinez H. The relationship between the proportion of capacitated sperm present in the post-thawed semen and fertility with artificial insemination. *International Journal of Andrology* 1999 22:366-373.

Thundathil J, Meyer R, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology* 2000 54:921-34.

Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ. Fertilization characteristics and in vitro embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. *Mol Reprod Dev* 1998 50:328-33.

Thundathil J, Palasz AT, Mapletoft RJ, Barth AD. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. *Ani Rep Sci* 1999 57:35-50.

Troiano L, Granata ARM, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Carani C, Franceschi C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Experimental Cell Research* 1998 241:384-393.

van den Engh GJ, Trask BJ, Gray JW, Langlois RG, Yu LC. Preparation and bivariate analysis of suspensions of human chromosomes. *Cytometry*. 1985 6(2):92-100.

van der Schans GP, Haring R, van Dijk-Knijnenburg HC, Bruijnzeel PL, den Daas NH. An immunochemical assay to detect DNA damage in bovine sperm. *J Androl.* 2000 21(2):250-7.

Veeramachaneni DN, Sawyer HR. Use of semen as biopsy material for assessment of health status of the stallion reproductive tract. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1996 12:101-10.

- Venhoranta H, Pausch H, Wysocki M, Szczerbal I, Hänninen R, Taponen J, Uimari P, Flisikowski K, Lohi H, Fries R, Switonski M, Andersson M. Ectopic KIT copy number variation underlies impaired migration of primordial germ cells associated with gonadal hypoplasia in cattle (*Bos taurus*). *PLoS One* 2013 26, e75659.
- Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero A. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Hum Reprod* 2002 17:2128-33.
- Waberski D, Schapmann E, Henning H, Riesenbeck A, Brandt H. Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. *Theriogenology* 2011 75:337-45.
- Walker PR, LeBlanc J, Sikorska M. Evidence that DNA fragmentation in apoptosis is initiated and propagated by single-strand breaks. *Cell Death Differ*. 1997 4(6):506-15.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development* 1995 7: 871-891.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 2000 60-61:481-492.
- Watson PF. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec* 1975 97:12-5.
- Watson JV. Proof without prejudice revisited: immunofluorescence histogram analysis using cumulative frequency subtraction plus ratio analysis of means. *Cytometry* 2001 43, 55-68.
- Way AL, Henault MA, Killian GJ. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 1995;43:1301-1316.
- West JW. Effects of Heat-Stress on Production in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 2003 86:2131–2144
- Whitfield CH, Parkinson TJ. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Theriogenology* 1995 44:413-422.
- Williams WW. Technique of collecting semen for laboratory examination with a review of several diseased bulls. *Cornell Veterinarian* 1920 10: 87-94.
- Winkle T, Rosenbusch B, Gagsteiger F, Paiss T, Zoller N. The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2009 26, 41-46.
- Wu CT, Bollwein H, Weber F, Stolla R. Effects of scrotal insulation on sperm mitochondrial membrane potential, motility, head abnormality and chromatin structure in bulls. *Reproduction in Domestic Animals* 2003 38:329 (abstr).
- Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds): *The Physiology of Reproduction*. New York, NY: Raven Press Ltd, J.D, 1994; 189-315.
- Youn, IT. Proof without prejudice: use of the Kolmogorov-Smirnov test for the analysis of histograms from flow systems and other sources. *J. Histochem. Cytochem.* 1977 25, 935-941.

Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. International Journal of Andrology 1998 21:207–216.

Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. J Androl 2009 30:219-29.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani társszerzőimnek és munkatársaimnak korábbi (NAIK-ÁTHK Herceghalom) és jelenlegi (PE Georgikon Kar, Állattudományi Tanszék) munkahelyemen.

Külön szeretnék köszönetet mondani a folyamatos együttműködésért, szakmai és baráti tanácsokért Kovács Andrásnak, Husvéth Ferencnek, Bodó Szilárdnak, Magnus Andersson-nak (Finnország), Anders Johannisson-nak (Svédország), Heriberto Rodriguez-Martinez-nek (Svédország) és Révay Tamásnak (Kanada).

Köszönettel tartozom Feleségemnek, Lepossa Anitának a folyamatos és töretlen támogatásért.

A tézisekben ismertetett tudományos munkák pénzügyi hátterét a Swedish Institute (SI), a Royal Swedish Academy of Agriculture and Forestry (KSLA), a Knut and Alicia Wallenbergs Foundation, a Swedish Farmers' Foundation for Research in Agriculture (SLF), az Estonian Science Foundation (ESF), az MTA Bolyai Ösztöndíja és az OTKA biztosította.

A DOLGOZATBAN BEMUTATOTT PUBLIKÁCIÓK

1. Nagy S, Hallap T, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim Reprod Sci.* 2004 Feb;80(3-4):225-35.
2. Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology.* 2005 May;63(8):2311-22.
3. Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology.* 2006 Apr 1;65(6):1122-36.
4. Nagy ST, Kakasi B, Pál L, Havasi M, Bercsényi M, Husvéth F. Effects of high ambient temperature on fish sperm plasma membrane integrity and mitochondrial activity - A flow cytometric study. *Acta Biol Hung.* 2016 Jun;67(2):125-32.
5. Nagy S, Johannisson A, Wahlsten T, Ijäs R, Andersson M, Rodriguez-Martinez H. Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology.* 2013 May;79(8):1153-61.
6. Kakasi B, Nagy S, Pál L, Czimber GE, Husvéth F. A comparison of alternative assays to measure DNA damage in stallion spermatozoa: TUNEL test versus 'Nicoletti assay'. *Acta Vet Hung.* 2015 Mar;63(1):118-24.
7. Nagy S, Polgár PJ, Andersson M, Kovács A. Quick cytogenetic screening of breeding bulls using flow cytometric sperm DNA histogram analysis. *Acta Vet Hung.* 2016 Sep;64(3):372-379.

dc_1642_19



Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry

Szabolcs Nagy^{a,b,c,*}, Triin Hallap^{b,d}, Anders Johannisson^a,
Heriberto Rodriguez-Martinez^b

^a Department of Anatomy and Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), P.O. Box 7011, S-750 07 Uppsala, Sweden

^b Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), P.O. Box 7039, S-750 07 Uppsala, Sweden

^c Research Institute for Animal Breeding and Nutrition, Gesztenyes u.1., H-2053 Herceghalom, Hungary

^d Department of Reproductive Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Estonian Agricultural University, Kreutzwaldi 62, 51014 Tartu, Estonia

Received 28 April 2003; received in revised form 5 August 2003; accepted 5 August 2003

Abstract

Cryopreservation of bull semen is sub-optimal, causing cell death of a majority of spermatozoa. Even the surviving cells are affected post-thaw, either structurally or functionally. The aim of this study was to investigate the sequence of events that take place when sperm plasma membrane and acrosome deteriorate during a 4 h incubation period post-thaw, with special attention paid to the acrosome status of dying cells. Frozen-thawed semen of six AI dairy bulls was used. Three straws per batch were pooled and incubated at 37 °C. Sub-samples were taken at 30 min intervals and stained with SYBR 14, propidium iodide (PI) and phycoerythrin-conjugated peanut agglutinin (PE-PNA). Plasma membrane and acrosome integrity were measured by flow cytometry. The experiment was repeated three times. Immediately after thawing, only 3.45% of the dying cells showed acrosomal exocytosis. This number increased dramatically during incubation, reaching 67% after 4 h. Within the intact cell population, the overall decrease in viability and acrosome integrity was kept at five percentage points. Flow cytometry and the triple fluorochrome combination presented a detailed picture of the time course in plasma membrane and acrosome deterioration of

* Corresponding author. Tel.: +36-23-319-133; fax: +36-23-319-133.

E-mail address: szabio70@hotmail.com (Sz. Nagy).

frozen-thawed bull semen. The results are expected to be useful for monitoring new cryopreservation protocols.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Bovine sperm; Cryopreservation; Plasma membrane; Acrosome; Flow cytometry

1. Introduction

Although cryopreservation of semen has become a routine in the bovine AI industry, the protocols used are still somewhat empirical, with a considerable number of spermatozoa failing to survive the procedure. This failure rate impairs fertilization because successful fertilization demands that a sufficient number of fully competent spermatozoa survive until ovulation (Watson, 2000). Moreover, surviving spermatozoa seem to be functionally and structurally impaired, making their survival rate about half that of fresh spermatozoa (Holt, 2000a). For recent reviews, see Watson (2000), Holt (2000a), Holt (2000b), Medeiros et al. (2002). Saacke and White (1972) investigated the retention of the acrosomal cap in fresh and frozen-thawed bull semen samples. They found more rapid acrosomal alterations in cryopreserved samples compared to controls, and a significant positive relationship between the percentage of spermatozoa with intact acrosome and field fertility. In a later study, den Daas (1997) were not able to find such positive correlation between acrosomal status of incubated frozen-thawed bull spermatozoa and field fertility, but they did find that individual bulls that produced semen capable of maintaining a competent population of spermatozoa over time were the ones who, even with relatively low numbers of spermatozoa in the inseminate, still obtained acceptable fertility results. The few other reports on the relationship between bovine fertility and induced acrosomal exocytosis had conflicting results (Whitfield and Parkinson, 1995; Januskauskas et al., 2000).

Several techniques to estimate the portion of viable spermatozoa with intact acrosomes are present in the literature (Smith and Murray, 1997; Rodriguez-Martinez et al., 1997). Questions remain about how to interpret the population of dead cells with ruptured acrosomes. Using Eosine/aniline blue staining (Way et al., 1995) or a fix-vital staining (de Leeuw et al., 1991) on frozen-thawed bull semen, the population of acrosome-ruptured, dead spermatozoa consists of cells which died after a spontaneous acrosome exocytosis and cells which lost the acrosome at or after cell death (due to degenerative membrane changes of the acrosome). However, as any staining procedure gives only a “snapshot” of sperm subpopulations at the moment the sample is prepared, it is not possible to distinguish the order of these events in the dead sperm population.

We have recently developed a fluorescent triple stain combination to analyze sperm samples in egg-yolk based extenders from the point of view of viability and acrosome integrity (Nagy et al., 2003). Phycoerythrin-conjugated peanut agglutinin (PE-PNA), which labels non-intact acrosomes, was added to the well-validated LIVE/DEAD kit, SYBR 14 and propidium iodide (PI) before analyzing samples by flow cytometry. In the SYBR 14–PI (FL1–FL3) plots, the subpopulation of events showing labeling by both fluorochromes are generally considered to be dying cells. In our previous experiments, we noted that these events appeared as PE-PNA negative events, indicating, that dying cells typically have

intact acrosomes. If so, cell death happens first, and the acrosome loss is due to further degenerative, necrotic membrane changes. Investigating the acrosome integrity of these dying cells over time would provide greater details of the course of plasma membrane and acrosome deterioration in frozen-thawed sperm samples.

To assess the assumption that degenerative, necrotic membrane changes lead to acrome loss after cell death, changes in sperm subpopulations of frozen-thawed bull semen were analyzed over time by repeated measurements done at 30 min intervals on SYBR 14/PE-PNA/PI-stained samples incubated for 4 h.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Reagents were obtained from the following sources: Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA, LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, L-7011, SYBR 14 and PI); Biomedica Corp. (Foster City, CA, USA, peanut agglutinin conjugated with phycoerythrin, Phycoprobe RPE-PNA, P44); Sigma (St. Louis, MO, USA, dimethyl-sulfoxide, DMSO, D-5879); Becton Dickinson (San Jose, CA, USA, CellWash optimized PBS, cat. no. 349524).

2.2. Semen samples

Frozen-thawed semen of six Swedish Red and White dairy bulls (at age four) was used in this study. The animals were housed at the Svensk Avel ek. För. bull station in Skara, Sweden. Two consecutive ejaculates were collected with an artificial vagina, pooled, and extended with a commercial extender (Triladyl®, Minitüb, Germany) for further processing. The extended semen was put into 0.25 ml plastic straws at a concentration of 15×10^6 spermatozoa. The straws were frozen by a programmable biological freezer, and stored in liquid nitrogen until laboratory measurements were taken. For analyses, straws were thawed in a water bath at 35 °C for 12 s. Three straws per batch were pooled and incubated for 4 h at 37 °C in the dark, and sub-samples were taken at 30 min intervals for flow cytometric measurements. The experiment was repeated three times on different days.

2.3. Triple fluorochrome combination for flow cytometry

The staining protocol followed the description of Nagy et al. (2003). Briefly, 100 nM SYBR 14 working solution (Component A of LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, diluted 10-fold in DMSO), 2.5 µg/ml PE-PNA solution (1 mg/ml stock solution in a buffer composed of 3.0 M ammonium sulfate, 50 mM sodium phosphate, 0.05% sodium azide pH 7.0, containing 1 mM [Ca²⁺] and [Mn²⁺] ions), and 12 µM PI stock solution (undiluted Component B of LIVE/DEAD Sperm Viability Kit) were added to 1 ml CellWash buffer. Falcon tubes containing 450 µl of buffer containing the appropriate amount of fluorescent dyes were kept at 37 °C in the dark until sample preparation. Fifty microliters of post-thaw and incubated semen samples were added to the buffers for fluorophore

loading, mixed and incubated at 37 °C in the dark for 10 min and re-mixed before analysis.

2.4. Flow cytometry

Measurements were done on an LSR flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The three fluorescent probes were excited by an Argon ion 488 nm laser. SYBR 14 fluorescence (cells with intact plasma membrane) was detected on detector FL1 (530 nm/528 nm), PI fluorescence (cells with permeable plasma membrane) was detected on detector FL3 (670 LP), and PE-PNA signal (cells with ruptured acrosomes) was detected on detector FL2 (575 nm/525 nm). Forward and side scatter values were recorded on a linear scale, while fluorescent values were recorded on a logarithmic scale. Compensations were set according to Roederer (2000).

Acquisitions were done using the CellQuest 3.1 software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Logical gating was done as described by Nagy et al. (2003). The majority of non-sperm events were gated out based on scatter properties. Moreover, events with similar scatter parameters to spermatozoa but without DNA content were gated out based on SYBR 14 or PI fluorescence. Events with high SYBR 14 and PI fluorescence were identified as dying cells (Garner et al., 1994). The flow cytometer was used at low flow rate (6–24 μ l/min). Event rates were kept at around 1200 s⁻¹. Acquisitions were stopped after recording 3000 dying events. Acquisition data were stored for further analyses in list mode.

2.5. Data analysis

On SYBR 14/PI dot plots, regions were drawn to determine the percentage of live, dead and dying spermatozoa. On PE-PNA/PI dot plots, quadrants were set to identify and measure percentages of the following subpopulations: live cells with intact acrosome (LI), live cells with ruptured acrosome (LR), dead cells with intact acrosome (DI) and dead cells with ruptured acrosome (DR). Moreover, dying events were gated to PE-PNA/PI dot plots to evaluate the acrosome status of these cells, using the same quadrant positions as above (Fig. 1). Furthermore, three-dimensional dot plots were drawn by WinMDI 2.8 (free software by J. Trotter, available for downloading at <http://www.facs.scripps.edu/software.html>). Descriptive analyses were done with Microsoft® Excel 2000.

Repeated measures ANOVA (Petrie and Watson, 1999) was done to test the differences between bulls, between days, and between repeated measurements during incubation using the within-subjects (repeated measures) ANOVA with multiple dependent measures (MANOVA) option of the STATISTICA 5.5 software package (StatSoft Inc., 2000). Bulls were set as independent, random factors, while days and repeated measurements during incubation were set as within-subject (repeated measures) factors with the levels of three (days) and nine (repeated measurements during incubation). Analyses were done on the LI, LR, DI and DR subpopulations and the subpopulation of dying spermatozoa with ruptured acrosomes (DYR). Additionally, *t*-test for dependent samples was done using the STATISTICA 5.5 software package to compare ratios of different sperm subpopulations before and after incubation.

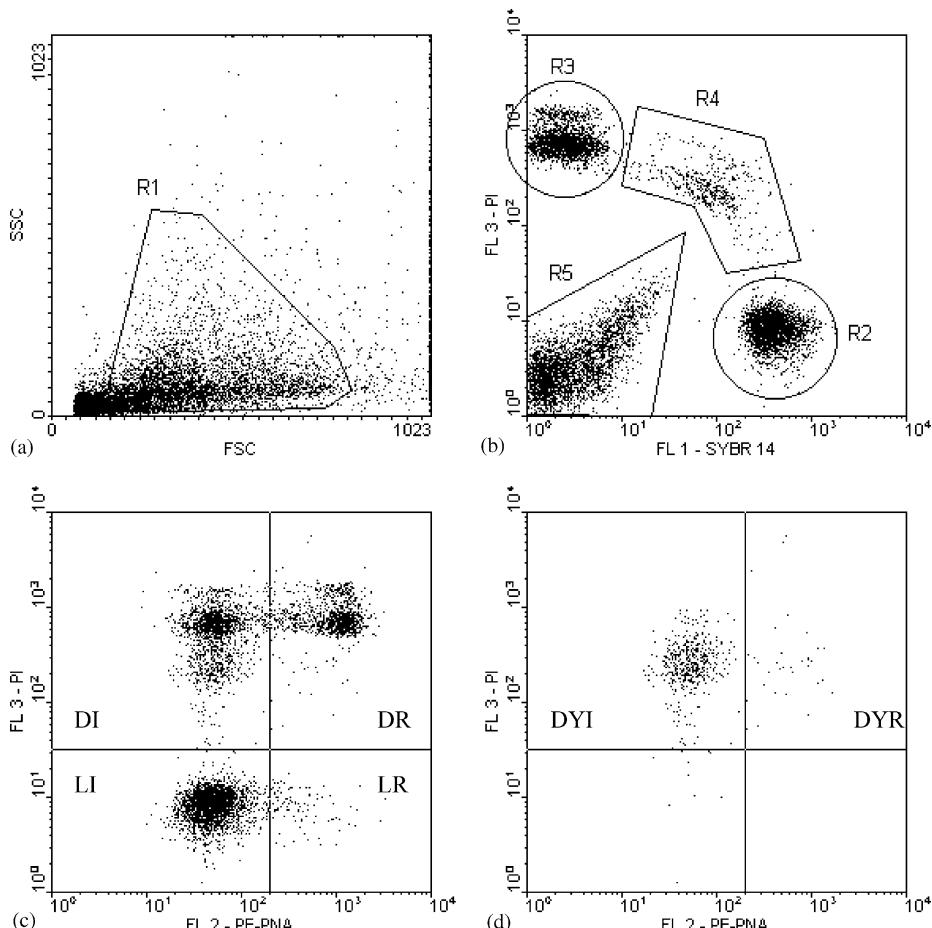


Fig. 1. SYBR 14/PE-PNA/PI dot plots showing the successive steps of gating. First, a rough “sperm” region (R1) is drawn, based on forward vs. side scatter properties (a). “Sperm” gate is applied to the SYBR 14/PI dot plot (b), where live (R2), dead (R3) and dying (R4) sperm subpopulations are identified, as well as the extender particles, which have similar scatter properties to sperm cells (R5). A “sperm and not extender” logical gate is applied to the PE-PNA/PI dot plot (c), where a quadrant is set to distinguish the following sperm subpopulations: “live cells with intact acrosome” (LI, lower left quadrant), “live cells with ruptured acrosome” (LR, lower right quadrant), “dead cells with intact acrosome” (DI, upper left quadrant), “dead cells with ruptured acrosome” (DR, upper right quadrant). In (d), a “(sperm and not extender) and dying” gate was applied to evaluate the acrosome status of dying cells, with the same quadrant position as in (c). In this case, dying cells with intact acrosome (DYI) will appear in the upper left quadrant, while dying cells with ruptured acrosome (DYR) will be in the upper right quadrant.

3. Results

The ratio of the dying spermatozoa in the samples of all bulls is shown in Table 1. As 3000 of these events were collected during acquisition, approximately 30,000–150,000 total sperm events were recorded per sample.

Table 1

Frozen-thawed, incubated bull semen, disclosed per bull (A–F) and time (30 min intervals)

| Incubated time (h) | Bull | | | | | |
|--------------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|
| | A | B | C | D | E | F |
| 0 | 11.2 ± 2.60 | 10.0 ± 3.50 | 9.9 ± 0.97 | 8.4 ± 2.10 | 9.1 ± 2.86 | 7.4 ± 2.07 |
| 0.5 | 10.0 ± 0.57 | 9.0 ± 1.03 | 8.4 ± 1.01 | 7.0 ± 1.63 | 6.7 ± 1.39 | 5.6 ± 0.43 |
| 1 | 9.7 ± 1.43 | 8.8 ± 1.65 | 8.6 ± 0.25 | 7.1 ± 1.46 | 5.7 ± 1.10 | 5.3 ± 0.18 |
| 1.5 | 9.2 ± 1.87 | 8.3 ± 2.16 | 7.4 ± 0.79 | 6.9 ± 1.72 | 4.8 ± 0.58 | 5.2 ± 0.49 |
| 2 | 7.9 ± 1.23 | 7.7 ± 0.86 | 6.7 ± 0.43 | 6.3 ± 1.18 | 3.3 ± 0.72 | 5.3 ± 1.03 |
| 2.5 | 7.8 ± 0.93 | 6.1 ± 1.04 | 5.9 ± 0.58 | 6.4 ± 1.47 | 3.9 ± 0.87 | 5.1 ± 0.78 |
| 3 | 6.0 ± 2.62 | 4.6 ± 1.65 | 4.8 ± 0.74 | 5.5 ± 1.37 | 3.0 ± 1.29 | 4.7 ± 0.92 |
| 3.5 | 6.1 ± 0.79 | 5.0 ± 1.54 | 4.8 ± 1.74 | 5.4 ± 1.26 | 2.2 ± 0.27 | 4.0 ± 0.36 |
| 4 | 6.0 ± 1.34 | 4.5 ± 0.76 | 5.4 ± 1.17 | 5.0 ± 1.50 | 3.5 ± 0.93 | 4.7 ± 1.40 |

The ratios of dying spermatozoa in the total sperm population during the 4 h incubation are presented (Mean ± S.D. values of three flow cytometric measurements).

We noticed slight differences between the repeated runs on different days; however, none of these was significant ($P = 0.65, 0.09, 0.28$ and 0.88 in the case of LI, LR, DI and DR subpopulations, respectively).

Fig. 2 shows the average changes in four subpopulations (LI, LR, DI, DR) during the incubation period. Over the 4 h incubation, a decrease of only five percentage points (approximately) was observed in the live, acrosome-intact (LI) population (49.4% at 0.5 h, and 44.3% at 4 h, $P < 0.01$). A more dramatic change was seen in the percentage of dead spermatozoa with intact acrosome (DI): a decrease from 34.4 to 17.4% ($P < 0.01$). At the same time, the percentage of dead spermatozoa with ruptured acrosome (DR) increased from 18

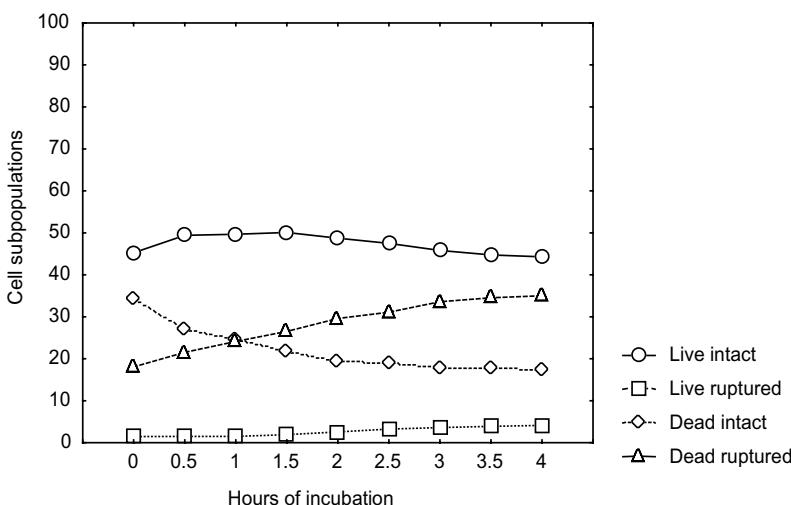


Fig. 2. Change in the four bull sperm subpopulations during a 4 h incubation post-thaw. Average change over the six bulls is presented.

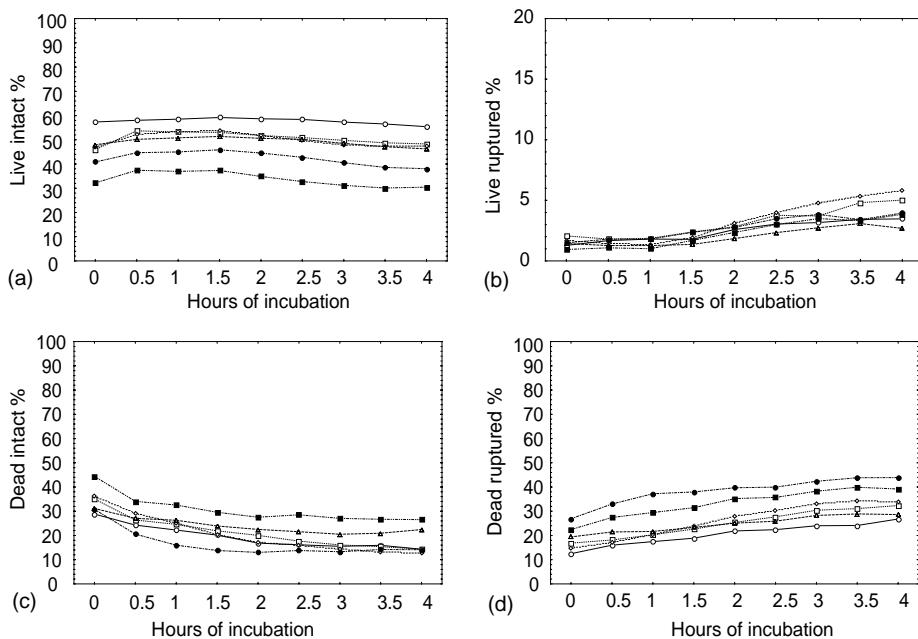


Fig. 3. Change in the four bull sperm subpopulations during a 4 h incubation post-thaw. Averages of three repeated measurements of six individual bulls ((○) A; (□) B; (◇) C; (△) D; (◆) E; (■) F) are presented. Parts (a), (b), (c) and (d) of the figure show the live intact, live ruptured, dead intact and dead ruptured subpopulations, respectively.

to 35% ($P < 0.01$). Finally, the percentage of live spermatozoa with ruptured acrosome (LR) only increased to 4.1% after incubation (1.5% at 0 h, and 4.1% at 4 h, $P < 0.01$).

The changes in the four subpopulations (LI, LR, DI, DR) during the incubation period in individual bulls are depicted in Fig. 3a–d, where averages of the 3 days are presented. Differences between bulls were significant in all cases ($P < 0.01$). The differences between repeated measurements during incubation were significant in the case of all (LI, LR, DI and DR) subpopulations ($P < 0.01$).

An increase in the percentage of LI cells was noticed in all bulls, with individually different patterns during the first half hour of incubation (Fig. 3a): on average, 45.3% at 0 h and 49.4% at 0.5 h ($P < 0.01$). A corresponding sharp drop was seen in the percentage of DI cells (Fig. 3c): from 34.4% at 0 h to 26.9% at 0.5 h ($P < 0.01$).

The percentage of cells with positive PE-PNA fluorescence within the dying subpopulation (DYR) is shown in Fig. 4. Although individually different patterns are seen, the percentage of these spermatozoa increased dramatically during incubation in the case of all bulls (on average, 3.5% at 0 h and 66.9% at 4 h, $P < 0.01$). Differences were significant between bulls ($P < 0.01$), between repeated measurements during incubation ($P < 0.01$) but not between days ($P = 0.33$).

The three-dimensional dot plots allowed us to reconstruct the events during incubation (Fig. 5). Immediately after thawing, a well-defined LI population could be seen, with low PE-PNA and PI fluorescence and high SYBR 14 fluorescence. Very few events could be

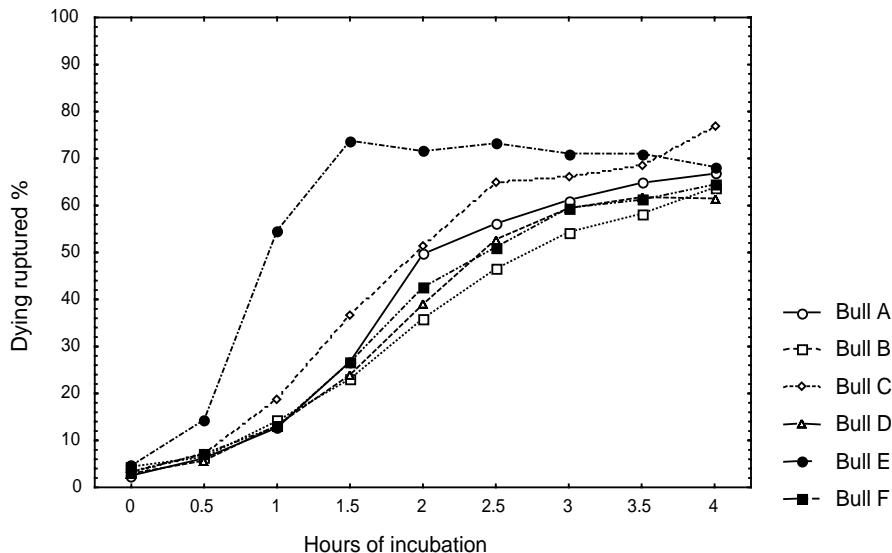


Fig. 4. Change in the acrosome-ruptured (dying ruptured (%)) bull spermatozoa within the dying subpopulation during a 4 h incubation post-thaw. Averages of three repeated measurements of six individual bulls are presented.

interpreted as viable spermatozoa with ruptured acrosome (LR). Within the dead, PI-positive population, two clearly distinguishable subpopulations appeared, indicating that some of the dead spermatozoa had deteriorated acrosomes, too. In addition, a small cluster of spermatozoa could be identified showing intermediate SYBR 14 and PI fluorescence: these are dying spermatozoa. It is noticeable that virtually all showed low PE-PNA fluorescence, indicating an intact acrosome. The picture was similar after 30 min of incubation. After 1 h, a small cluster of dying spermatozoa with high PE-PNA fluorescence appeared. As a simultaneous cluster of viable, acrosome-ruptured spermatozoa was not seen, these spermatozoa might have had acrosomal exocytosis while dying, or they might have died very quickly after acrosomal rupture. After 2 h, a small, but clearly visible viable cell subpopulation showed acrosomal labeling. Simultaneously, a well-defined dying, acrosome-ruptured cluster appeared; these spermatozoa had slightly lower PI fluorescence compared to the dying, acrosome-intact spermatozoa. At 2.5–3 h, the dying, acrosome-ruptured spermatozoa lost SYBR 14 intensity and gained PI intensity as they died. This shift seemed to be slower in the dying, acrosome-intact population. Finally, at 4 h, most of the dying spermatozoa showed acrosomal labeling, in agreement with the graphs seen in Fig. 4.

4. Discussion

The multicolor flow cytometric approach described here allowed us to draw a more detailed picture of the course of plasma membrane and acrosome deteriorations. The large number of measured events enabled us to study the acrosome status of dying spermatozoa,

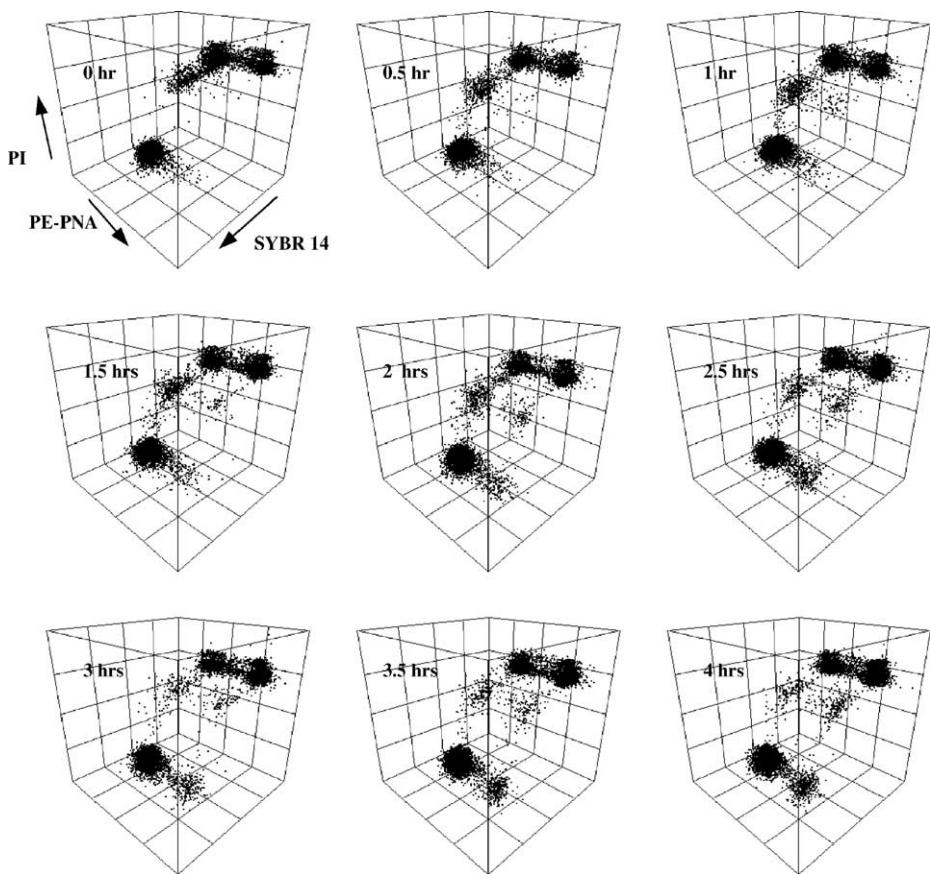


Fig. 5. Three-dimensional dot plots showing the shifts between subpopulations during incubation. A total of 20,000 events are presented.

a relatively small subpopulation (usually <10%) in commercially frozen-thawed sperm samples for AI.

A reconstruction of the measured events leads to the conclusion that immediately after thawing almost all dying spermatozoa have intact acrosomes, but during incubation an increasing number of spermatozoa die following acrosomal deterioration.

Cooled-rewarmed spermatozoa behave as if they were capacitated (Holt, 2000b); recent studies showed that cooling rather acts as a bypassing of the capacitation process (Green and Watson, 2001). Although the extender used for processing the semen was not removed during the incubation, and it might act as a capacitating agent (den Daas, 1997), capacitation status was not directly measured in the present study. However, the lectin PNA used in the study usually detects the earliest signs of the initiation of acrosome exocytosis, as soon as the fusion pores between the plasma and acrosomal membranes appear (Gadella and Harrison, 2000).

The flow cytometric technique presented seems to provide a more precise tool to perform thermoresistance tests, with a high number of spermatozoa analyzed. Previous studies (Saacke and White, 1972; den Daas, 1997) applied microscopic techniques, evaluating 200 spermatozoa instead of the tens of thousands as in the present study. The method described here does not require special sample preparations and can be used on a bench top flow cytometer equipped with standard optics (i.e., blue laser and green, orange and red detectors). It is therefore simple enough even for routine semen quality-control investigations. However, further large-scale experiments are needed to establish its predictive value regarding field fertility and to find threshold values of sub- and infertility, provided the changes in sperm subpopulations with deteriorating acrosomes are present *in vivo*. Moreover, this technique would allow the effect of new cryopreservation protocols on spermatozoa to be monitored in greater detail, with the order of events such as cell necrosis and acrosomal exocytosis being easily followed.

Finally, the surprising increase in the viable, acrosome-intact population during the first half hour of incubation requires further clarification. If it receives a scientific explanation, application of stain exclusion techniques based on plasma membrane permeability may need rethinking when used for routine post-thaw quality control. As stated by Watson (2000): “It appears that we need a more elaborate theory of plasma membrane disruption during cryopreservation than is currently in vogue”. The multicolor flow cytometric method described here might be a useful tool to reach that goal.

Acknowledgements

This study was supported by The Royal Swedish Academy of Forestry and Agriculture (KSLA), the Swedish Farmer’s Foundation for Research in Agriculture (SLF) and the Estonian Science Foundation (ETF, grant 4807). Semen samples were kindly supplied by Dr. MHC Håård, Svensk Avel, Skara, Sweden. Sz. N. received a postdoctoral grant from the Swedish Institute. The flow cytometer used in this study was financed by a grant from the Swedish Research Council.

References

- de Leeuw, J., den Daas, J.H.G., Woelders, H., 1991. The fix-vital stain method; simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *J. Androl.* 12, 112–118.
- den Daas, J.H.G., 1997. Prediction of bovine male fertility. Ph.D. Thesis, Wageningen, The Netherlands.
- Gadella, B.M., Harrison, R.A.P., 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development* 127, 2407–2420.
- Garner, D.L., Johnson, L.A., Yue, S.T., Roth, B.L., Haugland, R.P., 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR 14 and propidium iodide. *J. Androl.* 15, 620–629.
- Green, C.E., Watson, P.F., 2001. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122, 889–898.
- Holt, W.V., 2000a. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 3–22.
- Holt, W.V., 2000b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47–58.

- Januskauskas, A., Johannisson, A., Söderquist, L., Rodriguez-Martinez, H., 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53, 859–875.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J.L., 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57, 327–344.
- Nagy, Sz., Jansen, J., Topper, E.K., Gadella, B.M., 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.* 68, 1828–1835.
- Petrie, A., Watson, P., 1999. Statistics for Veterinary and Animal Science. Blackwell Science, London, The UK.
- Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B., Pertoft, H., 1997. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod. Fert. Dev.* 9, 297–308.
- Roederer, M., 2000. Compensation (An Informal Perspective). <http://www.drmr.com/compensation>, 24 May 2000.
- Saacke R.G., White J.M., 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: Proceedings of the Fourth Technical Conference on Animal Reproduction. NAAB, 22–27.
- Smith, J.F., Murray, G.R., 1997. Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 57, 246–250.
- StatSoft Inc. 2000. STATISTICA for Windows (Computer Program Manual). Tulsa, OK, USA.
- Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 481–492.
- Way, A.L., Henault, M.A., Killian, G.J., 1995. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 43, 1301–1316.
- Whitfield, C.H., Parkinson, T.J., 1995. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Theriogenology* 44, 413–422.



Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633

Triin Hallap^{a,c,*}, Szabolcs Nagy^{a,b,d}, Ülle Jaakma^c,
Anders Johannsson^b, Heriberto Rodriguez-Martinez^a

^aDivision of Comparative Reproduction, Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Ullsvägen 14C, Clinical Center, P.O. Box 7039, Ultuna SE-75007 Uppsala, Sweden

^bDepartment of Anatomy and Physiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden

^cDepartment of Reproductive Biology, Estonian Agricultural University, Tartu, Estonia

^dResearch Institute for Animal Breeding and Nutrition, Herceghalom, Hungary

Received 22 June 2004; received in revised form 10 October 2004; accepted 14 October 2004

Abstract

The present study was conducted to find a more objective method of evaluating sperm quality than the current subjective motility evaluations by testing the applicability of a novel fluorescent probe, Mitotracker Deep Red 633 (M-22426), for measuring the mitochondrial activity of spermatozoa both after freezing/thawing (PT) and after swim-up selection (SU), using flow cytometry (FC). The results from FC were compared to those of conventional microscopic motility evaluations and of computer-assisted sperm analysis (CASA) as well as to the fertility obtained after AI in the field. Semen from six Estonian Holstein bulls, processed when the sires were aged 3, 5, and 7 years, was included in the experiment. Sperm motility (measured either subjectively or by means of CASA) was always significantly ($p < 0.01$ – 0.001) higher in the spermatozoa recovered by SU, for any of the age groups considered, or even when combining the age groups. Motility (measured subjectively) after SU was significantly ($p < 0.05$) higher when bulls reached 7 years of age, compared to earlier collection ages, but no differences were registered between ages for CASA-assessed motility, either after SU or immediately PT. The numbers of spermatozoa with high red fluorescence also increased after SU:

* Corresponding author. Tel.: +46 0 18672323; fax: +372 0 6507531; mobile: 372 0 55615149.
E-mail address: triin.hallap@kv.slu.se (T. Hallap).

$p < 0.05$ (for semen from bulls aged 3 years), $p < 0.001$ (5 years), $p < 0.001$ (7 years), and $p < 0.001$ when all age groups were combined. The proportion of spermatozoa with high mitochondrial activity as determined by Mitotracker Deep Red 633 correlated with sperm motility ($p < 0.01$) both PT and after SU, but not with the fertility results. In conclusion, MitoTracker Deep Red 633 seems to be a reliable marker for frozen-thawed bovine semen viability both PT and after SU.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Frozen semen; Mitotracker deep red; Motility; Aging; Bull

1. Introduction

The complexity of the fertilization process requires the well co-ordinated function of many sperm organelles. One of the most essential sperm attributes at certain steps in sperm transport through the female, as well as in the approach to the oocyte vestments and to aid the penetration of the zona pellucida (ZP), is sperm motility—a result of the flagellar movement of the sperm tail. Motility is currently the most common definition of “sperm quality” in bull stations, acting as an indirect measure of metabolic activity and sperm viability. It can be measured by microscopic evaluation or, more objectively and accurately, by computer-assisted sperm analysis (CASA), although variation between instruments and measurements still exists [1,2]. Recently, flow cytometry (FC) has offered a more precise way to measure semen quality, including aspects such as viability, acrosome integrity, and DNA structure [3,4]. As spermatozoa show flagellar movement only in the presence of ATP-derived energy, produced in mid-piece located mitochondria, direct measurements of mitochondrial function might be useful as an alternate, more objective measure of sperm quality [4]. There are approximately 100 mitochondria in the mid-piece of the spermatozoon and fluorescent dyes, able to target defined intracellular compartments, can be used to visualize them. Most of these dyes work by diffusing into living cells and accumulating in mitochondria, provided that an internal 100–200-mV negative potential gradient occurs across the mitochondrial membrane (MMP). A novel probe, the Mitotracker Deep Red (Molecular Probes), was recently suggested by Nagy et al. [5] for testing mitochondrial activity in spermatozoa. MitoTracker probes are cell-permeant mitochondrion-selective dyes that contain a mildly thiol-reactive chloromethyl moiety. The chloromethyl group appears to be responsible for keeping the dye associated with the mitochondria after fixation. To label mitochondria, cells are simply incubated in submicromolar concentrations of the MitoTracker probe, which passively diffuses across the plasma membrane and accumulates in active mitochondria [6]. To obtain active sperm, the swim-up (SU) procedure is applied in assisted reproductive procedures such as IVF. It is believed that swimming up selects the higher-motility spermatozoa in a bulk semen sample. Because metabolic rate is the basis of motility, high mitochondrial activity is expected. Comparing the data from post-thaw and swim-up samples would test the effectiveness of the Mitotracker Deep Red as a probe to measure sperm quality more objectively than the current subjective motility evaluations. Owing to the presence of age differences in sperm motility [19], the testing was done on frozen-thawed semen from proven AI-sires processed when the sires were aged 3, 5, and 7 years. The results were

compared with sperm motility, as either conventionally assayed (by means of phase contrast microscopy) or gauged by CASA analysis. All data were finally related to the fertility of the examined semen when used for field AI.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Reagents were obtained from the following sources: Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA; SYBR-14 from LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, L-7011, and Mitotracker Deep Red, M-22426), DMSO (Fluka, 41640), Becton Dickinson (San Jose, CA, USA; CellWash optimised PBS, cat. no. 349524), and Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Animals and semen processing

Six Estonian Holstein (EHF) bulls from the AI station of the Animal Breeders' Association of Estonia in Kehtna, Estonia, were included in the experiment. The bulls were part of a breeding program and all semen collection and ensuing assessment and processing was performed at a bull station under commercial conditions. Semen was collected from the bulls when they were 32–44 months (hereafter called “3 years”), 63–66 months (“5 years”), and 78–90 months (“7 years”) old. Between these particular sampling periods, semen was regularly collected for commercial purposes, e.g. the bulls’ semen was continuously collected and their health status and semen quality monitored. Before a 3-year-old bull was allowed to enter the progeny testing program, his sperm concentration in neat semen had to be $\geq 4 \times 10^9/\text{mL}$ with an initial motility $\geq 60\%$; $>85\%$ of the total number of sperm had to display normal morphology and $<5\%$ could be morphologically immature (i.e. having proximal cytoplasmic droplets) [7]. Semen was collected once weekly using an artificial vagina. Two consecutive ejaculates were pooled (hereafter referred to as a “batch”), extended with a commercial extender (Triladyl[®], Minitüb, Germany), packed in 0.25 mL plastic straws, each containing $\sim 30 \times 10^6$ spermatozoa, and frozen using a programmable biological freezer. The frozen straws were stored in liquid nitrogen until tested. Two to four batches from each bull were included in the experiment. Following preservation, a post-thaw motility $\geq 50\%$ was established as the threshold. Inseminations were routinely performed within a year of freezing on heifers and cows of different parity at all seasons of the year. Non-return rates (NRR) were recorded 60 days after AI for each batch, and the data were not corrected for either season, area, or parity. The number of inseminations per batch ranged between 45 and 150 and NRRs from 52.2 to 76.0%. Results of AI were available only for 3-year-old bulls.

2.3. Semen preparation for laboratory evaluations

The semen analyses were performed either immediately after thawing (PT) or after thawing and swim-up separation (SU). The semen from two straws of the same batch was

thawed by immersion in water at +35 °C for 12 s, then pooled and used for testing. For SU, 200 µL of semen were placed under a layer of fertilization medium (400 µL Fert-TALP) [8], supplemented with fatty-acid-free BSA (6 mg/mL), sodium pyruvate (0.25 µM), heparin (5 µg/mL), D-penicillamine (20 µM), hypotaurine (10 µM), and epinephrine (1 µM). The procedure was carried out in a siliconized soda-glass tube, and after 60 min incubation (39 °C, 5% CO₂) the upper 300 µL of the medium were collected for sperm quality measurements.

2.4. Semen evaluation

Post-thaw (PT) and swim-up-treated (SU) samples were evaluated for sperm motility and concentration.

2.5. Sperm motility and concentration

Samples of 5 µL were placed in a Makler Counting Chamber (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel), and analysed using a computer-assisted motility analyser (CASA, SM-CMA, MTM Medical Technologies, Montreaux, Switzerland). Parameter settings are provided in Table 1. At least 100 spermatozoa were tracked and assessed at +38 °C to estimate the proportions of motile spermatozoa, linear-, non-linear, and circular motile spermatozoa as well as the following kinetic characteristics: straight linear velocity (VSL), average path velocity (VAP), and curvilinear velocity (VCL).

Subjective sperm motility was estimated by the same operator from the same sample (5 µL) under a phase contrast microscope (×400) equipped with warm stage (+38 °C). The mean value from evaluations of four fields was recorded. Sperm numbers in the straws and following SU were assessed in two separate counting chambers using a Bürker haemocytometer, as described by Bane [9].

2.6. Fluorochrome stain combination for flow cytometry

A 100-µM SYBR-14 stock solution was prepared in DMSO, then a 100-nM working solution was prepared in CellWash just before sample preparation. Similarly, a 1-mM Mitotracker Deep Red stock solution was prepared in DMSO, followed by the preparation of a 20-µM working solution in CellWash just before sample preparation.

Table 1
Parameter settings for CASA

| | |
|--|---------------|
| Maximum number of frames | 32 |
| Minimum number of frames | 15 |
| Cell size range | 35–300 pixels |
| Immobile objects | 10 µm/s |
| Locally motile | 25 µm/s |
| Maximum linearity value | 75% |
| Time for detection of immobile objects | 20 ms |
| Velocity class width | 5 µm/s |
| Maximum radius for circles | 25 µm |

The staining protocol was as follows: sperm samples were diluted in CellWash to a final sperm concentration of approximately 1 million per mL in 5 mL Falcon tubes. Five nM of SYBR-14 working solution and 100 nM of Mitotracker Deep Red working solution were added to the sperm samples, and they were mixed and incubated at 38 °C in the dark for 10 min and then re-mixed before analysis.

2.7. Flow cytometry measurements

Measurements were made using an LSR flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The SYBR 14 dye was excited by a 20 mW Argon ion 488 nm laser, while Mitotracker Deep Red was excited by a 17 mW HeNe 633 nm laser. SYBR 14 fluorescence (cells with intact plasma membrane) was detected on detector FL 1 (530/28 nm), while Mitotracker Deep Red fluorescence was detected on detector FL 3 (670 LP). Forward and side-scatter values were recorded on a linear scale, while fluorescent values were recorded on a logarithmic scale. Compensations were set according to Roederer [10]. Acquisitions were done using the CellQuest 3.1 software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The non-sperm events were gated out based on SYBR 14 fluorescence (DNA content). The FC was used at a low flow rate of 6–24 µL/min. Acquisitions were stopped after recording 10,000 SYBR-14-positive events. Acquisition data were stored for further analysis in list mode.

2.8. Data analysis

On SYBR-14 (FL 1/FL 2) dot plots, regions were drawn around the SYBR-14-positive cluster, and these events classified as spermatozoa. On SYBR-14/Mitotracker Deep Red dot plots, regions were drawn around the events showing dim and bright Mitotracker Deep Red fluorescence (Fig. 1). Descriptive analysis was performed using Microsoft® Excel 2000. The results were analysed statistically using the Statistical Analysis Systems package [11] including 37 observations (six bulls, two to four batches/bull, three age groups). The MIXED procedure was used for assessment of treatment influence and comparison between age groups, and the GLM procedure for testing differences among bulls. In the statistical model, “bull” was considered to be a random effect. A Pearson's correlation test was used to establish simple correlations among measured quality parameters. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Sperm motility

3.1.1. Subjective motility

The results of motility and mitochondrial activity expressed as means per bull per age group are presented in Table 2. The results did not differ significantly among the bulls in each age group ($p > 0.05$). Increase in motility was seen for 3- versus 5- ($p < 0.05$) and 3- versus 7-year-old bulls ($p < 0.05$), in both cases only after SU treatment.

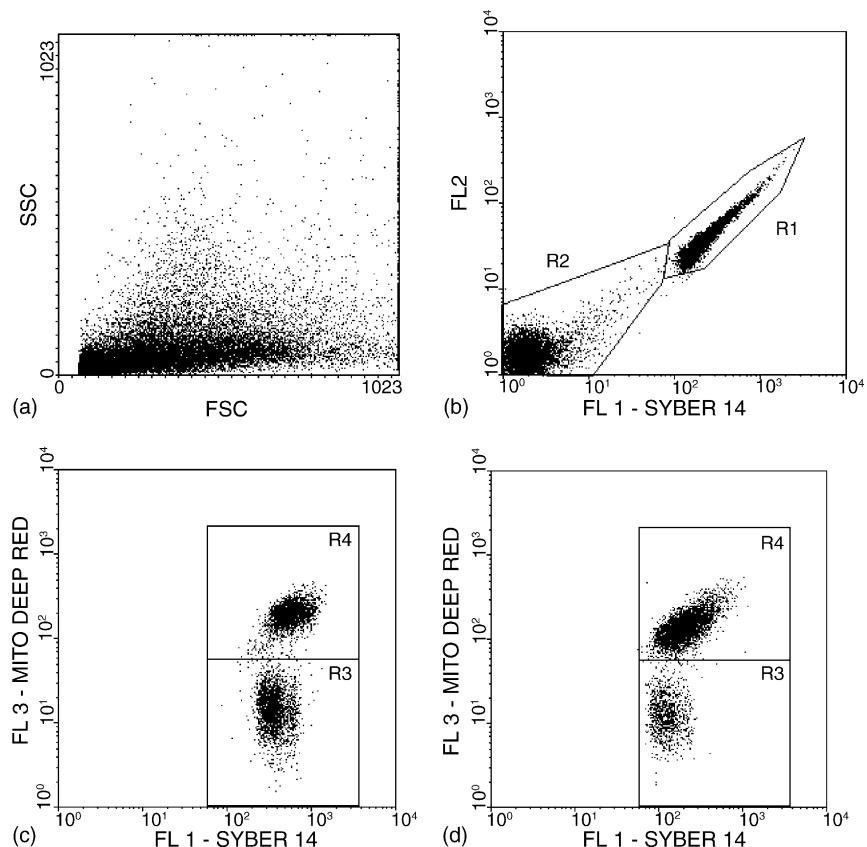


Fig. 1. Sybr 14/Mitotracker Deep Red dot plots showing the steps of gating. (a) scatter of the ungated sample, (b) regions for gating: R1—sperm, R2—extender particles. SYBR 14 vs. Mitotracker Deep Red plots are shown before (c) and after swim-up (d). R3 are sperm cells with low Deep Red fluorescence, and R4 are those with high fluorescence.

3.1.2. CASA-assessed motility

The results for the semen from some 7-year-old bulls (SU) differed significantly ($p < 0.05$) from each other. There were no differences in terms of CASA-assessed motility between age groups either after SU or PT. Both subjective and computerized evaluations showed significantly better motility after SU than PT: $p < 0.01$ (for semen from bulls aged 3 years), $p < 0.01$ (5 years), $p < 0.001$ (7 years), and $p < 0.001$ when all age groups were combined. The proportion of linear motile spermatozoa was lower after SU than PT: n.s. (3 years), $p < 0.05$ (5 years), $p < 0.001$ (7 years), and $p < 0.01$ when all age groups were combined. The proportion of circular motile spermatozoa was also lower after SU than PT: n.s. (3 years), $p < 0.001$ (5 years), n.s. (7 years), and $p < 0.05$ when all age groups were combined. The proportion of non-linear motile spermatozoa was higher after SU than PT: n.s. (3 years), $p < 0.01$ (5 years), $p < 0.01$ (7 years), and $p < 0.01$ when all age groups were combined. For VSL, there were no significant differences between PT and SU.

Table 2

Motility (determined by subjective and computer-assisted analysis) and mitochondrial membrane potential of six bulls at three different ages (means \pm S.D.)

| Age | Bull no. | PT | | | SU | | |
|-----|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| | | Microscopic evaluation | | FCM | Microscopic evaluation | | FCM |
| | | Subject | CASA | | Subject | CASA | |
| 3 | 1 | 72.8 \pm 15.4 | 67.1 \pm 12.5 | 58.4 \pm 4.8 | 77.1 \pm 23.5 | 77.1 \pm 19.6 | 67.1 \pm 18.8 |
| | 2 | 59.4 \pm 9.2 | 65.8 \pm 10.5 | 43.6 \pm 10.7 | 79.6 \pm 12.6 | 82.3 \pm 6.7 | 67.0 \pm 26.5 |
| | 3 | 57.9 \pm 14.8 | 57.2 \pm 18.3 | 37.5 \pm 30.4 | 68.1 \pm 29.2 | 81.4 \pm 0 | 33.3 \pm 7.2 |
| | 4 | 68.8 \pm 7.8 | 61.3 \pm 12.4 | 44.6 \pm 3.1 | 85.0 \pm 3.5 | 78.5 \pm 0.7 | 54.3 \pm 30.8 |
| | 5 | 65.4 \pm 8.0 | 72.0 \pm 8.6 | 53.0 \pm 9.5 | 82.5 \pm 0 | 78.6 \pm 0 | 71.0 \pm 9.7 |
| | 6 | 60.6 \pm 18.6 | 68.2 \pm 16.5 | 59.7 \pm 4.8 | 86.3 \pm 0 | 80.4 \pm 0 | 78.6 \pm 3.9 |
| 5 | 2 | 75.4 \pm 6.9 | 69.4 \pm 0.3 | 49.7 \pm 10.7 | 95.0 \pm 0 | 81.7 \pm 4.1 | 78.8 \pm 5.4 |
| | 4 | 62.9 \pm 12.8 | 65.0 \pm 8.2 | 44.4 \pm 2.1 | 89.5 \pm 7.3 | 76.9 \pm 6.9 | 78.2 \pm 10.2 |
| 7 | 1 | 61.3 \pm 15.2 | 67.2 \pm 12.7 | 49.8 \pm 12.0 | 97.0 \pm 1.1 | 89.0 \pm 3.0 | 83.9 \pm 11.9 |
| | 2 | 61.7 \pm 5.8 | 66.5 \pm 1.2 | 47.6 \pm 6.1 | 91.9 \pm 5.1 | 76.1 \pm 6.8 | 72.3 \pm 16.8 |
| | 4 | 56.3 \pm 4.5 | 61.9 \pm 3.4 | 45.8 \pm 4.3 | 90.0 \pm 8.7 | 82.9 \pm 3.2 | 75.2 \pm 5.0 |
| | 5 | 50.8 \pm 6.5 | 61.8 \pm 1.7 | 48.9 \pm 7.5 | 90.4 \pm 7.9 | 82.5 \pm 3.3 | 75.1 \pm 17.5 |
| | Mean \pm S.D. | 62.8 \pm 10.5 | 65.3 \pm 8.8 | 48.6 \pm 8.8 | 86.0 \pm 9.9 | 80.6 \pm 6.0 | 69.6 \pm 13.6 |

Each value represents two to four batches of bull semen.

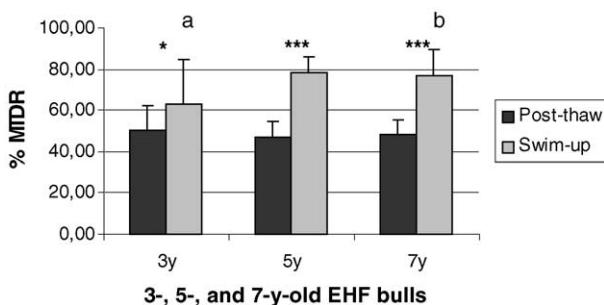


Fig. 2. Mitochondrial activity of sperm from 3-, 5-, and 7-year-old Estonian Holstein AI bulls (EHF) after thawing and swim-up treatment (means \pm S.D. of two to six bulls). Significant differences between post-thawing and swim-up treatment are indicated ($^* p < 0.05$, $^{***} p < 0.001$). Different letters above bars indicate differences among ages within treatment ($p < 0.05$).

selected semen but VAP was higher in SU sample than PT: $p < 0.01$ (3 years), $p < 0.001$ (5 years), $p < 0.01$ (7 years), and $p < 0.001$ when all age groups were combined. Similar increase gave VCL: $p < 0.001$ (3 years), $p < 0.001$ (5 years), $p < 0.001$ (7 years), and $p < 0.001$ when all age groups were combined.

3.1.3. Sperm numbers

After SU, the percentage of spermatozoa recovered from the number found in PT sample ranged as follows among the bulls (ranges among batches presented between parentheses): 3y bulls: 2.3–3.7 % (0.8–5.5 %); 5y bulls: 2.7–5.2 % (2.3–6.2 %); and for 7y bulls: 3.5–5.4 % (2.5–6.8 %). The results for some 5- and 7-year-old bulls (PT) differed significantly ($p < 0.05$) from each other. The proportion of motile spermatozoa recovered from PT samples (assessed by CASA) ranged as follows among the bulls (ranges among batches presented between parentheses): 3y bulls: 57.2–72.0 % (42.3–85.3 %); 5y bulls: 65.0–69.4 % (58.6–74.2 %); and for 7y bulls: 61.8–67.2 % (53.5–78.5 %). After SU, the corresponding ranges were 2.3–4.3 % (1.4–4.7 %; 3y bulls), 1.9–4.3 % (1.7–5.3 %; 5y bulls), and 3.2–4.1 % (2.1–5.4 %, 7y bulls). The results did not differ significantly among bulls or between ages ($p > 0.05$). As expected, less spermatozoa were recovered post-SU selection than after PT ($p < 0.001$).

3.1.4. Evaluation of mitochondrial function

The results differed significantly among some 3-year-old bulls after SU ($p < 0.05$) (Fig. 2). There were no significant differences in terms of mitochondrial function between the age groups after thawing; following SU, however, the semen from 7-year-old bulls showed significantly improved mitochondrial function compared to that of semen from 3-year-old bulls ($p < 0.05$). The tendency was seen also in semen from the 3- and 5-year-old groups ($p = 0.06$). Significantly more spermatozoa showed high red fluorescence after SU treatment than after thawing: $p < 0.05$ (for semen from bulls aged 3 years), $p < 0.001$ (5 years), $p < 0.001$ (7 years), and $p < 0.001$ when all age groups were combined. The percentages of spermatozoa with high MMP post-thawing correlated well with the respective results obtained after SU ($p < 0.01$).

3.1.5. Relationship between sperm motility, numbers of motile spermatozoa, and mitochondrial status (MMP)

There was a positive correlation between sperm motility and MMP ($p < 0.01$) for semen both PT and after the SU procedure. The relationship existed for both subjectively- and CASA-evaluated motility after thawing, but only for the subjective motility evaluation post SU. Also, a positive correlation between number of motile spermatozoa and MMP after SU was recorded ($p < 0.01$).

3.1.6. Relationship to NRR

The 60d-NRR (2–4 batches per bull) ranged from 52.2 to 76.0% (141–392 inseminations per bull) with differences among batches within two bulls ($p < 0.05$). The proportion of spermatozoa with high mitochondrial activity (high MMP) as determined by Mitotracker Deep Red 633 did not correlate statistically with fertility, neither PT nor after SU. Only motility parameters measured by CASA after SU had a relationship to NRR; these were: total motility ($p < 0.01$), proportion of linear motile spermatozoa ($p < 0.05$), numbers of motile spermatozoa ($p < 0.05$) and VAP ($p < 0.001$).

4. Discussion

The present study investigated the effectiveness of the cationic lipophilic dye MitoTracker Deep Red 633 (M-22426) at binding mitochondria in frozen-thawed bovine spermatozoa derived from sires at various ages, in an attempt to find a more objective method of evaluating sperm quality than the current subjective motility evaluations. The results were obviously compared with those of microscopic and CASA sperm motility analyses. A swim-up test was used to measure the ability of the probe to differentiate spermatozoa possessing various degrees of motility.

Accumulation in mitochondria is characteristic of many fluorescent dyes, such as Rhodamine 123 (R123), MitoTracker Green (MTG), JC-1, MitoTracker Orange (CMTMRos), MitoTracker Red (CMXRos), MitoTracker Red 580, and MitoTracker Deep Red 633 [12–15]. Despite of numerous published protocols, there are several problems connected with most of these fluorophores. For instance, R123 is washed out of cells when mitochondria experience losses of membrane potential, thus limiting its use in cases when the energetic state of the mitochondria is affected (Molecular probes, product information). It is also not reliable because of its low sensitivity and the presence of several energy-independent binding sites in mitochondria [12,16]. Mitotracker Green seems to label all mitochondria regardless as to their membrane potential (Molecular Probes Handbook, 6). It is therefore most commonly used for mitochondrial localisation, size, and structure measurements; it is not, however, suitable for evaluating mitochondrial functional status. The advantage of JC-1 is its ability to differentiate between high and low membrane potentials. The fluorophore JC-1 changes (reversibly) its fluorescent pattern from green to orange owing to increases in MMP. However, it does not work properly on frozen–thawed semen, probably due to interactions with the extender [17]. Moreover, since the fluorophore is the same, there is a need for two FC detectors to detect green and orange fluorescence, which is not suitable when attempting a multiparameter assay [5]. The

company Molecular Probes offers an array of Mitotracker probes, but the information available about their staining/binding mechanism is incomplete [6]. Available reduced versions of Mitotracker Orange and Red probably measure membrane potential. However, their excitation wavelengths are not appropriate for commercial top-bench FC and require more complicated and expensive instrumentation.

On average, the results obtained from flow cytometric measurements of mitochondrial function were 10–15% lower than the recordings of motility, either subjectively or as measured by CASA. Such a difference between subjective motility evaluations and FC evaluations of mitochondrial activity is in line with that reported in several other publications [13,14,18]. The difference has previously been explained by human error, in terms of overestimation of the proportion of motile cells [13,14]. However, if CASA is more precise than the visual motility evaluation, we should not have the same discrepancy between cytometric and motility results. The reason for such discrepancy needs to be clarified. The SD for subjective motility evaluation was >15%, while the SD for FC measurements was reported to be <4% by Garner et al. [13]. In the present research we did not notice any smaller variability in FC results than that reported in the literature. The results for subjectively assessed motility and mitochondrial function always tended to increase with age, from the 3- versus the 7-year-old age group, following the SU treatment ($p < 0.05$). Such a trend already existed in the 3- versus the 5-year-old group, being significant ($p < 0.05$) for motility but only showing a tendency ($p = 0.06$) for mitochondrial activity. We reported a similar increase in a previous study [19] in which 1- and 4-year-old Swedish bulls were used, with the exception that the results were gained in the PT sample and not after SU. This might suggest that spermatozoa capable of reaching the oocyte may also be influenced by the age of the sire in a long perspective. Since the semen samples used for present study were from different freezing dates, the cause of increased motility could well lie in there or in unexpected variations during the processing of semen over this period. Also, both motility tests and FC were able to detect that swim-up selects highly motile spermatozoa from the bulk population present in the AI dose. These findings are also in agreement with our previous results obtained from Swedish Red Breed sires [19]. As the FC measurements provided data similar to that obtained by conventional semen analysis, this indicates that MitoTracker Deep Red 633 (M-22426) is suitable for evaluating mitochondrial function as a marker of sperm viability. Since it is linked with the greater objectivity arising from the assessment of thousands of cells by FC, this method is thus preferable to subjective microscopic or more objective CASA analyses. Albeit indeed more expensive, flow cytometry is much more powerful as a research tool, considering the speed, precision and the possibility to combine with other fluorochromes in a multiparameter assay. As a single parameter, as measured after SU, the evaluation of selected, highly motile spermatozoa could be preferable to studies of bulk semen samples during quality trials, mostly due to the relationship of motility and fertility. In conclusion, we find MitoTracker Deep Red 633 (M-22426) to be a reliable marker of frozen-thawed bovine semen viability both PT and after SU. The lack of a statistical relationship between mitochondrial staining and fertility might most likely reside in the low number of sires and/or inseminations included in the material studied and on the relatively high numbers of viable spermatozoa present in the AI-doses that could mask differences among these variables.

Acknowledgements

This study was supported by the Royal Swedish Academy of Forestry and Agriculture (KSLA), the Swedish Farmer's Foundation for Research in Agriculture (SLF), the Swedish Institute (SI), and the Estonian Science Foundation (ETF) (Grant 4807). We thank the Animal Breeders' Association of Estonia for providing us with frozen semen and the fertility data and Mr. Tanel Kaart for statistical assistance.

References

- [1] Budworth PR, Amann RP, Chapman PL. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 1988;9:41–54.
- [2] Holt C, Holt WV, Moore HDM, Reed HCB, Curnock RM. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl* 1997;18:312–23.
- [3] Graham JK. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 2001;68:239–47.
- [4] Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J Histochem Cytochem* 1982;30:279–80.
- [5] Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod* 2003;68:1828–35.
- [6] Gregory J. Handbook of fluorescent probes and research products. Eugene OR, USA: Molecular Probes; 2002.
- [7] Söderquist L, Janson L, Larsson K, Einarsson S. Sperm morphology and fertility in A.I. bulls. *Zentralbl Veterinarmed A* 1991;38:534–43.
- [8] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988;38:1171–80.
- [9] Bane A. A study on the technique of hemocytometric determination of sperm motility and sperm concentration in bull semen. *Cornell Veterinarian* 1952;42:518–31.
- [10] Roederer M. Compensation (an informal perspective). 2000; <http://www.drmr.com/compensation>, 24 May 2000.
- [11] SAS Institute Inc. SAS® Language and procedures: introduction, Version 6, first edition, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1990.
- [12] Cossarizza A. Measure of mitochondrial membrane potential ($\Delta \Psi$) with fluorescent probe JC-1. <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/flow/vol3/16/data/page13.htm>.
- [13] Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette M, Marshall CE. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 1997;57:1401–6.
- [14] Gravance CG, Garner DL, Miller MG, Berger T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod Toxicol* 2000;15:5–10.
- [15] Ericsson SA, Garner DL, Thomas CA, Downing TW, Marshall CE. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology* 1993;39:1009–24.
- [16] Troiano L, Granata ARM, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, et al. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res* 1998;241:384–93.
- [17] Garner DL, Thomas CA. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol Reprod Dev* 1999;53:222–9.

- [18] Wu CT, Bollwein H, Weber F, Stolla R. Effects of scrotal insulation on sperm mitochondrial membrane potential, motility, head abnormality and chromatin structure in bulls. *Reprod Dom Anim* 2003;38:329 [abstract].
- [19] Hallap T, Håård M, Jaakma Ü, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish Red and White AI sires at one and four years of age. *Int J Androl* 2004;27:166–71.



Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls

Triin Hallap ^{a,c,*}, Szabolcs Nagy ^{a,b,d}, Ülle Jaakma ^c,
Anders Johannisson ^b, Heriberto Rodriguez-Martinez ^a

^aDivision of Comparative Reproduction, Obstetrics and Udder Health, Department of Clinical Sciences,
Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU),
Ullvägen 14C, Clinical Center, P.O. Box 7054, Ultuna SE-750 07, Uppsala, Sweden

^bDepartment of Anatomy and Physiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science,
Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Uppsala, Sweden

^cDepartment of Reproductive Biology, Estonian Agricultural University, Tartu, Estonia

^dResearch Institute for Animal Breeding & Nutrition, Herceghalom, Hungary

Received 11 May 2005; received in revised form 22 July 2005; accepted 31 July 2005

Abstract

In a situation where technology allows for the simultaneous measurement of numerous parameters of a single sperm cell, it becomes crucial to choose those parameters which may be useful in estimating in vivo fertility. Sperm membrane destabilization is believed to occur during chilling of semen, although its effect on the post-thaw (PT) fertility of the spermatozoa has not yet been fully assessed. For this reason, we tested a new combination of fluorophores, Merocyanine 540 (M540)/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 (H33342), to detect sperm plasma membrane destabilization in bull spermatozoa conventionally processed for artificial insemination (AI). The samples were tested by flow cytometry (FC), both immediately PT and following an in vitro

* Corresponding author. Tel.: +46 18672323; mobile: +372 55615149; fax: +372 6507531.
E-mail address: trin.hallap@kv.slu.se (T. Hallap).

swimup (SU) technique, and results were thereafter compared with conventional sperm quality measurements (of concentration, motility, morphology, and membrane integrity), including *in vivo* fertility. Semen samples from six Estonian Holstein (EHF) AI bulls, frozen when the sires were aged 3, 5, and 7 years, allowed us to test the effect of bull age on quality of semen. Plasma membrane stability correlated to motility, normal head morphology ($p < 0.05$), and membrane integrity ($p < 0.01$). Following the SU selection, motility, membrane integrity ($p < 0.001$), and membrane instability increased ($p < 0.01$), as did stability ($p < 0.05$). Bull age did not influence the degree of sperm membrane destabilization, except for the 3-year sample versus 7-year sample, in which the proportion of spermatozoa with destabilized plasma lemma increased PT ($p < 0.05$) without affecting membrane integrity. Only parameters measured after SU, such as proportion of total motile and linearly motile spermatozoa, assessed with computer-assisted sperm analysis (CASA) ($p < 0.01$), average path velocity (VAP) ($p < 0.001$), and percentage of spermatozoa with unstable plasma lemma ($p < 0.05$), had a significant relationship with non-return rate (NRR). The results indicate that a triple combination of the fluorophores M540/Yo-Pro 1/H33342 is suitable for monitoring the status of membrane stability in frozen-thawed (FT) bull spermatozoa. As well, a SU preselection method seems helpful in distinguishing relationships between sperm quality and fertility among bulls in a homogenous sire population.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Frozen-thawed semen; Plasma membrane stability; Merocyanine 540 (M540)/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 (H33342); Fertility; Bull

1. Introduction

The assessment of semen quality has moved towards rapid and objective methods, such as computer-assisted sperm analysis (CASA) [1,2] and flow cytometry (FC), which are now widely used, replacing laborious, time-consuming, and subjective light microscopy screening. Flow cytometry makes it possible to evaluate more than 1000 cells per second and has been successfully used to describe changes in sperm structure and function [3].

It is widely known that spermatozoa bind to an ovum only after capacitation in the female genital tract [4,5]. During this process, the sperm plasma membrane becomes dynamically reorganized (lipid order-disorder transition and protein relocation) [6]. Since capacitation destabilizes the sperm plasma membrane, it can be assumed that when capacitation occurs prematurely, leading to acrosome exocytosis or cell death, fertilization is impaired [7,8]. It is also known that chilling of spermatozoa causes changes in the plasma membrane, which resemble changes seen during physiological capacitation [8]. The question as to whether these changes are really a sign of capacitation or only a destabilization of the membrane is still debated [9]. Recent evidence suggests that changes in the scrambling of plasma membrane phospholipids of cryopreserved boar spermatozoa differ from those in fresh semen undergoing bicarbonate-induced capacitation [10]. The hydrophobic dye Merocyanine 540 (M540) can be employed to monitor the level of scrambling of the phospholipids of the plasma membrane lipid bilayer, increasing the intensity of its fluorescence with an increase in the membrane lipid disorder [6,11]. Such disorder is indicative of membrane destabilization, similar to that occurring during the first

steps of capacitation [11,12]. In addition, M540 staining can be combined with the membrane-impermeable DNA-binding probe Yo-Pro 1 to simultaneously analyze sperm cell viability. Any non-sperm event, such as the presence of DNA-free biological debris present in semen extenders, could be excluded based on a lack of Hoechst 33342 (H33342) signal.

Knowledge of the amount of viable spermatozoa with a stable plasma membrane in the inseminate would give very valuable information about its quality [13]. It would also be of interest to disclose whether these cells, which have preserved their membrane stability after freezing and thawing, would capacitate, and how many would capacitate, when challenged with effectors of capacitation (e.g., heparin) during sperm preselection, for instance, through swimup (SU). The SU semen preparation method is used to mimic sperm selection during sperm transport. It is routinely used prior to in vitro fertilization (IVF) to both cleanse and select highly motile spermatozoa, and some quality variables of the selected sperm population, such as linear motility and the number of spermatozoa enriched by the procedure, have correlated with in vivo fertility [14,15]. Since the capacitating ability of heparin, used in such IVF medium, is well known [16], our hypothesis was that a population of spermatozoa able to destabilize their membrane (as when capacitation occurs) after SU relates to in vivo fertility of the same samples. The present study investigated, therefore, whether (i) the occurrence of destabilizing changes in the sperm plasma membrane of frozen-thawed (FT) bull spermatozoa could be monitored with a triple combination of fluorophores and FC; (ii) a SU procedure causes destabilization of post-thaw (PT)-stable spermatozoa; (iii) sire age affects membrane destabilization in FT spermatozoa; (iv) a relationship exists between the proportion of spermatozoa with unstable membranes and the in vivo fertility achieved by artificial insemination (AI) of the same processed ejaculates.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and media

Unless otherwise stated, all media components were purchased from Sigma, St. Louis, MO, USA, or Becton Dickinson, San Jose, CA, USA. The basic culture medium used for sperm treatment was Tyrode's solution (Fert-TALP) [16].

2.2. Animals and semen processing

Semen from six Estonian Holstein (EHF) bulls kept at the AI station of the Animal Breeders' Association of Estonia in Kehtna, Estonia, was used in the experiment. The bulls were part of a breeding program and all collections and freezing of semen were performed at the AI station under commercial conditions. Before being included in the progeny testing program, a young bull must produce semen with a total sperm number of $\geq 4 \times 10^9$ and an initial sperm motility of $\geq 60\%$, with $>85\%$ spermatozoa of the total sperm number depicting normal morphology [17]. The age of EHF bulls at the time of first collection for this experiment was 32–44 months (hereafter referred to as "3 years"). Semen was

collected from the same sires at 63–66 months (“5 years”) and at 78–90 months (“7 years”) of age.

Semen was collected for commercial purposes before and between the sampling for this experiment. Semen was collected once weekly using an artificial vagina. Two consecutive ejaculates were pooled (hereafter referred to as a “batch”), extended with a commercial extender (Triladyl®, Minitüb, Altdorf, Germany), packed in 0.25 mL plastic straws, each containing $\sim 30 \times 10^6$ spermatozoa, and frozen using programmable biological freezers. The cooling started at +4 °C with a speed of 12.5 °C/min to reach –96 °C before storing in LN₂. The frozen straws were stored in liquid nitrogen until tested. Following preservation, a PT motility of $\geq 50\%$ was set as threshold value.

Within 1 year of freezing, inseminations were routinely performed in heifers and cows of different parity. Inseminations were performed during all seasons of the year. Two to four batches from each bull were included in the experiment. The results of the AI were available only for the 3-year-old bulls and the number of inseminations per batch ranged from 45 to 150. Non-return rates (NRRs) 60 days after AI were recorded for each batch but not corrected for season, area, and parity.

2.3. Semen preparation for laboratory evaluations

The semen analyses were performed immediately after thawing (i.e., PT), and after thawing and SU separation. The semen from two straws of the same batch was thawed by immersion in water at +35 °C for 12 s, pooled, and used for testing. For SU, 200 µL of semen was placed under a layer of fertilization medium (400 µL Fert-TALP) [13], supplemented with fatty acid-free bovine serum albumin (BSA) (6 mg/mL), sodium pyruvate (0.25 µM), heparin (5 µg/mL), D-penicillamine (20 µM), hypotaurine (10 µM), and epinephrine (1 µM). The procedure was carried out in a siliconized soda-glass tube and, after 60 min’ incubation (39 °C, 5% CO₂), the upper 300 µL of the medium was collected for sperm quality measurements.

2.4. Sperm motility and concentration

Samples of 5 µL were placed in a Makler Counting Chamber (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) and analyzed with a computer-assisted motility analyzer (SM-CMA, MTM Medical Technologies, Montreaux, Switzerland). The settings of the instrument for the recording of sperm motility in the semen samples are shown in Table 1. At least 100 spermatozoa were tracked and assessed at +38 °C to estimate the proportions of motile spermatozoa and the proportions showing linear, non-linear, and circular motility. The kinetic characteristics of motility that were recorded were straight linear velocity (VSL), average path velocity (VAP), and curvilinear velocity (VCL). The percentages of linearly motile spermatozoa were calculated manually from the total population of spermatozoa present in the fields. Subjective sperm motility was estimated from the same sample (5 µL) under a phase contrast microscope ($\times 400$) equipped with a warm stage (+38 °C). The mean value from the observation of four fields was recorded. Sperm concentration was assessed in two separate counting chambers of a Bürker hemocytometer, as described by Bane [18], and expressed as spermatozoa $\times 10^6$ mL⁻¹. The same operator performed all analyses.

Table 1

Parameter settings for computer-assisted sperm analysis (CASA)

| | |
|--|---------------------------|
| Maximum no. of frames | 32 |
| Minimum no. of frames | 15 |
| Cell size range | 35–300 pixels |
| Immobile objects | 10 $\mu\text{m}/\text{s}$ |
| Locally motile | 25 $\mu\text{m}/\text{s}$ |
| Maximum linearity value | 75% |
| Time for detection of immobile objects | 20 ms |
| Velocity class width | 5 $\mu\text{m}/\text{s}$ |
| Maximum radius for circles | 25 μm |

2.5. Sperm membrane integrity

A combination of the fluorophores SYBR-14 and propidium iodide (PI) (Sperm Viability Kit L-7011, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) was used, as described by Januskauskas et al. [19]. Semen samples (100 μL) were extended in 400 μL Tris–citrate with addition of 2.7 μL PI and 10 μL SYBR-14, which resulted in final dye concentrations of 24 μM and 100 nM, respectively. After incubation at 37 °C for 15–20 min, 2 \times 100 spermatozoa were assessed on a warm stage (+37 °C) under epifluorescence, using a microscope (Laborlux-11, Leitz, Jena, Germany) ($\times 600$) equipped with a ParaLens® objective lens set (Becton Dickinson, Leiden, The Netherlands). The nuclei of spermatozoa with intact plasma membranes stained green with SYBR-14, while those with damaged membranes stained red with PI. The results are expressed as percentage of cells with intact membranes.

2.6. Sperm morphology

Sperm morphology was evaluated in wet preparations of semen fixed in buffered formalin [18] or in air-dried smears stained with carbol-fuchsine [20]. In the wet preparations, 200 cells were counted under a phase contrast microscope ($\times 1000$) and the frequencies of abnormal acrosomes and midpieces, as well as those of coiled tails, were recorded. Head abnormalities were monitored in the stained smears by counting 200 spermatozoa under a light microscope ($\times 1000$). Heads that were pear-shaped, narrow at the base, abnormal in contour, loose, undeveloped, narrow, or variable in size were registered. For each region of the spermatozoa, the number of morphological abnormalities was expressed as a percentage of the total cells evaluated.

2.7. Description of the sperm plasma membrane stability measurement

The following working solutions were prepared: M540 (Molecular Probes, M 24571): 1 mM in dimethyl sulfoxide (DMSO); Yo-Pro 1 (Molecular Probes, Y 3603): 25 μM in DMSO; H33342: 5 mg/mL in distilled water. Suspensions of FT spermatozoa before (i.e., PT) and after SU were extended to approximately $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ in CellWash (CellWash optimized PBS, cat. no. 349524, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) in 5 mL Falcon

tubes containing 1 μ L Yo-Pro 1, 2.6 μ L M540, and 2 μ L H33342 working solutions. Stained samples were incubated at 38 °C in the dark for 10 min and remixed before analysis.

Measurements were done on an LSR flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The M-540 and Yo-Pro 1 dyes were excited by a 20 mW argon ion 488 nm laser, while H33342 was excited by a helium–cadmium (HeCD) ultraviolet (UV) 325 nm 8 mW laser. Yo-Pro 1 fluorescence was detected on detector FL1 (530/28 nm), M540 fluorescence was detected on detector FL3 (670 LP), and H33342 fluorescence was detected on detectors FL4 (510/20 nm) and FL5 (380 LP). Forward and side scatter values were

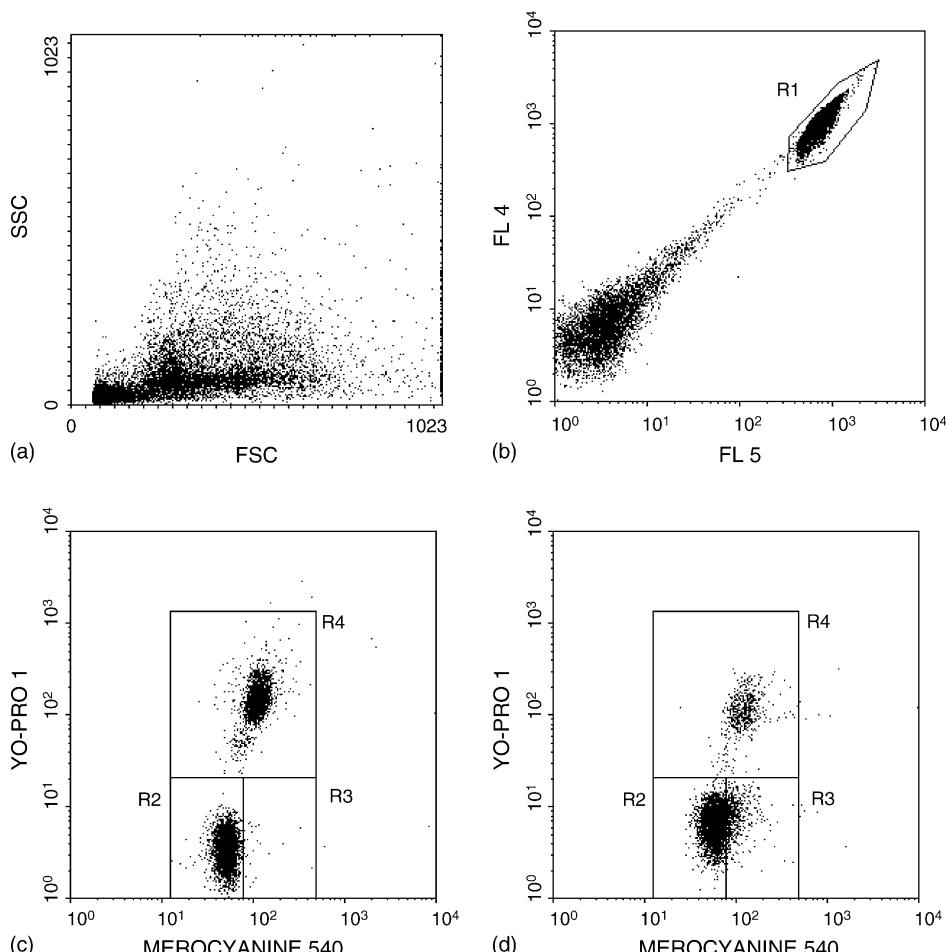


Fig. 1. Merocyanine 540 (M540)/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 dot plots showing the following steps of gating: (a) scatter of the ungated sample and (b) fluorescent gating on H33342 fluorescence. Merocyanine 540 vs. Yo-Pro 1 plots are shown (c) before and (d) after swimup (SU). R1, sperm; NOT R1, extender, debris, etc. outside the R1 region; R2, viable, stable (non-capacitated) membrane; R3, viable, unstable (capacitated-like) membrane; R4, dead. Region positions were not changed.

recorded on a linear scale, while fluorescent values were recorded on a logarithmic scale. Compensations were set according to Roederer [21]. Acquisitions were done using the CellQuest 3.3 Software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The non-sperm events were gated out based on H33342 fluorescence (DNA content). The flow cytometer was used at a low flow rate of 6–24 $\mu\text{L}/\text{min}$. Acquisitions were stopped after recording 10,000 H33342-positive events. Acquisition data were stored in list mode until further analyses. On FL1/FL3 (Yo-Pro 1/M540) dot plots, regions were set to differentiate viable and stable plasma membrane (Yo-Pro 1-negative and M540-negative), viable and unstable plasma membrane (Yo-Pro 1-negative and M540-positive), and dead (Yo-Pro 1-positive) events (Fig. 1).

2.8. Data analysis

Descriptive analyses were done with Microsoft[®] Excel 2000. The results of 37 observations (six bulls, two to four batches/bull, three age groups) were analyzed statistically by means of the Statistical Analysis Systems (SAS) package [22]. The MIXED procedure was used for comparisons between sire age groups, and assessment of treatment influence, while the GLM procedure was used for among-bull differences. In the analysis of treatment and age influence, bull was considered as a random effect. A Pearson's correlation test was used to establish simple correlations among measured quality parameters. Differences were considered significant if $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of sire age on sperm morphology, motility, viability, and membrane stability

The proportions of sperm abnormalities present in semen from the different age groups (Table 2) did not surpass those usually considered acceptable for healthy AI sires. The results from subjective motility evaluations did not differ significantly among the bulls in each age group ($p > 0.05$), but increases in motility were seen for 3-year-old versus 5-year-old ($p < 0.05$) and 3-year-old versus 7-year-old bulls ($p < 0.05$), in both cases only after SU treatment (Table 2). The CASA-assessed motility results differed significantly among some 7-year-old bulls (SU) ($p < 0.05$), but there were no significant differences between age groups, either PT or after SU. Linearly motile cells and VAP had no age-related difference either. Sperm concentration PT of some 5- and 7-year-old bulls showed significant differences ($p < 0.05$). The proportions of spermatozoa with an intact membrane did not differ among bulls, but were significantly higher in semen from the 7-year-old group than in semen from the 3-year-old (PT) or the 5-year-old group (SU) ($p < 0.05$) (Table 2). The proportion of spermatozoa showing destabilization of the membrane (high M540 fluorescence) did not differ significantly among bulls within each age group ($p > 0.05$). Neither were there any differences between age groups, except for the 3-year-old versus the 7-year-old group, in which the proportion of spermatozoa with unstable membranes increased PT ($p < 0.05$) (results summarized in Fig. 2).

Table 2

Sperm quality variables post-thaw (PT) and after swimup (SU) in semen collected when the bulls were 3, 5, and 7 years old

| Variable | After thawing (PT) | | | After swimup (SU) | | | <i>T. Hallap et al. / Theriogenology 65 (2006) 1122–1136</i> |
|---|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| | 3 years | 5 years | 7 years | 3 years | 5 years | 7 years | |
| Abnormal acrosomes (%) | 13.4 ± 13.9 | 22.4 ± 11.2 | 21.2 ± 7.0 | 16.1 ± 11.8 ^a | 12.9 ± 2.1 ^{ab} | 8.5 ± 3.1 ^b | |
| Abnormal midpieces (%) | 0 ± 0 ^a | 0.5 ± 0.5 ^{ab} | 0.9 ± 0.7 ^b | 0.3 ± 0.6 | 0.4 ± 0.8 | 0.2 ± 0.3 | |
| Abnormal tails (%) | 20.0 ± 22.6 | 16.9 ± 4.4 | 5.9 ± 8.1 | 3.3 ± 2.6 ^a | 2.5 ± 1.2 ^{ab} | 1.4 ± 0.4 ^b | |
| Abnormal head shape (%) | 2.7 ± 1.8 | 2.5 ± 1.3 | 3.1 ± 1.4 | 4.0 ± 3.2 | 2.5 ± 1.5 | 2.0 ± 1.5 | |
| Sperm concentration (10^6 mL^{-1}) | 256.6 ± 23.1 ^{ab} | 298.9 ± 35.8 ^a | 194.0 ± 12.5 ^b | 7.5 ± 1.1 | 11.2 ± 1.8 | 8.6 ± 0.5 | |
| Subjective motility (%) | 64.5 ± 2.8 | 69.1 ± 4.7 | 57.5 ± 2.6 | 78.7 ± 04.5 ^a | 92.2 ± 2.2 ^b | 92.3 ± 1.8 ^{bc} | |
| CASA-assessed overall motility (%) | 65.2 ± 2.8 | 67.2 ± 2.3 | 64.3 ± 1.8 | 79.6 ± 2.9 | 79.3 ± 2.3 | 82.6 ± 1.7 | |
| Concentration of motile spermatozoa (CASA, $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) | 169.0 ± 8.4 ^{ab} | 200.6 ± 25.9 ^a | 124.5 ± 8.5 ^b | 8.5 ± 1.0 | 8.9 ± 1.6 | 7.2 ± 0.5 | |
| Concentration of motile spermatozoa (subj., $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$) | 172.6 ± 19.8 ^{ab} | 203.4 ± 25.6 ^a | 110.5 ± 7.7 ^b | 8.4 ± 1.1 | 10.3 ± 1.8 | 8.0 ± 0.5 | |
| CASA-assessed linear motility (%) | 40.0 ± 3.0 | 36.6 ± 5.1 | 36.1 ± 2.4 | 34.8 ± 5.7 | 22.4 ± 6.2 | 22.1 ± 3.0 | |
| VAP ($\mu\text{m/s}$) | 87.4 ± 6.8 | 95.3 ± 1.5 | 96.8 ± 2.0 | 115.5 ± 4.3 | 122.9 ± 2.6 | 121.2 ± 6.4 | |
| Membrane integrity (SYBR-14, %) | 56.4 ± 2.2 ^a | 63.0 ± 5.3 ^{ab} | 65.7 ± 2.0 ^b | 76.9 ± 3.1 ^{ab} | 68.1 ± 2.9 ^a | 79.2 ± 2.5 ^b | |
| Stable membrane (%) | 54.3 ± 1.9 | 51.8 ± 2.6 | 54.3 ± 2.2 | 59.5 ± 5.0 | 66.2 ± 10.8 | 65.3 ± 6.8 | |
| Unstable membrane (%) | 0.8 ± 0.1 ^a | 0.8 ± 0.3 ^{ab} | 1.9 ± 0.5 ^b | 2.7 ± 0.5 | 5.0 ± 3.4 | 4.3 ± 1.3 | |
| Dead (%) | 44.7 ± 1.9 | 47.3 ± 2.6 | 43.5 ± 2.5 | 37.7 ± 4.8 | 28.3 ± 10.0 | 30.0 ± 6.8 | |

Results for six (3 years), two (5 years), and four (7 years) bulls are presented as means ± standard error of the mean (S.E.M.). Means in the same row (within one preparation method) not sharing the same superscript letters (a, b and ab) differ significantly ($p < 0.05$). CASA, computer-assisted sperm analysis; VAP, average path velocity.

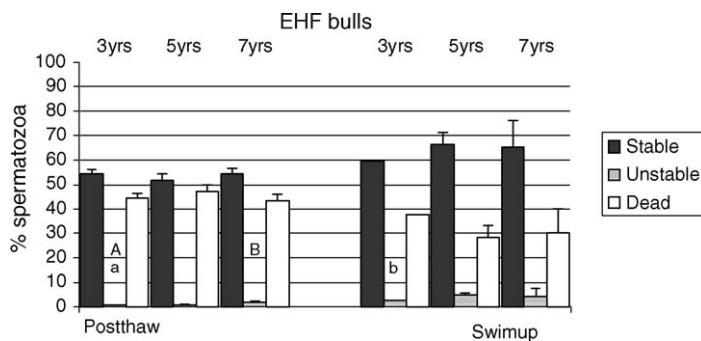


Fig. 2. Plasma membrane stability and cell viability of 3-, 5-, and 7-year-old Estonian Holstein (EHF) AI bull frozen-thawed (FT) spermatozoa post-thaw (PT) or after swimup (SU) treatment, as assessed by flow cytometry (FC) following simultaneous loading with Merocyanine 540 (M540)/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 (H33342). Results are grouped for viable cells in FT AI bull spermatozoa from six (3-year-old), two (5-year-old), and four (7-year-old) bulls, either with a stable membrane (uncapacitated, low M540 fluorescence) or with signs of membrane instability (capacitated-like, high M540 fluorescence), and dead cells. Data are given as means \pm standard error of the mean (S.E.M.). Means between the age groups (within one preparation method and cell group) not sharing the same superscript letters (A and B) differ significantly ($p < 0.05$). Means between the preparation methods (within one age and cell group) not sharing the same superscript letters (a and b) differ significantly ($p < 0.01$).

3.2. Effect of swimup preparation on sperm morphology, motility, viability, and membrane stability

The results are presented in Table 3. When spermatozoa were morphologically assessed PT and post-SU, fewer spermatozoa with tail abnormalities were detected after SU than PT

Table 3
Sperm characteristics after thawing (PT) and swimup (SU)

| | PT | SU |
|--|---------------------|-----------------|
| Abnormal acrosomes (%) | 17.8 | 13.6 |
| Abnormal midpieces (%) | 0.42 | 0.27 |
| Abnormal tails (%) | 12.86*** | 1.9 |
| Abnormal head shape (total %) | 2.8 \pm 0.3 | 3.1 \pm 0.4 |
| Sperm concentration ($\times 10^6$ mL $^{-1}$) | 242.8 \pm 14.7*** | 8.4 \pm 0.7 |
| Subjective motility (%) | 63.0 \pm 1.9*** | 86.9 \pm 2.3 |
| CASA-assessed overall motility (%) | 65.3 \pm 1.6*** | 80.8 \pm 1.4 |
| CASA-assessed linear motility (%) | 38.2 \pm 1.9*** | 27.0 \pm 2.9 |
| VAP ($\mu\text{m/s}$) | 91.3 \pm 3.7*** | 119.4 \pm 3.1 |
| Membrane integrity (SYBR-14, %) | 60.6 \pm 1.7*** | 76.1 \pm 1.8 |
| Spermatozoa with stable membrane (%) | 53.1 \pm 9.7* | 66.3 \pm 20.1 |
| Spermatozoa with unstable membrane (%) | 1.1 \pm 0.9** | 3.9 \pm 6.6 |
| Dead (%) | 45.7 \pm 9.9** | 27.8 \pm 19.4 |

Data are presented as means \pm standard error of the mean (S.E.M.). Significant differences between the PT and SU treatment are indicated. CASA, computer-assisted sperm analysis.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.01$.

*** $p < 0.001$.

Table 4

Pearson's correlation coefficients and significance levels between plasma membrane stability and other selected sperm quality parameters

| | S | US | D | S (SU) | US (SU) | D (SU) |
|---|----------------|----------------|----------------|---------------|----------------|----------------|
| Subjective motility (%) | 0.384 (0.032) | 0.048 (0.797) | −0.364 (0.043) | | | |
| CASA-assessed overall motility (%) | 0.396 (0.027) | −0.174 (0.346) | −0.335 (0.065) | | | |
| Membrane integrity (SYBR-14, %) | 0.465 (0.009) | 0.357 (0.052) | −0.50 (0.004) | | | |
| Abnormal head shape (total %) | −0.416 (0.019) | −0.014 (0.939) | 0.391 (0.029) | | | |
| Sperm concentration (10^6 mL^{-1}) (SU) | | | | 0.498 (0.005) | −0.100 (0.598) | −0.487 (0.006) |

US, percentage of sperm with an unstable membrane; S, percentage of cells with a stable membrane; D, percentage of dead cells. Membrane integrity (SYBR-14, %) = percentage of SYBR-14-positive spermatozoa after SYBR-14/PI staining; abnormal head shape (total %) = cells with head abnormalities. CASA, computer-assisted sperm analysis.

($p < 0.001$). Both subjective and CASA motility evaluations showed significantly higher sperm motility after SU than PT: $p < 0.01$ for semen from bulls aged 3 years; $p < 0.01$ for semen from 5-year-old bulls; $p < 0.001$ for semen from 7-year-old bulls (data not presented in the table); $p < 0.001$ when all age groups were combined. Linearly motile cells decreased after SU ($p < 0.01$), with a simultaneous increase in VAP ($p < 0.001$). The proportion of spermatozoa with intact membranes increased significantly after SU preparation ($p < 0.001$).

For the assessment of the influence of treatment on membrane stability status (triple stain), all age groups were combined and the proportion of spermatozoa with both stable and unstable membranes increased after SU selection ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), owing to a substantial concomitant reduction in the number of dead cells ($p < 0.01$). When the age groups were investigated separately, a significant increase in the proportion of spermatozoa with unstable membranes was only seen in the 3-year-old group ($p < 0.01$).

3.3. Relations between membrane instability and other sperm variables

Results with regard to the relation between membrane instability and other sperm variables are presented in Table 4. In general, the proportion of spermatozoa with a stable membrane was related to many more conventional sperm quality parameters than was that of cells showing a higher degree of membrane instability.

3.4. Relations between laboratory tests and *in vivo* fertility

The 60-day NRR (two to four batches per bull) ranged from 52.2 to 76.0% (141–392 inseminations per bull), with differences among batches within two bulls ($p < 0.05$). Only parameters measured after SU had a significant relationship with NRR. They were: VAP ($p < 0.001$), total motility ($p < 0.01$), concentration of motile spermatozoa assessed by CASA ($p < 0.01$), linearly motile spermatozoa ($p < 0.01$), and percentage of spermatozoa with an unstable membrane ($p < 0.05$).

4. Discussion

The present study was conducted to test the usefulness of a triple fluorochrome (M540/Yo-Pro 1/H33342) staining in determining early changes in the plasma membrane of FT bull semen. To this purpose, the FC results were compared with results of other, more conventional, measurements of sperm quality. In addition, the effect of age and preselection by using a SU technique was investigated. The results showed that the proportion of spermatozoa with a stable plasma membrane tested by the triple combination of fluorophores and FC correlated to motility, normal head morphology ($p < 0.05$), and membrane integrity ($p < 0.01$), thus proving the reliability of this new staining technique. Similar relations between sperm capacitation-like changes and other tests have been reported in the work by Januskauskas et al. [23].

It is known that the process of cryopreservation induces changes in the plasma membrane of spermatozoa, which resemble a physiological, heparin-induced capacitation

[8,24] but apparently with different regulatory mechanisms [25]. During capacitation, the sperm plasma membrane is highly polarized and dynamically reorganized. The fluorescent probe M540, first used for spermatozoa by Harrison et al. [11], detects plasma membrane changes interpreted as increases in lipid disorder [6]. The significance of these plasma membrane changes in PT sperm evaluation is that when they occur prematurely, the cells' lifespan is reduced [24], constraining fertilization *in vivo* [7,13] due to a decrease in the number of viable spermatozoa at the fertilization site. Therefore, the amount of viable, uncapacitated spermatozoa in the inseminate would give valuable information about its quality. Although the issue of cryopreservation-induced capacitation-like changes (so-called "cryoacapacitation" [26]) is still debated, more and more evidence is now available suggesting that the destabilization that occurs during cryopreservation is not necessarily a process of capacitation, although it resembles it [9,10].

In the present bull population, the percentage of live spermatozoa with stable membranes PT was $53.1 \pm 9.7\%$, which is similar to, or even higher than, that reported in other published works [13,23]. To further challenge this population of spermatozoa, we used SU through a heparin-containing medium, Fert-TALP. Fert-TALP was used to mimic the electrolyte composition of oviductal fluid (present at the physical site of capacitation). In the cow oviduct, heparin and heparin-related glycosaminoglycans (GAGs) are believed to act as effectors of capacitation *in vivo* [27]. As expected, the number of spermatozoa with high M540 fluorescence (i.e., a higher degree of lipid disorder in the plasma membrane during the initial capacitation steps) rose after SU compared with PT ($p < 0.01$), from 1.1 ± 0.9 to $5.9 \pm 6.6\%$, within a higher ($p < 0.05$) population of spermatozoa with stable membranes. This indicates the degree of selection provided by SU. That instability status PT was less than after exposure to the capacitating agent heparin might be related to the different nature of "cryoacapacitation" and real capacitation [10]. The spermatozoa PT can either be dead, AR, or intact (e.g., those that have restored their stability), while those intact can still undergo capacitation when exposed to capacitating conditions or agents, such as *in vivo* or to heparin *in vitro* and thus be recorded with M540 after SU.

The abovementioned rise in membrane instability when using M540 monitoring is lower than that reported in another study, in which the chlortetracycline (CTC) assay was used (up to 36%) [13]. It should be noted that the methods monitor different events in the lengthy process of capacitation. The scrambling of phospholipids detectable with M540 is induced by bicarbonate and takes place early, while CTC monitors late events during capacitation and acrosome exocytosis triggered by Ca^{2+} displacement [6,28,29]. The presence of nearly 30% dead cells after SU could be explained by the time needed for staining and FC measurement (15–20 min in total) since they were both performed without CO_2 supplementation. Final measurements were also done at room temperature (with waiting samples held in a prewarmed styrofoam box). Cell deterioration and spontaneous acrosome exocytoses could be expected under these conditions [6].

As spermatozoa need to be motile to be harvested after SU selection, a decrease in tail abnormalities and an increase in motility were expected. Together with the increase in CASA-assessed VAP, these results are in line with our previous work [30]. A simultaneous decrease in linearity could refer to a hyperactive-like motility pattern, a change in motility

that accompanies capacitation. Hyperactive spermatozoa are characterized by less linear and progressive, but more vigorous, movement [31]. However, both capacitation and hyperactivation can occur independently of each other, particularly in vitro [32]. Membrane integrity also improved after SU, which is in agreement with previous results reported by Shamsuddin and Rodriguez-Martinez [33].

In the comparison between sire age intervals, the only parameter which showed a significant change both in PT and in SU-selected samples was membrane integrity, which finding was in line with our previous results [34]. All other parameters changed either PT (spermatozoa with unstable membrane) or after SU only (motility). In the first case (PT), a possible explanation could be that this parameter is not age-dependent in the sperm population capable of reaching the oocyte, while the other relates to SU, which mimics the selection that normally takes place inside areas of the female genital tract (cervix, oviduct). Since the change reveals itself only after SU selection but not PT, it could be hypothesized that the selection procedure is necessary to reveal some deviations which may stay masked in the bulk of PT cells, holding different status after cryopreservation. The highest percentage of morphological abnormalities in this bull population was recorded for acrosomes, which was most probably due to the processing of semen, and which was without any evident relation to fertility [35]. For other morphological parameters, the percentages of deviating spermatozoa were well below what is considered abnormal for AI-selected sires.

The reasons for the correlation between unstable, but not stable, spermatozoa and fertility, as registered in other works [13], could be either induction of capacitation of an enriched population of uncapacitated spermatozoa in the PT sample or the low number of inseminations and/or bulls.

In conclusion, a triple fluorophore M540/Yo-Pro 1/H33342 combination with FC is a suitable method for screening the degree of membrane stability among viable FT bull spermatozoa. Plasma membrane stability correlated significantly to several routinely measured sperm quality variables, such as motility, normal head morphology, and membrane integrity. Use of SU proved beneficial in scrutinizing sperm variables, such as linear motility, membrane intactness, and the responsiveness to capacitation among viable, non-capacitated spermatozoa. Bull age influenced the degree of sperm membrane stability, despite membranes being intact, indicating that cryopreservation affects the lipid bilayer of the processed spermatozoa, with further destabilization occurring after exposure to a heparin-containing medium during SU. In addition, the SU preparation could be an alternative method to discriminate between bulls in a very homogenous population.

Acknowledgements

This study was supported by the Royal Swedish Academy of Forestry and Agriculture (KSLA), the Swedish Farmers' Foundation for Research in Agriculture (SLF), the Swedish Institute (SI), and the Estonian Science Foundation (ETF) (Grant No. 6089). We would like to thank the Animal Breeders' Association of Estonia for providing us with frozen semen and fertility data, and Mr. Tanel Kaart for statistical assistance.

References

- [1] Budworth PR, Amann RP, Chapman PL. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 1988;9:41–54.
- [2] Holt C, Holt WV, Moore HDM, Reed HCB, Curnock RM. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J Androl* 1997;18:312–23.
- [3] Graham JK. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 2001;68:239–47.
- [4] Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951;168:697–8.
- [5] Austin CR. The “capacitation” of the mammalian sperm. *Nature* 1952;170:326.
- [6] Gadella BM, Harrison RAP. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. *Development* 2000;127:2407–20.
- [7] Januskauskas A, Johannisson A, Söderquist L, Rodriguez-Martinez H. Assessment of sperm characteristics PT and response to calcium ionophore in relation to the fertility of Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 2000;53:859–75.
- [8] Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl* 1997;18:461–8.
- [9] Green CE, Watson PF. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 2001;122:889–98.
- [10] Guthrie HD, Welch GR. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology* 2005;63:396–410.
- [11] Harrison RAP, Ashworth PJC, Miller NGA. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 1996; 45:378–91.
- [12] Gadella BM, Harrison RA. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 2002;67:340–50.
- [13] Thundathil J, Gil J, Januskauskas A, Larsson B, Söderquist L, Mapleton R, et al. The relationship between the proportion of capacitated sperm present in the post-thawed semen and fertility with artificial insemination. *Int J Androl* 1999;22:366–73.
- [14] Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H. Sperm characteristics and zona pelluzida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. *Int J Androl* 1998;21: 207–16.
- [15] Hallap T, Nagy SZ, Jaakma Ü, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red. *Theriogenology* 2005;63:2311–22.
- [16] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988;38:1171–80.
- [17] Söderquist L, Janson L, Larsson K, Einarsson S. Sperm morphology and fertility in A.I. bulls. *Zentralblatt für Veterinärmedizin* 1991;38:534–43.
- [18] Bane A. A study on the technique of hemocytometric determination of sperm motility and sperm concentration in bull semen. *Cornell Veterinarian* 1952;42:518–31.
- [19] Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Häård MGH, Häård MCH, Johannisson A, et al. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology* 1999;52:641–58.
- [20] Williams WW. Technique of collecting semen for laboratory examination with a review of several diseased bulls. *Cornell Veterinarian* 1920;10:87–94.
- [21] Roederer M. Compensation (an informal perspective); 2000. <http://www.drmr.com/compensation>, 24 May 2000.
- [22] SAS Institute Inc. SAS[®] language and procedures: introduction, version 6. 1st ed. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 1990.
- [23] Januskauskas A, Lukoseviute K, Nagy S, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. *Theriogenology* 2005; 63:160–78.

- [24] Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:871–91.
- [25] Cormier N, Bailey JL. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 2003;69:177–85.
- [26] Pommer AC, Rutilant J, Meyers SA. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biol Reprod* 2003;68:1208–14.
- [27] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol Reprod* 2001;40:1020–5.
- [28] Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod* 2001;65:462–70.
- [29] Rodriguez-Martinez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H, Johannisson A. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod Suppl* 2001;58:129–45.
- [30] Hallap T, Håård MCH, Jaakma U, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? *Theriogenology* 2004; 62:702–13.
- [31] Yanagimachi R. Mammalian fertilization.. In: Knobil E, Neill JD., editors. *The physiology or reproduction*. New York, NY: Raven Press Ltd.; 1994. p. 189–315.
- [32] Ho H-C, Granish KA, Suarez SS. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca²⁺ and not cAMP. *Dev Biol* 2002;250:208–17.
- [33] Shamsuddin M, Rodriguez-Martinez H. A simple, non-traumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for in vitro fertilization in the bovine. *Anim Reprod Sci* 1994;36:61–75.
- [34] Hallap T, Håård MCH, Jaakma Ü, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish Red and White AI sires at one and four years of age. *Int J Androl* 2004;27:166–71.
- [35] Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Zhang BR, Söderquist L. In vitro assessment of viability and fertilizing capacity of bull spermatozoa. *J Rep Dev* 1997;43:1–11.

EFFECTS OF HIGH AMBIENT TEMPERATURE ON FISH SPERM PLASMA MEMBRANE INTEGRITY AND MITOCHONDRIAL ACTIVITY – A FLOW CYTOMETRIC STUDY

SZABOLCS TAMÁS NAGY,^{1*} BALÁZS KAKASI,² LÁSZLÓ PÁL,¹
MÁTÉ HAVASI,^{1,3} MIKLÓS BERCSÉNYI,¹ FERENC HUSVÉTH¹

¹Department of Animal Sciences and Animal Husbandry, University of Pannonia, Georgikon Faculty,
Deák F. u. 16, H-8360 Keszthely, Hungary

²Institute of Environmental Sciences, University of Pannonia, Wartha Vince u. 1,
H-8200 Veszprém, Hungary

³Research Institute for Fisheries and Aquaculture, National Agricultural Research and
Innovation Centre

(Received: April 29, 2015; accepted: November 4, 2015)

Local extreme climatic conditions occurring as a result of global climate change may interfere with the reproduction of animals. In the present study fish spermatozoa were incubated at different temperatures (20, 25, 30 and 40 °C) for 10 and 30 minutes, respectively and plasma membrane integrity and mitochondrial membrane potential changes were evaluated with flow cytometry using SYBR-14/PI and Mitotracker Deep Red FM fluorescent dyes. No significant differences were found in plasma membrane integrity at either incubation temperatures or time points. Mitotracker Deep Red FM histogram profiles indicating mitochondrial activity showed significant ($p < 0.001$) alterations in all cases of higher (25, 30 and 40 °C) temperature treatments as compared to the samples incubated at 20 °C. Our results indicate that fish spermatozoa exposed to high temperatures suffer sublethal damage that cannot be detected with conventional, vital staining techniques.

Keywords: Fish sperm – plasma membrane integrity – mitochondrial activity – high temperature – flow cytometry

INTRODUCTION

Local extreme climatic conditions occurring as a result of global climate change may disturb the physiological functions of wild and farm animals, involving their reproductive physiological processes [3]. It is known for example that extremely high or low temperatures result in disturbances in spermatogenesis causing several sperm defects [2].

Heat stress – besides changes at cellular level – can overthrow the sex-hormone balance of the organism and significantly affect the physiological process of animal production as well [22].

A number of animal species living at different temperate zones show strict seasonal reproduction where the main factor that triggers the onset of reproductive sea-

*Corresponding author; e-mail address: nagy.szabolcs@georgikon.hu

son is the length of the daily light period instead of temperature. This latter does not fully follow the change of the day length which is a year-to-year precisely occurring phenomenon. This way there is a chance that the animals do not meet optimal temperature conditions in their reproductive period [4, 5].

The renaissance of ecological farming opens new fields for the old, traditional breeds, selected for extensive production methods. These breeds show more or less seasonality in reproduction, though this seasonality is not negligible in intensive type breeds either.

A majority of teleost fish species are seasonal breeders and may especially be sensitive to extreme environmental conditions, due to their external fertilization. Their reproductive success – and as a consequence, their fitness to reach brooder age – can be influenced by the extreme temperature affecting the gametes (eggs and sperm) either in the nature or during artificial propagation, gamete collection and storage [18, 24].

Our aim in this study was to assess the usefulness of flow cytometry to detect the changes of plasma membrane integrity and mitochondrial transmembrane potential of fish spermatozoa, incubated at different temperatures (20, 25, 30 and 40 °C) for 10 and 30 minutes, respectively, to reveal if this increase of ambient temperature can lead to cell death or mitochondrial membrane depolarization.

MATERIALS AND METHODS

In order to decrease individual variance [21] pooled sperm of three male prussian carps (*Carassius auratus gibelio*, Bloch) were used in the experiment. Spermiation was induced by injecting carp pituitary extract into the body cavity and stripping was performed in anaesthesia using clove oil. Sperm samples were transferred to the laboratory immediately after collection and pooling. Sperm concentration was adjusted via suspending in phosphate buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich P4417-100TAB) to achieve the optimal cell concentration (<5 × 10⁶/ml) for flow cytometric measurements. In order to avoid artefacts due to accidental activation of spermatozoa, activated/inactive state was monitored with an Olympus CX40 phase contrast microscope, and only inactive sperm samples were used for the subsequent analyses. Pooled sperm samples were split to eight subsamples, and they were incubated at 20, 25, 30 or 40 °C for 10 or 30 min, respectively. The experiment was repeated three times.

Plasma membrane integrity

The percentages of spermatozoa with intact plasma membrane were assessed with Live/Dead Sperm Viability Kit (Life Technologies, L-7011) according to Garner et al. [8]. Intact sperm cells were labelled with SYBR 14 and showed green fluorescence, dead cells were labelled with propidium iodide (PI) and showed red fluorescence. Events showing green and red fluorescent signal simultaneously were considered as moribund, dying spermatozoa (Fig. 1).

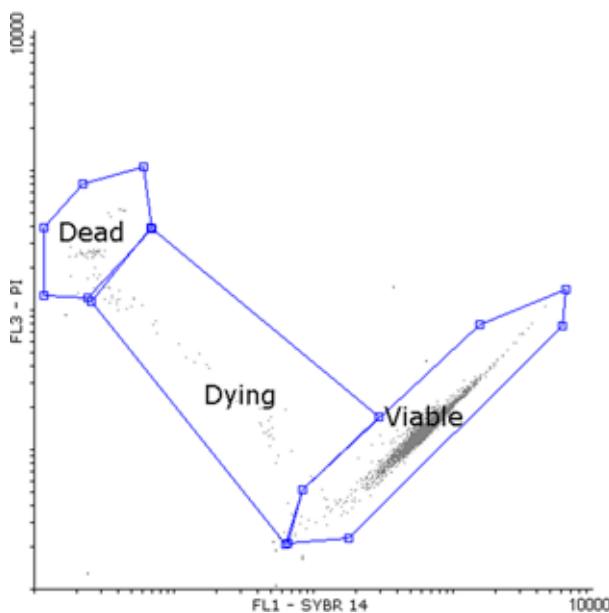


Fig. 1. Fluorescence intensities of viable, moribund and dead spermatozoa. Viable cells show high green, dead show high red signal, moribund, dying spermatozoa show high green and red fluorescence simultaneously. FL1: SYBR-14; FL3: PI

Mitochondrial activity

Mitochondrial transmembrane potential was evaluated with Mitotracker Deep Red FM (Life Technologies, M22426) fluorochrome according to Hallap et al. [12]. The fluorescent probe indicates high mitochondrial membrane potential with a high far red signal (Fig. 2).

Flow cytometry

Flow cytometric measurements were performed on a Beckman Coulter FC-500 flow cytometer equipped with a 488 nm Ar ion (20 mW) and a 635 nm red diode (25 mW) laser line. Fluorescent signals of SYBR 14, PI and Mitotracker Deep Red FM were evaluated on detectors FL 1 (525 BP), FL3 (620 SP) and FL 4 (675 BP), respectively. Forward and side scatter and fluorescent signals of 10,000 sperm events were recorded per sample using Beckman Coulter CXP acquisition software and stored as LMD files for subsequent analyses.

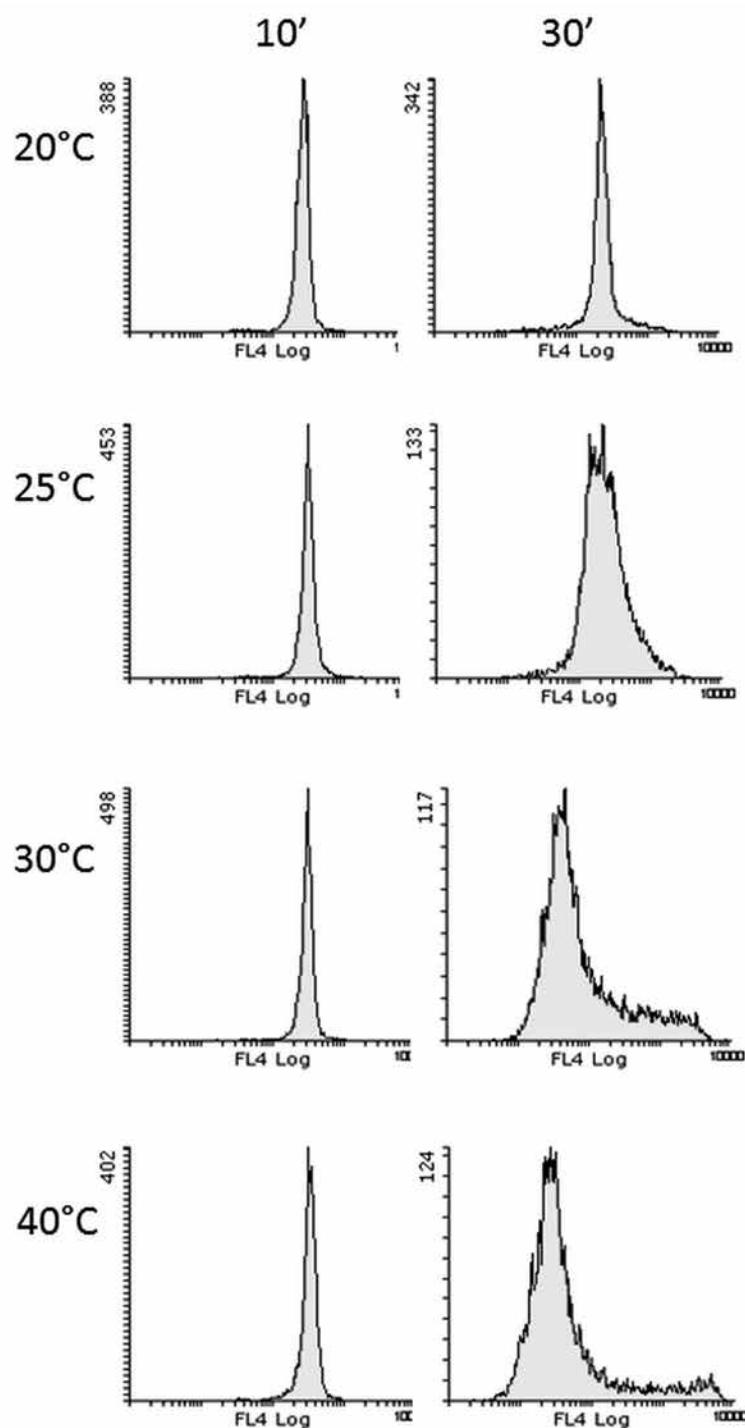


Fig. 2. Mitotracker Deep Red FM fluorescence intensity histograms of spermatozoa incubated at different temperatures for 10 or 30 minutes

Data analysis

The LMD files were analyzed with the free Flowing 2.5.1. software (www.flowing.com). The main outcome of the plasma membrane integrity analysis was the percentage of SYBR-14 positive events (interpreted as % viable). For the evaluation of mitochondrial membrane potential median fluorescence intensities (MFI – dimensionless value) of the Mitotracker Deep Red FM histograms were calculated. As spermatozoa contain more than one mitochondrion per cell and even within one cell there may be differences between individual mitochondria, in our opinion MFI may actually be a more sensitive indicator of the changes in mitochondrial membrane potential than the percentage of cells with high or low Mitotracker Deep Red FM fluorescence.

Viable % values were analysed with Repeated Measures ANOVA and post-hoc Newman-Keuls tests using Statistica for Windows 8.0 (StatSoft, Inc., 2007. STATISTICA data analysis software system, www.statsoft.com). Mitotracker Deep Red FM histogram profiles were compared with the Kolmogorov-Smirnov option of the Beckman Coulter CXP analysis software, applying sample incubated for 10 min at room temperature (20 °C) as control. Cumulative histograms were overlaid to establish the maximum absolute differences (D_{max}), and to reveal whether the differences between histograms are significant or not at $p < 0.05$ [6, 24].

RESULTS

Our results did not reveal significant differences between different incubation temperatures and exposure intervals in plasma membrane integrity. The ratio of cells with intact plasma membrane remained about 99% in all cases (Table 1).

Determining mitochondrial activity measurements, the MFI values of the Mitotracker Deep Red FM histograms increased in case of 40 °C treatment after 10 minutes exposition, while the other treatments did not influence MFI significantly. These values were 285, 287, 275 and 364 at 20, 25, 30 and 40 °C incubation temperatures, respectively.

Table 1
Percentages of viable spermatozoa incubated at different temperatures for 10 and 30 minutes

| Temperature (°C) | 10 min | | 30 min | |
|---------------------|--------|------|--------|------|
| | mean | SD | mean | SD |
| 20 | 99.67 | 0.23 | 99.77 | 0.12 |
| 25 | 99.46 | 0.42 | 99.70 | 0.20 |
| 30 | 99.70 | 0.10 | 99.83 | 0.06 |
| 40 | 99.67 | 0.21 | 99.73 | 0.21 |

Means and SD-s of three replicates.

The samples incubated at 30 or 40 °C showed significant fluorescence intensity decrease after 30 minutes exposition (MFI: 262, 296, 151 and 160 at 20, 25, 30 and 40 °C incubation temperatures, respectively).

The Kolmogorov–Smirnov test revealed significant ($p < 0.001$) differences in the Mitotracker Deep Red FM histogram profiles in all temperature treatments at both time intervals compared to the histogram of the sperm sample exposed to 20 °C for 10 minutes, regarded as control.

The D_{\max} -values of the histogram comparisons are summarized in Table 2.

Table 2
Critical Kolmogorov–Smirnov D_{\max} values of the Mitotracker Deep Red FM histograms of the control measurement (incubation at 20 °C for 10 min) and spermatozoa incubated at different temperatures and times

| D_{\max} | A-B | A-C | A-D | A-E | A-F | A-G | A-H |
|------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Mean | 0.31 | 0.32 | 0.57 | 0.56 | 0.58 | 0.60 | 0.67 |
| SD | 0.26 | 0.09 | 0.31 | 0.25 | 0.30 | 0.29 | 0.23 |

Means and SD-s of three replicates. A: 10', 20 °C; B: 30', 20 °C; C: 10', 25 °C; D: 30', 25 °C; E: 10', 30 °C; F: 30', 30 °C; G: 10', 40 °C; H: 30', 40 °C.

DISCUSSION

Nearly 100% plasma membrane integrity of the freshly collected fish semen was showed earlier [19] and the high live-cell ratio was also observed in another species like carp [13]; striped bass [9, 10]; and zebrafish [11]. The plasma membrane lesion is a late end point of necrotic cell death. In this experiment, the intact cell ratio did not decrease in the semen samples, not even in the case of cells incubated at 40 °C for 30 minutes.

The mitochondrial membrane potential changes let us conclude that under the present experimental incubation time and temperature settings, the cells suffered sublethal damage which cannot be detected with conventional vital staining techniques. This phenomenon could be clearly observed in the case of spermatozoa with 40 °C incubation, where the mitochondria of the cells became hyperpolarized after 10 minutes, then after 30 minutes the decrease of MFI indicated the depolarization of mitochondrial membrane as compared to the sperm cells incubated at room temperature. Similar tendency was observed in sperm cells incubated at 30 °C, but less definitely. These results were considered biologically relevant as the results of Kolmogorov–Smirnov test demonstrated that the Mitotracker Deep Red FM histogram profiles significantly differed at all experimental times and temperatures from the histogram profile of the control sample (10 minutes at 20 °C). The damage of sperm mitochondria might be initiators of a series of intracellular, degenerative processes. The main role of mitochondria of inactive fish sperm cells is to maintain the intracellular ATP levels, besides other homeostatic roles. Following the sperm activa-

tion the spermatozoa use the stored ATP, instead of de novo synthesis of ATP generated by mitochondria. The increase of oxidative phosphorylation was not experienced together with the activation [16].

Similar phenomena can be observed at some mammalian species, the spermatozoa, of which contain only a few mitochondria (e.g. human – approx. 10–15 mitochondria per cell), the ATP synthesis needed for motility is mainly generated by glycolysis, the mitochondrial ATP synthesis is mainly required for sustaining plasma membrane-homeostasis [7].

The spermatozoa of prussian carp contains only 10 mitochondria per cell [17], their role might be considered similarly as limited in active motility as in human spermatozoa. The damaged mitochondria are the main sources of intracellular oxidative lesions – the reactive oxygen species (ROS) released from the damaged, fragmented mitochondria may cause lipid-peroxidation and oxidative DNA lesions and finally DNA-fragmentation [1]. Moreover, mitochondria have an important role in the maintenance of Ca^{2+} -homeostasis – the mitochondrial membrane depolarization causes decreased Ca^{2+} influx [20]. This latter and the increase in intracellular Ca^{2+} level are key components of fish sperm activation [15] and necessary for capacitation in mammalian spermatozoa [14].

According to our opinion, the present findings may provide useful information from the point of view of environment protection and conservation, may provide a basis for future experiments on fish sperm physiology, incorporating further assays such as the detection of intracellular Ca^{2+} level changes, oxidative DNA lesions and DNA fragmentations in fish spermatozoa exposed to extreme temperatures, and can be useful even for the practical specialists of aquaculture.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the project TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0064. The project was supported by the European Union, with co-funding from the European Social Fund.

REFERENCES

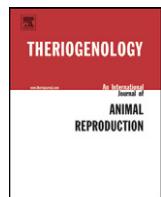
1. Aitken, R. J., De Iuliis G. N., Finnie J. M., Hedges A., McLachlan R. I. (2010) Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum. Reprod.* 25, 2415–2426.
2. Barth, A. D., Oko, R. (1989) *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Iowa State University Press, Ames.
3. Bradshaw, W. E., Holzapfel, C. M. (2006) Evolutionary response to rapid climate change. *Science* 312, 1477–1478.
4. Bronson, F. (2009) Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Philos. T. Roy. Soc. B.* 364, 3331–3340.
5. Bronson, F. H. (1989) *Mammalian reproductive biology*. University of Chicago Press, Chicago.
6. Cox, C., Reeder, J. E., Robinson, R. D., Suppes, S. B., Wheless, L. L. (1988) Comparison of frequency distributions in flow cytometry. *Cytometry* 9, 291–298.

7. Cummins, J. (2009) 5-Sperm motility and energetics. In: Pitnick, T. R. B. J. H. (ed.) *Sperm Biology*. Academic Press, London, pp. 185–206.
8. Garner, D., Johnson, L., Yue, S., Roth, B., Haugland, R. (1994) Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.* 15, 620–629.
9. Guthrie, H., Welch, G., Theisen, D., Woods, L. (2011) Effects of hypothermic storage on intracellular calcium, reactive oxygen species formation, mitochondrial function, motility, and plasma membrane integrity in striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Theriogenology* 75, 951–961.
10. Guthrie, H., Woods, L., Long, J., Welch, G. (2008) Effects of osmolality on inner mitochondrial transmembrane potential and ATP content in spermatozoa recovered from the testes of striped bass (*Morone saxatilis*). *Theriogenology* 69, 1007–1012.
11. Hagedorn, M., Ricker, J., McCarthy, M., Meyers, S., Tiersch, T., Varga, Z., Kleinhans, F. (2009) Biophysics of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *Cryobiology* 58, 12–19.
12. Hallap, T., Nagy, S., Jaakma, Ü., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. (2005) Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology* 63, 2311–2322.
13. Horváth, Á., Martínez-Páramo, S., Kovács, Á. I., Urbányi, B., Herráez, P. (2010) Effect of ovarian fluid on the mobility of fresh and cryopreserved sperm of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Állattani Közl.* 95, 25–33. (In Hungarian)
14. Hossain, M. S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A. P., Rodriguez-Martinez, H. (2011) Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J. Androl.* 13, 406.
15. Inaba, K. (2008) Molecular mechanisms of the activation of flagellar motility in sperm. In: Alavi, S. M. H., Cosson, J. J., Coward, K., Rafiee, G. (ed.) *Fish spermatology*. Alpha Science International Ltd., Oxford, UK, pp. 267–280.
16. Ingermann, R. L. (2008) Energy metabolism and respiration in fish spermatozoa. In: Alavi, S. M. H., Cosson, J. J., Coward, K., Rafiee, G. (ed.) *Fish spermatology*. Alpha Science International Ltd., Oxford, UK, pp. 215–240.
17. Jamieson, B. G. M. (1991) *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa: with a Survey of Lophophorate, Echinoderm, and Protochordate Sperm and an Account of Gamete Cryopreservation*. Cambridge University Press, Cambridge.
18. Jonsson, B., Jonsson N. (2009) A review of the likely effects of climate change on anadromous Atlantic salmon *Salmo salar* and brown trout *Salmo trutta*, with particular reference to water temperature and flow. *J. Fish Biol.* 75, 2381–2447.
19. Nagy, S., Kakasi, B., Havasi, M., Németh, S., Pál, L., Bercesényi, M., Husvéth, F. (2013) Dynamic cellular changes during fish sperm activation as measured by flow cytometry. *Diversification in Inland Finfish Aquaculture II*, Vodnany, Czech Republic.
20. Pizzo, P., Drago, I., Filadi, R., Pozzan, T. (2012) Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis: mechanism, role, and tissue specificities. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.* 464, 3–17.
21. Sood, S., Malecki, I., Tawang, A., Martin, G. (2012) Survival of emu (*Dromaius novaehollandiae*) sperm preserved at subzero temperatures and different cryoprotectant concentrations. *Theriogenology* 78, 1557–1569.
22. West, J. (2003) Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86, 2131–2144.
23. Young, I. T. (1977) Proof without prejudice: use of the Kolmogorov–Smirnov test for the analysis of histograms from flow systems and other sources. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 935–941.
24. Zieba, G., Fox, M. G., Copp, G. H. (2010) The effect of elevated temperature on spawning of introduced pumpkinseed *Lepomis gibbosus* in Europe. *J. Fish Biol.* 77, 1850–1855.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Sperm chromatin structure and sperm morphology: Their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires

S. Nagy ^{a,*}, A. Johannisson ^b, T. Wahlsten ^c, R. Ijäs ^d, M. Andersson ^e, H. Rodriguez-Martinez ^f

^a Georgikon Faculty, Department of Animal Sciences and Animal Husbandry, University of Pannonia, Keszthely, Hungary

^b Department of Anatomy, Physiology and Biochemistry, Swedish University of Agricultural Sciences (SLU), Ultuna, Uppsala, Sweden

^c Faba co-op, Vantaa, Finland

^d Viking Genetics Finland, Hollola, Finland

^e Faculty of Veterinary Medicine, Department of Production Animal Medicine, University of Helsinki, Saarentaus, Finland

^f Department of Clinical and Experimental Medicine, Linköping University, Linköping, Sweden

A R T I C L E I N F O

Article history:

Received 19 October 2012

Received in revised form 17 February 2013

Accepted 18 February 2013

Keywords:

Bull

Sperm morphology

Sperm chromatin integrity

Fertility

A B S T R A C T

Prognostic relations between sperm variables and sire fertility are yet elusive. A retrospective analysis of sperm morphology and chromatin stability (studied using sperm chromatin structure assay [SCSA]) and their relation to fertility after AI (as proportions of 60 days of nonreturn to estrous [NRR], corrected NRR, or calving rate) was studied with preselected frozen semen doses from a group ($N = 43$) of AI-sires of the Finnish Ayrshire breed composed of 50% subfertile bulls (<55% NRR) and 50% fertile sires (>55% NRR). Fertility, indicated by all three parameters, correlated significantly only with the percentage of morphologically normal spermatozoa, a variable which negatively correlated with the percentage of DNA fragmentation at the time of SCSA, thus confirming the value of always having high numbers of morphologically normal spermatozoa in AI-doses. Proportions of major sperm defects also related to fertility but only when considering corrected NRR, not with calving rate, indicating that proportions of normal spermatozoa, a value surpassing differences between sperm laboratory screening methods, might be valuable and could be easily made routine by the industry. Though SCSA as a method is being contested for DNA- and chromatin analyses in the light of epigenetic changes, a particular parameter, the High Green fluorescence, showed the highest values for sperm doses collected from bulls having meiotic problems and containing a high proportion of diploid spermatozoa (approximately 20%) and also in bulls having a reciprocal chromosomal translocation, thus suggesting such a parameter might be useable to discriminate which bulls ought to be studied in more detail, including cytogenetic analyses.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In most bull stations producing semen doses for artificial insemination (AI), the collected semen is merely evaluated for total sperm numbers and sperm motility as a token of testicular production rate and of sperm viability,

respectively [1,2]. In some enterprises, microscopy is being replaced by flow cytometry and assessment of proportions of membrane-intact spermatozoa [3], mostly because it provides a way for production of doses with low sperm numbers (as for sexed semen). Postthaw assessment involves in most cases solely sperm motility, either for acceptance (40% or 50% of survival as a cutoff) or for post-AI control. The andrological clinical evaluation should include, although unfortunately is not routine, the examination of the morphology of the spermatozoa present and the

* Corresponding author. Tel.: +36-83-545-349; fax: +36-83-545-143.
E-mail address: nagy.szabolcs@georgikon.hu (S. Nagy).

account of any cell other than spermatozoa (also called foreign or round cells). The relevance of the sperm morphology evaluation relates to its indicative role for presence of eventual deviations of the processes of spermatogenesis and of sperm maturation in the epididymis and the presence of pathologies in the accessory sexual glands or, even of procedures during semen collection and handling of semen thereafter. The presence of a large number of sperm abnormalities in the semen is not only indicative of pathological genital processes [4]; it is also associated with decreased fertility of the semen [5]. The results of sperm morphology evaluation are thus enough, if correctly interpreted, to allow for the culling of males intended for breeding and—particularly if their semen is to be used for assisted reproductive technologies [6]. On the other hand, use of semen morphology as a measurement of semen fertility (or better, sire fertility) has been discussed for its value when semen within normal values is assessed (for a review, see [7,8]). Despite its obvious value, morphological assessments of semen samples are not often done and in most cases performed using improper or defective protocols. The design of automated, computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) instruments [9] can surpass this problem and further analyze sperm head dimensions objectively. Most relevant, there is a relationship between sperm morphometry (bull semen) and the normal structure of the chromatin (the latter in direct relation to fertility) [10]. Computer-assisted sperm head morphometry analysis instruments have yielded repeatable results when used with bull [11], ram [8], or goat spermatozoa [12]. When combined with multivariate statistical analyses, ASMA allowed identification of subpopulations in the ejaculate [13]. However, ASMA is restricted to measurement of the sperm head surface area and lacks the ability to discern sperm abnormalities of other nature [14] nor are there clear relationships with fertility [11,15].

In species largely selected for sperm quality for AI (dairy cattle, pigs), a frame of “normality” is described when the frequency of abnormal sperm heads does not surpass 10% and when none of the other parameters (acrosomes, mid-piece, tails, proximal cytoplasmic droplets) do not surpass 5% each or totals 10% to 15% [8]. In other species, domestic or otherwise, whose degrees of selection for sperm morphology are low or do not exist (wild species), the limits of “normality” still vary largely or are not established. Certain abnormalities are considered without relevance for fertility, such as the case of distal cytoplasmic droplets. However, the presence of specific defects in spermatogenesis (generally hereditary) that result in typical morphological abnormalities (such as nuclear vacuoles [diadem defect], acrosomal plicae [knobbed defect], decapitated spermatozoa, short or mutilated tails [tail stump], coiled tails [Dag defect], or corkscrewed midpieces [corkscrew defect]); are very serious defects, because they interfere with fertilization and can lead to sterility and are often classified as major defects. Spermatozoa with certain morphological deviations of head shape (such as those with nuclear pouches in heads with normal contour) do sometimes reach the oocyte [16], but not in all cases [17]. In any case, they are related to lower fertilization rates and embryo development [17]. Other defects, such as the

“knobbed acrosome”, prevents the union of sperm zona pellucida [18], and others (pyriform sperm heads) have a reduced capacity to bind and penetrate the zona pellucida, and the resulting zygotes *in vitro* cleave abnormally [19]. On the other hand, the proportion of morphologically normal spermatozoa in the ejaculate relate to its fertility, as it has been determined for dairy AI-bulls [20,21], by reflecting—together with sperm numbers and sperm motility—the degree of normality of the spermatogenesis and sperm maturation, within a cohort of sires.

The flow cytometric sperm chromatin structure assay (SCSA) measures the susceptibility of sperm nuclear DNA to denaturation *in situ*, which has been correlated with the presence of DNA strand breaks [22]. Such defects may or may not be reflected in deviations of sperm head shape, albeit some are considered related, including pear-shaped sperm heads [10]. Contrary to its increasing use in humans, determination of sperm chromatin structure and its intactness, for instance using SCSA [22] is also punctual. Combinations of the assays mentioned are rarely used beyond experimental situations, particularly when the intention is the disclosure of fertility markers. Multiple are, however, the reports of positive associations between a single assay and fertility, but usually when substantial differences in individual fertility are present among the sires tested. Studies combining two clearly related variables such as chromatin structure and sperm head shape are rare, and has basically been performed in sires with large variation in sperm morphology or quality (such as stallions [23]) where fertility is not an easy measurable parameter. Although there are indications for a relationship between SCSA outcome and tapered sperm heads in bulls [10], there is no evidence for a general relationship with fertility [7].

The objective of this study was therefore to evaluate—using a retrospective approach—the correlation between sperm morphology and SCSA with three different fertility parameters (proportions of nonreturn to estrous [NRR], corrected NRR [NR-index], and calving rate [CR]) on a material consisting of 22 Ayrshire AI-bull sires classified by Finnish standards as subfertile and 21 bulls with normal fertility based on NRR in a practical commercial situation where semen is preselected mainly based on—apart from sperm numbers—on sperm motility.

2. Materials and methods

2.1. Animals, semen collection, and inseminations

For the fertility evaluation, semen samples from 43 AI-bull sires of Ayrshire breed of matched age were collected and frozen commercially into 0.25-mL straws containing approximately 15 million spermatozoa per straw, during a period of 7 years (1999–2006). Half of the selected bulls used in this study were classified as subfertile ($N = 22$) and the rest were classified as normal and hereby defined as control bulls ($N = 21$). The classification of bulls into subfertile and control bulls was based on 60 days NRR with a threshold NRR value between sub- and normal fertility of below or above 55%. The semen of each bull was used for at least 1200 commercial inseminations and statistically corrected for a series of confounding factors

(see Section 2.2) to provide an NR-index. In total, more than 256,000 inseminations were used with the semen of these 43 bulls (minimum of 1202 inseminations and maximum 81,644 inseminations per bull). On average, 5964 inseminations were done per bull. In addition to this sire population, three other bulls were included outside the fertility evaluation. This additive material contained one bull with a reciprocal translocation and two bulls with failure in the first or second meiotic division leading to an increased incidence (approximately 20%) of diploid spermatozoa.

2.2. Fertility parameters

Three fertility parameters were included for each bull sire: (1) the uncorrected non-return rate within 60 days of insemination (NRR). The NRR corresponds to the proportion of inseminations not repeated within 60 days of insemination; (2) the NR-index, where the NRR is corrected for parity, season, inseminator, and herd and; (3) the CR, where reinseminated, culled, and sold animals were included as nonpregnant in the data set. All fertility data were obtained from the Agricultural Data Processing Centre Ltd. (Vantaa, Finland).

2.3. Morphology evaluation

Sperm morphology was evaluated on a Giemsa stained smear made after the first acceptance for freezing of the ejaculate, which means that the ejaculate or ejaculates contain sufficient motile spermatozoa, i.e., with a sperm volume more than 3 mL totally (for one or two ejaculates combined), sperm density more than 600 million spermatozoa per mL, and with a sperm motility exceeding 60% progressively motile spermatozoa in the microscopic evaluation before freezing, and a postthaw progressive sperm motility exceeding 40%. The smears were air-dried and sent to our laboratory, where they were fixed and stained by the Giemsa staining method according to Watson [24]; 300 spermatozoa per smear were examined, and classification of sperm morphology was carried out as described by Blom [25], according to whom only the most serious sperm defect of each spermatozoon, based on their effect on fertility, was recorded. The spermatozoa were divided into four classes: major sperm defects (major), proximal droplets (prox), minor sperm defects and normal spermatozoa (normal). The class of major defects contained the following abnormalities: underdeveloped, double forms, knobbed acrosomes, decapitated sperm with actively moving tail, diadem defect, pyriform head, narrow head at base, abnormal contour, small abnormal head, corkscrew defect, tail stump, pseudodroplet, and Dag defect. The same technician performed all the morphology evaluations.

2.4. Sperm chromatin structure assay [26]

We measured the susceptibility of DNA to acid-induced denaturation *in situ* using flow cytometry as a metachromatic shift of acridine orange (AO) from green (double-stranded DNA) to red (single-stranded DNA). Denaturation is expressed as the ratio of red (denatured, single-stranded

DNA) to red and green (total cellular DNA) fluorescence intensity. The ratio is calculated for each spermatozoon in a sample and the results were expressed as the percentage and SD of cells with high denaturation ratio values. High green fluorescence (HIGR) is identified as higher green stainability compared with the main population of the control bulls and indicates incomplete histone–protamine exchange [27].

2.4.1. Sperm staining with AO

The thawed semen samples were extended to 1 to 2 × 10⁶/mL in buffer containing 0.01 M TRIS, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4. After 1 minute, 200 µL of diluted semen were mixed with 400 µL of acid-detergent solution (0.15 M NaCl, 0.08 N HCl, 0.1% Triton-X 100, pH 1.2). Exactly 30 seconds later, samples were stained with 1.2 mL of AO staining solution (0.2 M Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl, 0.1 M citric acid, 6 mg/mL AO, pH 6.0; Merck Kebo Lab, Stockholm, Sweden). Samples were transferred to the flow cytometer, and analyses started 3 minutes after the acidic treatment.

2.4.2. Flow cytometric measurements

The measurements were made using the FACStar Plus flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) equipped with standard optics. Acridine orange was excited with an Ar ion laser (Innova 90; Coherent, Santa Clara, CA, USA) at 488 nm and running at 200 mW. In association with double-stranded DNA it fluoresces green (530 ± 30 nm) but when connected to single-stranded DNA the fluorescence is red (>630 nm). Green AO fluorescence was detected on detector FL 1 (530/28 nm) and red AO fluorescence on detector FL3 (>630 nm). Acquisitions were done using the CellQuest 3.1 software (Becton Dickinson). Acquisitions were stopped after recording 10,000 events. Acquisition data were stored for further analyses in list mode.

2.4.3. Data analysis

Flow cytometric results were stored as listmode files and further analyses using parameter calculations were

Table 1

Descriptive statistics of the bull population (N = 43) in the fertility evaluation.

| Variable | Mean | Median | Minimum | Maximum | Lower quartile | Upper quartile | SD |
|----------|-------|--------|---------|---------|----------------|----------------|------|
| Normal | 84.2 | 88.0 | 38.0 | 95.0 | 78.0 | 92.0 | 10.3 |
| Major | 6.9 | 5.0 | 1.0 | 33.0 | 3.0 | 8.0 | 6.2 |
| Prox | 4.0 | 2.0 | 0.0 | 18.0 | 1.0 | 5.0 | 4.3 |
| DF% | 4.3 | 4.0 | 2.0 | 10.5 | 3.4 | 4.7 | 1.8 |
| SD DF | 112.3 | 112.5 | 79.2 | 143.8 | 101.8 | 123.9 | 14.8 |
| HIGR | 0.6 | 0.5 | 0.31 | 1.9 | 0.4 | 0.6 | 0.3 |
| NRR | 54.1 | 54.7 | 42.6 | 61.7 | 51.2 | 58.2 | 5.1 |
| NR-index | 91.1 | 89.0 | 64.0 | 111.0 | 81.0 | 101.0 | 13.2 |
| CR | 34.1 | 34.4 | 17.3 | 44.5 | 31.1 | 38.5 | 5.7 |

Data are percentages.

Abbreviations: CR, calving rate; DF%, percentage of cells with high DNA fragmentation/denaturation ratio values; HIGR, high green fluorescence; Major, major abnormalities; Normal, normal spermatozoa; NR-index, corrected NRR; NRR, percentage of nonreturn to estrus; Prox, proximal cytoplasmic droplets; SD DF, SD of cells with high DNA fragmentation/denaturation ratio values.

done using FCSExpress software, version 2 (DeNovo Software, Thornhill, Ontario, Canada). Chromatin condensation was monitored on the green fluorescent channel, using a normal control sample as described in Revay et al. [28]. Events showing HIGR were considered to be spermatozoa with incomplete chromatin condensation.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were done with STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. (StatSoft, Inc.). Subgroups containing low and normal fertility bulls were compared with the nonparametric Mann–Whitney *U* test. The relationship between different sperm parameters and fertility results were analyzed using the nonparametric Spearman correlation analysis in the whole sampled population and within subpopulations. Additionally, low and normal fertility subgroups were compared with the help of

receiver operating characteristic-curves [29] using the Xlstat program (Xlstat-Life, version 2012., Addinsoft). Values of area under the curve (AUC) were calculated to indicate if the different sperm parameters were able to discriminate between low and normal fertility subgroups. The Youden index [30] was calculated as $J = (\text{sensitivity} + \text{specificity}) - 1$ to establish a threshold value between subfertile and fertile individuals.

3. Results

Summary statistics of the results in the fertility evaluation of the 43 bulls are shown in Table 1. The results of all parameters sorted for ascending NRR are shown in Table 2. Spearman correlation coefficients are listed for all parameters considered against fertility in Table 3. The fertility parameters correlated statistically with each other, indicating the fertility classing using NRR was effective because

Table 2

Bulls included in the fertility evaluation ($N = 43$) sorted for 60-day NRR.

| Bull identification number | Normal | Major | Prox | DF% | SD DF | HIGR | NRR | NR-index | CR | NRR level |
|----------------------------|--------|-------|------|-------|-------|------|------|----------|------|-----------|
| 41031 | 85 | 3 | 1 | 2.14 | 95.4 | 0.47 | 42.6 | 64 | 20.1 | S |
| 42584 | 68 | 24 | 2 | 6.23 | 133.8 | 1.88 | 42.7 | 66 | 17.3 | S |
| 41746 | 73 | 9 | 14 | 3.95 | 125 | 0.55 | 44.8 | 68 | 24.3 | S |
| 43733 | 75 | 4 | 16 | 3.95 | 97 | 0.36 | 45 | 82 | 26.5 | S |
| 41638 | 95 | 3 | 2 | 2.52 | 109.3 | 0.46 | 47 | 77 | 29.7 | S |
| 44057 | 78 | 3 | 18 | 6.81 | 129.2 | 0.38 | 47.4 | 76 | 26.5 | S |
| 41702 | 38 | 33 | 8 | 10.53 | 79.2 | 0.48 | 47.5 | 77 | 31.1 | S |
| 41564 | 81 | 12 | 3 | 7.62 | 143.8 | 0.4 | 47.8 | 69 | 30 | S |
| 43827 | 88 | 6 | 1 | 3.26 | 131.9 | 0.38 | 51.1 | 77 | 31.7 | S |
| 43802 | 81 | 4 | 10 | 4.05 | 96 | 0.65 | 51.2 | 87 | 33.3 | S |
| 41587 | 70 | 17 | 2 | 4.05 | 138.8 | 0.34 | 51.2 | 85 | 30.6 | S |
| 43325 | 92 | 6 | 0 | 3.35 | 111.1 | 0.6 | 51.2 | 80 | 30.9 | S |
| 43229 | 88 | 6 | 0 | 5.28 | 81.3 | 0.48 | 52.3 | 85 | 34.3 | S |
| 41659 | 85 | 8 | 0 | 3.57 | 105.7 | 0.35 | 52.4 | 79 | 30.7 | S |
| 43383 | 88 | 6 | 3 | 3.58 | 105.9 | 0.52 | 52.7 | 86 | 32.2 | S |
| 43397 | 89 | 4 | 2 | 4.01 | 119.1 | 0.45 | 52.7 | 82 | 31.6 | S |
| 43605 | 88 | 2 | 3 | 3.57 | 117.6 | 0.68 | 53 | 85 | 32.3 | S |
| 41605 | 87 | 10 | 2 | 2.65 | 99.5 | 0.63 | 53.2 | 99 | 36.2 | S |
| 43382 | 86 | 5 | 2 | 4.5 | 123.9 | 0.61 | 53.2 | 88 | 32.1 | S |
| 41696 | 74 | 14 | 6 | 4.58 | 105.3 | 0.33 | 53.4 | 81 | 33.2 | S |
| 43308 | 94 | 4 | 1 | 3.27 | 112.5 | 0.53 | 53.4 | 89 | 34.4 | S |
| 43852 | 76 | 6 | 6 | 4.65 | 117.2 | 0.36 | 54.7 | 84 | 31.1 | S |
| 43808 | 90 | 3 | 5 | 3.18 | 116.1 | 0.61 | 55.6 | 87 | 37.1 | N |
| 43742 | 78 | 5 | 7 | 3.38 | 92.1 | 0.93 | 55.7 | 96 | 32.1 | N |
| 43783 | 92 | 3 | 5 | 9.47 | 106.4 | 0.62 | 55.8 | 100 | 36.7 | N |
| 43811 | 93 | 3 | 1 | 3.47 | 112.5 | 0.85 | 56.2 | 101 | 35.7 | N |
| 43745 | 93 | 1 | 1 | 3.45 | 109 | 0.96 | 56.5 | 107 | 38.5 | N |
| 43735 | 79 | 7 | 11 | 4.04 | 107 | 1.02 | 56.8 | 100 | 39.4 | N |
| 43815 | 88 | 3 | 1 | 3.03 | 132.6 | 0.47 | 57.3 | 102 | 37.5 | N |
| 43216 | 94 | 3 | 2 | 3.91 | 121.7 | 0.63 | 57.4 | 104 | 41.2 | N |
| 43833 | 85 | 9 | 2 | 4.22 | 116.7 | 0.5 | 57.8 | 101 | 35.8 | N |
| 41740 | 92 | 2 | 4 | 3.74 | 96.4 | 0.89 | 58.1 | 101 | 40.3 | N |
| 43360 | 91 | 3 | 4 | 5.38 | 108.6 | 0.64 | 58.2 | 107 | 36.8 | N |
| 41631 | 95 | 3 | 1 | 3.44 | 127.9 | 0.48 | 58.5 | 107 | 35.5 | N |
| 41636 | 82 | 9 | 3 | 5.86 | 108 | 0.39 | 58.7 | 101 | 36.8 | N |
| 43699 | 90 | 6 | 4 | 2.89 | 123.9 | 0.49 | 59.4 | 105 | 40.9 | N |
| 43412 | 90 | 5 | 1 | 3.75 | 117.3 | 0.31 | 59.7 | 107 | 36.8 | N |
| 41724 | 91 | 3 | 5 | 2.4 | 127.5 | 0.42 | 59.8 | 111 | 43.2 | N |
| 43640 | 92 | 3 | 2 | 4.96 | 101.8 | 1.01 | 59.8 | 101 | 38.5 | N |
| 43422 | 78 | 7 | 8 | 4.07 | 92.9 | 0.54 | 60.2 | 100 | 39.7 | N |
| 41676 | 75 | 17 | 0 | 4.41 | 119.3 | 0.34 | 60.2 | 100 | 38.8 | N |
| 41726 | 81 | 6 | 1 | 6.44 | 119.8 | 0.72 | 60.9 | 109 | 42.2 | N |
| 43175 | 93 | 5 | 0 | 2.03 | 93.8 | 0.57 | 61.7 | 106 | 44.5 | N |

Abbreviations: CR, calving rate; DF%, percentage of cells with high DNA fragmentation/denaturation ratio values; HIGR, high green fluorescence; Major, major abnormalities; N, normal fertility; Normal, normal spermatozoa; NR-index, corrected NRR; NRR, percentage of nonreturn to estrus; Prox, proximal cytoplasmic droplets; S, subfertile; SD DF, SD of cells with high DNA fragmentation/denaturation ratio values.

Table 3

Spearman correlation coefficients of the bulls grouped for fertility (N = 43).

| Variable | Normal | Major | Prox | DF% | SD DF | HIGR | NRR | NR-index | CR |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Normal | 1.00 | -0.70 ^a | -0.44 ^a | -0.50 ^a | -0.01 | 0.27 | 0.35 ^a | 0.49 ^a | 0.42 ^a |
| Major | -0.70 ^a | 1.00 | 0.03 | 0.36 ^a | 0.03 | -0.32 ^a | -0.17 | -0.35 ^a | -0.24 |
| Prox | -0.44 ^a | 0.03 | 1.00 | 0.32 ^a | -0.13 | 0.08 | -0.17 | -0.19 | -0.12 |
| DF% | -0.50 ^a | 0.36 ^a | 0.32 ^a | 1.00 | 0.03 | -0.02 | -0.05 | -0.15 | -0.15 |
| SD DF | -0.01 | 0.03 | -0.13 | 0.03 | 1.00 | -0.22 | -0.05 | 0.00 | -0.11 |
| HIGR | 0.27 | -0.32 ^a | 0.08 | -0.02 | -0.22 | 1.00 | 0.18 | 0.28 | 0.31 ^a |
| NRR | 0.35 ^a | -0.17 | -0.17 | -0.05 | -0.05 | 0.18 | 1.00 | 0.90 ^a | 0.91 ^a |
| NR-index | 0.49 ^a | -0.35 ^a | -0.19 | -0.15 | 0.00 | 0.28 | 0.90 ^a | 1.00 | 0.88 ^a |
| CR | 0.42 ^a | -0.24 | -0.12 | -0.15 | -0.11 | 0.31 ^a | 0.91 ^a | 0.88 ^a | 1.00 |

Abbreviations: CR, calving rate; DF%, percentage of cells with high DNA fragmentation/denaturation ratio values; HIGR, high green fluorescence; Major, major abnormalities; Normal, normal spermatozoa; NR-index, corrected NRR; NRR, percentage of nonreturn to estrus; Prox, proximal cytoplasmic droplets; SD DF, SD of cells with high DNA fragmentation/denaturation ratio values.

^a Significant ($P < 0.05$) correlations.

it related positively to CR. The sperm quality parameter that had the best correlation with fertility was the proportion of morphologically normal spermatozoa (Table 3). This was also the only parameter that had a significant but rather weak correlation with all three fertility parameters. A similarly weak but significant correlation was found between the percentage of major sperm defects and NR-index, and between HIGR and CR (Table 3). The percentage of DNA fragmentation showed a significant negative correlation with percentage of normal spermatozoa, but not with fertility (Table 3). In the additive animal material containing the sperm from the three extra bulls, the HIGR showed higher values for the bulls having meiotic disturbances and also with reciprocal translocation (Table 4).

Mann–Whitney *U* test revealed a significant difference ($P < 0.05$) between the two bull groups in the percentage of morphologically normal spermatozoa, major defects, and HIGR (Fig. 1). Median values of normal spermatozoa, major defects, and HIGR were 85% versus 90%, 6% versus 3%, 0.48% versus 0.61%, for subfertile and fertile bulls, respectively.

A receiver operating characteristic analysis was used to detect the diagnostic value of the different sperm parameters hereby explored. The calculated AUC shows the usefulness of a test to discriminate two populations (in our case, subfertile from fertile bulls). An AUC value less than 0.6 indicated no discrimination, because it lacked statistical significance. In the present study, all SCSA parameters showed no discrimination between the two NRR populations; only the percentage of morphologically normal spermatozoa and the proportion of major sperm defects showed a statistically significant discrimination between subfertile and fertile animals (Table 5). We also calculated a Youden index to establish the threshold value for percentage of morphologically normal spermatozoa and proportions of major sperm defects: 89% of spermatozoa with normal morphology and 6% of major sperm defects appeared as an optimum threshold between subfertile and fertile bulls for this particular population.

4. Discussion

We studied preselected semen doses accepted for use in AI based on the quality control on the bull station in Finland, which is also praxis on most bull stations worldwide. In this study containing approximately the

same number of subfertile and normal control bulls (hereby defined as less than or greater than a NRR of 55%) the only parameter that showed a significant correlation with all three fertility parameters was the percentage of morphologically normal spermatozoa, followed by a significant relation between NR-index and proportions of major sperm defects, a relation lost when calving rate was explored. There is a relationship between sperm morphology and fertility after AI in bull sires, but the relationship is widely variable, with much depending on the number of bulls examined, the laboratories involved, and the type of method used. Thresholds of 10% of abnormal sperm head shapes had been pointed out for young and progeny tested dairy bulls [21], with pear-shaped sperm heads being the most compromising abnormality for fertility. This particular study confirmed, as well, the concept that the repeated proportions of morphologically normal spermatozoa in the repeated ejaculates of a sire over time certainly relate to its fertility [21]. In other words, normal morphology reflects production normality and thus can differentiate sires. The findings not only called for routine, frequent screenings of sperm morphology in AI-stud bull sires [21] but also for alternative exams, such as techniques that could explore a relationship between chromatin defects and sperm head shape. Sperm chromatin structure assay has been pointed out as a possible method for exploring this relation.

Interestingly, the present study—using a Youden index to establish the threshold value for percentage of morphologically normal spermatozoa and proportions of major sperm defects—determined that approximately 10% of major sperm defects (mostly displayed at the sperm head level) is a basic threshold thus confirming previous findings in other Scandinavian AI sires (Swedish Red and Swedish Holstein breeds) [21]. This calls for a higher attention to the proportions of spermatozoa displaying normal morphology in AI sires, a simple discernible sperm population, free from differences between classification methods, laboratories, or tradition. Perhaps more importantly, proportions of morphological deviations indicate infections in the genitals of the sire, or suboptimal handling of the semen during collection and further processing, and proportions of normal spermatozoa are highly relevant for fertility (as demonstrated in this and our previous studies) we should consider that—for highly selected AI-sires—where their

Table 4

High green fluorescence values for all bulls (N = 46).

| Bull | HIGR (%) | DF% | Comment |
|-------|----------|-------|--|
| 14352 | 11.27 | 32.05 | Approximately 20% diploid spermatozoa (MII division failure) |
| 39950 | 9.51 | 5.44 | Approximately 20% diploid spermatozoa (MI division failure) |
| 42584 | 1.88 | 6.23 | Reciprocal chromosomal translocation RCP(2;4)(q45;q34) |
| 38490 | 1.33 | 3.9 | Reciprocal chromosomal translocation RCP(20;24)(q17;q25) |
| 43735 | 1.02 | 4.04 | Normal control bull |
| 43640 | 1.01 | 4.96 | Normal control bull |
| 43745 | 0.96 | 3.45 | Normal control bull |
| 43742 | 0.93 | 3.38 | Subfertile (unknown reason) |
| 41740 | 0.89 | 3.74 | Normal control bull |
| 43811 | 0.85 | 3.47 | Normal control bull |
| 41726 | 0.72 | 6.44 | Normal control bull |
| 43605 | 0.68 | 3.57 | Subfertile (unknown reason) |
| 43802 | 0.65 | 4.05 | Subfertile (unknown reason) |
| 43360 | 0.64 | 5.38 | Normal control bull |
| 43216 | 0.63 | 3.91 | Normal control bull |
| 41605 | 0.63 | 2.65 | Normal control bull |
| 43783 | 0.62 | 9.47 | Normal control bull |
| 43808 | 0.61 | 3.18 | Subfertile (unknown reason) |
| 43382 | 0.61 | 4.5 | Subfertile (unknown reason) |
| 43325 | 0.6 | 3.35 | Subfertile (unknown reason) |
| 43175 | 0.57 | 2.03 | Normal control bull |
| 41746 | 0.55 | 3.95 | Subfertile (unknown reason) |
| 43422 | 0.54 | 4.07 | Normal control bull |
| 43308 | 0.53 | 3.27 | Subfertile (unknown reason) |
| 43383 | 0.52 | 3.58 | Subfertile (unknown reason) |
| 43833 | 0.5 | 4.22 | Normal control bull |
| 43699 | 0.49 | 2.89 | Normal control bull |
| 41631 | 0.48 | 3.44 | Normal control bull |
| 43229 | 0.48 | 5.28 | Subfertile (unknown reason) |
| 41702 | 0.48 | 10.53 | Subfertile (unknown reason) |
| 43815 | 0.47 | 3.03 | Normal control bull |
| 41031 | 0.47 | 2.14 | Subfertile (chromosome breakages) |
| 41638 | 0.46 | 2.52 | Subfertile (unknown reason) |
| 43397 | 0.45 | 4.01 | Subfertile (unknown reason) |
| 41724 | 0.42 | 2.4 | Normal control bull |
| 41564 | 0.4 | 7.62 | Subfertile (unknown reason) |
| 41636 | 0.39 | 5.86 | Normal control bull |
| 44057 | 0.38 | 6.81 | Subfertile (unknown reason) |
| 43827 | 0.38 | 3.26 | Subfertile (unknown reason) |
| 43733 | 0.36 | 3.95 | Subfertile (unknown reason) |
| 43852 | 0.36 | 4.65 | Subfertile (unknown reason) |
| 41659 | 0.35 | 3.57 | Subfertile (unknown reason) |
| 41587 | 0.34 | 4.05 | Subfertile (unknown reason) |
| 41676 | 0.34 | 4.41 | Normal control bull |
| 41696 | 0.33 | 4.58 | Subfertile (unknown reason) |
| 43412 | 0.31 | 3.75 | Normal control bull |

Bulls with meiotic failure and reciprocal translocations show the highest values for HIGR.

Abbreviations: DF%, percentage of cells with high DNA fragmentation/denaturation ratio values; HIGR, high green fluorescence; M, metaphase.

health status is followed continuously, a parameter that would easily be introduced as routine is to account for the proportions of spermatozoa with normal morphology.

Among the bulls hereby examined by SCSA, the percentage of DNA fragmentation correlated significantly with the percentage of normal spermatozoa, a perhaps logical relation. However, there was a lack of relation with fertility after AI, considering any of the fertility variables investigated. This might depend on the low effect of such sperm head shapes on the population under study, or in the lack of value of the SCSA as a prognostic tool. Another parameter, the HIGR showed the highest values for sperm

doses collected from bulls added to the initial population of AI sires. These added sires had either meiotic problems and contained a high proportion (approximately 20%) of diploid spermatozoa or had a reciprocal chromosomal translocation. High green fluorescence is identified as higher green stainability as compared with the main population of the control bulls and indicates incomplete histone–protamine exchange [27], a defective situation with implications for epigenetic changes. Although of value, particularly when deciding further exams (for instance of a cytogenetic nature), the HIGR does, however, not appear to be prognostic for fertility in a general population. Somewhat surprisingly, the normal fertility subgroup had significantly higher HIGR values than the low fertility subgroup; however, the median value of the normal group was still less than 1% which indicates that this difference was not biologically relevant.

Taken together, the findings suggest that sperm morphology can still be used as a quality control measure for bull semen irrespective of whether NRR or CR parameters are used, particularly when focusing on the proportions of morphologically normal spermatozoa in primary screenings, as discussed above. The percentage of major sperm defects showed a slightly weaker but still significant discriminative power. However, we would not advise including assessment and typification of sperm deviations as a quality control measure by the industry, because it implies higher knowledge of spermatology and it is more time-consuming. On the other hand, morphology evaluations still remain a basic tool to determine pathologies of the male animals, and should be used more frequently by andrologists, when deviations below optimal thresholds for proportions of morphologically normal spermatozoa appear. Nonetheless, sperm evaluations ought to include several hundred spermatozoa counted per sample to reach statistical power.

On the other hand, the parameters obtained via SCSA performed rather weakly for their relationship to fertility. Although chromatin status is gaining more and more interest in animal and human andrology, and several different assays are available to investigate the status of the sperm DNA, all of these have some drawbacks [31]. The major advantage of the SCSA over other tests is that it can simultaneously measure chromatin condensation (as indicated by HIGR) and DNA fragmentation, after acid challenge. Studies on the usefulness of SCSA (or other tests of chromatin status) in fertility prediction are conflicting—on some mammalian species it seemed to be useful (i.e., bull [32–34] with the Sperm-Halomax Kit), and in other species like boar, the results are less convincing [35], although Broekhuijse et al. [36] found that DNA damage in boar spermatozoa might be a good indicator of litter size and farrowing rate. Also in humans, Collins et al. [37] found that DNA integrity tests have low diagnostic value. In our previous experiments [38], SCSA outcomes did not show a strong relationship with fertility outcomes on proven AI bulls.

Obviously, subfertility might be from other causes, and an individual sperm quality test is not likely to be a good predictor of subfertility alone [39,40]. Defects of the sperm chromatin are conventionally considered as

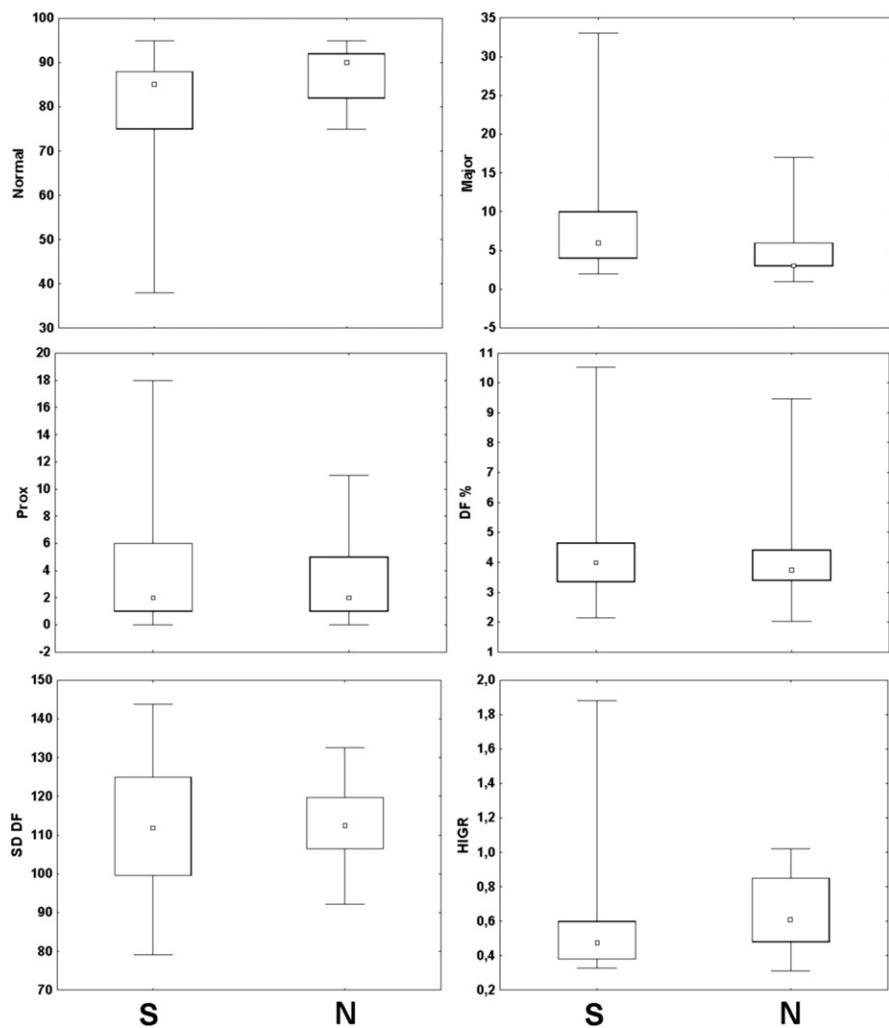


Fig. 1. Box-and-whisker plots comparing values of S and N groups analyzed using the Mann-Whitney U test (small square indicates median; large box indicates interquartile range, and whiskers indicate the range). DF %, percentage of cells with high DNA fragmentation/denaturation ratio values; HIGR, high green fluorescence; Major, major abnormalities; N, fertile; Normal, normal spermatozoa; Prox, proximal cytoplasmic droplets; S, subfertile; SD DF, SD of cells with high DNA fragmentation/denaturation ratio values.

uncompensable [22], because such spermatozoa might enter the oocyte and initiate embryogenesis but the embryonic development might be abnormal [41]. There is now a growing knowledge about the ability of the oocyte to

Table 5

Receiver operating characteristic curve analysis of subfertile and fertile bulls.

| NRR | AUC (\pm SE) | P |
|--------|-----------------|-------|
| Normal | 0.714 (0.075) | 0.004 |
| Major | 0.675 (0.060) | 0.004 |
| Prox | 0.537 (0.069) | 0.594 |
| DF% | 0.550 (0.086) | 0.562 |
| SD DF | 0.517 (0.087) | 0.843 |
| HIGR | 0.316 (0.080) | 0.021 |

Abbreviations: AUC, area under the curve; DF%, percentage of cells with high DNA fragmentation/denaturation ratio values; HIGR, high green fluorescence; Major, major abnormalities; Normal, normal spermatozoa; NRR, percentage of nonreturn to estrus; Prox, proximal cytoplasmic droplets; SD DF, SD of cells with high DNA fragmentation/denaturation ratio values; SE, standard error.

repair at least some of the sperm-borne DNA abnormalities [42–45]. It is possible that in some studies the weak performance of the chromatin status tests is—partly—because of the DNA-repairing ability of the oocyte (in case of false positive test results, i.e., high chromatin abnormality but acceptable fertility). Another case is when the test is false negative, i.e., good test result but subfertile. One possibility which should be further tested is that some of these semen samples contain chromatin aberrations which are not detectable with the currently applied tests, like SCSA—such as chromatin supercondensation [46]. Such spermatozoa are not able to decondense in the oocyte after fertilization resulting in early embryonic death.

4.1. Conclusions

The novel finding of this study is that the HIGR parameter in SCSA might represent an indicator of bulls (and possibly other species) with meiotic disturbances and

of bulls with reciprocal chromosomal translocations. Bulls having exceptionally high levels of HIGR should possibly be submitted for additional analyses such as cytogenetic analyses. Also, other, alternative assays of sperm chromatin condensation should be tested to find the easiest, least expensive option which has the highest indicative value. Traditionally, Feulgen staining is used to investigate sperm chromatin condensation [47,48], but other options like propidium iodide labeling in combination with flow cytometry [49] might offer a useful alternative, but further larger scale validating studies on subfertile and fertile animals are clearly needed.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Royal Swedish Academy of Agriculture and Forestry (KSLA) and the Knut and Alice Wallenbergs foundation (for-skarstipendiefond) and VR, Stockholm.

References

- [1] Garner DL. Ancillary tests of bull semen quality. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997;13:313–30.
- [2] Rodriguez-Martinez H, Larsson B. Assessment of sperm fertilizing ability in farm animals. *Acta Agric Scand A Anim Sci* 1998;(Suppl. 29):12–8.
- [3] Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP, Rodriguez-Martinez H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J Androl* 2011;13:406–19.
- [4] Veeramachaneni DN, Sawyer HR. Use of semen as biopsy material for assessment of health status of the stallion reproductive tract. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1996;12:101–10.
- [5] Saacke RG. Sperm morphology: its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 2008;70:473–8.
- [6] Chacon J, Perez E, Rodriguez-Martinez H. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermogramme parameters of extensively reared Brahman (*Bos indicus*) bulls in the tropics. *Theriogenology* 2002;58:41–50.
- [7] Rodriguez-Martinez H, Barth A. *In vitro* evaluation of sperm quality related to *in vivo* function and fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007;64:39–54.
- [8] Rodriguez-Martinez H. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:91–101.
- [9] Gravance CG, Champion ZJ, Casey PJ. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology* 1998;49:1219–30.
- [10] Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 1996;24:167–73.
- [11] Gravance CG, Garner DL, Pitt C, Vishwanath R, Sax-Gravance SK, Casey PJ. Replicate and technician variation associated with computer aided bull sperm head morphometry analysis (ASMA). *Int J Androl* 1999;22:77–82.
- [12] Marco-Jimenez F, Viudes-de-Castro MP, Balasch S, Moce E, Silvestre MA, Gomez EA, et al. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology* 2006;52:295–304.
- [13] Peña F, Saravia F, Johannisson A, Walgren M, Rodriguez-Martinez H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. *Int J Androl* 2005;28:107–14.
- [14] Auger J. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? *Asian J Androl* 2010;12:36–46.
- [15] Saravia F, Nunez-Martinez I, Moran JM, Soler C, Muriel A, Rodriguez-Martinez H, et al. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology* 2007;68:196–203.
- [16] Saacke RG, DeJarnette JM, Bame JH, Karabinus DS, Whitman SS. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology* 1998;50:117–28.
- [17] Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ. Fertilization characteristics and *in vitro* embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. *Mol Reprod Dev* 1998;50:328–33.
- [18] Thundathil J, Meyer R, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology* 2000;54:921–34.
- [19] Thundathil J, Palasz AT, Mapletoft RJ, Barth AD. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1999;57:35–50.
- [20] Phillips NJ, McGowan MR, Johnston SD, Mayer DG. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Anim Reprod Sci* 2004;81:47–61.
- [21] Al-Makhzoomi A, Lundeheim N, Haard M, Rodriguez-Martinez H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology* 2008;70:682–91.
- [22] Evenson DP. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev* 1999;11:1–15.
- [23] Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, Hammar L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand* 2008;50:2.
- [24] Watson PF. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec* 1975;97:12–5.
- [25] Blom E. Patologiske tilstande i kønsorgane og sæd som en årsag til afvisningen afavlsteire for import til og eksport fra Danmark (et andrologic retrospektiv, 1958–1982) [Pathological conditions in genital organs and sperm as a cause for the rejection of breeding bulls for import into and export from Denmark (an andrologic retrospective, 1958–1982)]. *Nord Vet Med* 1983;35:105–30 [in Danish].
- [26] Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci* 2000;22:169–89.
- [27] Evenson D, Jost L, Corzett M, Balhorn R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J Androl* 2000;21:739–46.
- [28] Revay T, Nagy S, Kopp C, Flyckt A, Rens W, Rath D, et al. Macrocephaly in bull spermatozoa is associated with nuclear vacuoles, diploidy and alteration of chromatin condensation. *Cytogenet Genome Res* 2009;126:202–9.
- [29] Aitken RJ, De Iuliis GN, Fennie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010;25:2415–26.
- [30] Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med* 2000;45:23–41.
- [31] Zini A, Signani M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl* 2009;30:219–29.
- [32] Ballache BE, Hohenboken WD, Evenson DP. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol Reprod* 1987;36:915–25.
- [33] Puglisi R, Pozzi A, Foglio L, Spano M, Eleuteri P, Grollino MG, et al. The usefulness of combining traditional sperm assessments with *in vitro* heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated *in vivo*. *Anim Reprod Sci* 2012;132:17–28.
- [34] Karoui S, Diaz C, González-Marín C, Amenabar ME, Serrano M, Ugarte E, et al. Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility? *J Anim Sci* 2012;90:2437–49.
- [35] Waberski D, Schapmann E, Henning H, Riesenbeck A, Brandt H. Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. *Theriogenology* 2011;75:337–45.
- [36] Broekhuysse ML, Sostaric E, Feitsma H, Gadella BM. Relation of flow cytometric sperm integrity assessments with boar fertility performance under optimized field conditions. *J Anim Sci* 2012;90:4327–36.
- [37] Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with *in vitro* fertilization? *Fertil Steril* 2008;89:823–31.
- [38] Hallap T, Nagy S, Haard M, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. *Theriogenology* 2005;63:1752–63.
- [39] Amann RP, Hammerstedt RH. *In vitro* evaluation of sperm quality – an opinion. *J Androl* 1993;14:397–406.
- [40] Graham J. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci* 2001;68:239–47.
- [41] Fatehi AN, Bevers MM, Schoeters E, Roelen BA, Colenbrander B, Gadella BM. DNA damage in bovine sperm does not block

- fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl* 2006;27:176–88.
- [42] Olsen AK, Lindeman B, Wiger R, Duale N, Brunborg G. How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;207:521–31.
- [43] Barton TS, Robaire B, Hales BF. DNA damage recognition in the rat zygote following chronic paternal cyclophosphamide exposure. *Toxicol Sci* 2007;100:495–503.
- [44] Marchetti F, Essers J, Kanaar R, Wyrobek AJ. Disruption of maternal DNA repair increases sperm-derived chromosomal aberrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17725–9.
- [45] Hourcade JD, Perez-Crespo M, Fernandez-Gonzalez R, Pintado B, Gutierrez-Adan A. Selection against spermatozoa with fragmented DNA after postovulatory mating depends on the type of damage. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:9.
- [46] Rodriguez H, Ohanian C, Bustos-Obregon E. Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa *in vitro*: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen. *Int J Androl* 1985;8:147–58.
- [47] Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. 1st ed. Ames: Iowa State University Press; 1989.
- [48] Dobrinski I, Hughes HPA, Barth AD. Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *J Reprod Fertil* 1994;101:531–8.
- [49] Vicari E, Perdichizzi A, De Palma A, Burrello N, D'Agata R, Calogero A. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: case report. *Hum Reprod* 2002;17:2128–33.

A COMPARISON OF ALTERNATIVE ASSAYS TO MEASURE DNA DAMAGE IN STALLION SPERMATOZOA: TUNEL TEST VERSUS ‘NICOLETTI ASSAY’

Balázs KAKASI^{1*}, Szabolcs NAGY², László PÁL², Gyula E. CZIMBER³
 and Ferenc HUSVÉTH²

¹Department of Limnology, Institute of Environmental Sciences, University of Pannonia,
 Wartha Vince u. 1, H-8200 Veszprém, Hungary; ²Department of Animal Sciences and
 Animal Husbandry, Georgikon Faculty, University of Pannonia, Keszthely, Hungary;
³BioCzinov Ltd., Mosonmagyaróvár, Hungary

(Received 22 August 2014; accepted 29 October 2014)

The aberrations of sperm DNA may cause various problems and have negative consequences on fertility. These influence embryonic development or might lead to early embryo loss. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) is the flow cytometric method most often used for the detection of DNA lesions; however, some studies using that method reached confusing conclusions. The aim of this pilot study was to adjust and compare two alternative tests, namely the TUNEL test and the Nicoletti assay. The above-mentioned two flow cytometric methods capable of detecting the fragmented DNA of sperm were tested on 12 frozen-thawed stallion semen samples. The TUNEL test demonstrated much higher DNA fragmentation ratio than the Nicoletti assay (mean \pm SD: $30.77 \pm 13.03\%$ vs. $1.93 \pm 0.89\%$, respectively). A fluorescent microscopic check of the samples showed that TUNEL labelled the plasma membrane and the mitochondria in a nonspecific way, rather than detecting only the fragmented DNA, thus eventually resulting in a false positive sign. The Nicoletti assay is simpler, quicker and does not detect nonspecific binding; however, further analyses are required to determine its diagnostic value.

Key words: Flow cytometry, TUNEL test, Nicoletti assay, stallion semen, DNA fragmentation

The success of fertilisation depends on many properties including the integrity of sperm DNA (Acharyya et al., 2005). Spermatozoa with fragmented DNA can be fully functional and are able to fertilise but have an increased chance to impair the fertilisation process or embryo development (Ahmadi and Ng, 1999; Evenson, 1999; Fatehi et al., 2006).

*Corresponding author; E-mail: balazs.kakasi@gmail.com; Phone: 0036 (83) 545-349;
 Fax: 0036 (83) 545-107

One of the flow cytometric methods most often used for the measurement of DNA fragmentation is the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA; Evenson et al., 1980). The test uses the acridine orange fluorescent dye to mark the DNA content of the cells, and measures the metachromatic shift from green to red fluorescence, which gives information about the chromatin structure, including DNA fragmentation (Evenson, 2013). In a recent study, Nagy et al. (2013) have shown that SCSA could not accurately differentiate between subfertile and fertile individuals of the tested bull population. In addition, there are flow cytometer companies which do not recommend using this dye in their devices (or suggest special care when using it), because stain residues may remain in the tubing of the instrument (Beckman Coulter technical support, personal communication). Moreover, the biological background of the assay was questioned (van der Schans et al., 2000).

The terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end-labelling (TUNEL) test is based on antibody reactions. The TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) binds to the 3'-hydroxyl ends of the DNA. Normally there are two 3'-hydroxyl ends in an intact DNA, but every strand break increases the number of possible TdT-binding nicks. After the TdT binds to the free nick ends, BrdUTP (5-bromo-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate) is added, which marks the end of the fragments. In the final step a fluorescent dye conjugated anti-BrdUTP antibody is added, and thus the DNA fragmentation of the cells can be accurately measured with a flow cytometer or a microscope. The test is one of the most popular methods for detecting apoptotic cells and DNA fragmentation. There are several reports on the use of this test on various cells and tissues (Oberhaus, 2003). Although the test is popular because of its microscopic and even flow cytometric applicability and simplicity, some authors have raised concerns about the limitations of its sensitivity and selectivity (Evenson and Wixon, 2006).

Nicoletti et al. (1991) described a simple method suitable for use in flow cytometric analyses. The test uses the fluorogenic dye propidium iodide (PI) to measure DNA fragmentation and apoptosis in cells. This dye binds stoichiometrically to nucleic acids in the DNA, so the measured fluorescence intensities of the cells can be used for determining the DNA content and the degree of DNA fragmentation. The intact DNA remains in the cells, resulting in a defined peak on the intensity histogram, but the small, fragmented DNA can leak out of the cells, and cells with DNA loss show a subdiploid (or in the case of spermatozoa a subhaploid) fluorescent signal. The assay has been applied successfully on several cell types (Riccardi and Nicoletti, 2006; Winkle et al., 2009).

Materials and methods

Samples

Frozen sperm samples of 12 randomly selected stallions were stored in 500- μ l straws in liquid nitrogen. The frozen semen samples were thawed in a 37 °C water bath for 60 sec, and then transferred to 2-ml Eppendorf tubes. Different straws of the same samples were thawed for the two tests.

TUNEL assay

The flow cytometric analysis of TUNEL test was carried out with the commercially available APO-BrdU™ TUNEL Assay Kit with Alexa Fluor® 488 anti-BrdU (A23210, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). In this study the attached assay protocol was followed, with slight modifications. Briefly, 1–2 \times 10⁶ cells were suspended in 0.5 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, P-4417, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), then 1.5 ml 1% paraformaldehyde was added and incubated for 15 min in a –20 °C freezer for fixation. The samples were washed twice in 2 ml PBS (400 \times g, 10 min), then cells were resuspended in 0.5 ml PBS, permeabilised in 1.5 ml 70% ethanol and stored at –20 °C overnight. On the next morning the samples were washed three times in the Wash Buffer provided in the TUNEL Kit (400 \times g, 10 min), then resuspended in 50 μ l of freshly prepared DNA Labelling Solution (provided in the Kit) and incubated at 37 °C for 1 h, during which period the samples were shaken at 15-min intervals. When the incubation time expired, 1 ml Rinse Buffer (also provided) was added and the suspensions were washed again (twice, 400 \times g, 10 min). Subsequently the cells were resuspended in 100 μ l freshly prepared Antibody Solution (provided in the Kit) and incubated for 30 min at room temperature in the dark. Finally 0.5 ml of the propidium iodide/RNase A staining buffer (provided in the Kit) was added and the cells were incubated in dark for an additional 30 min before the measurements were made on a Beckman Coulter FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) equipped with a 488 nm 20 mW Ar ion laser.

Fluorescence intensity of the Alexa Fluor 488 conjugate was collected with the FL1 (525 nm BP) detector in logarithmic mode. The sperm population and debris were gated, based on forward scatter versus FL3 (620 nm SP) plot properties. The acquisition record settings were 300 sec or 20,000 events. The files were stored as list mode (LMD) files. List mode files were analysed with Flowing Software (Version 2.5.1, <http://www.flowingsoftware.com>).

DNA fragmentation was indicated as an increase in the green fluorescence intensity of the Alexa Fluor 488-conjugate. After gating out the debris events and sperm aggregates, one-dimensional FL 1 histograms were drawn.

Nicoletti assay

The Nicoletti assay quick method was performed as described by Riccardi and Nicoletti (2006). From freshly thawed samples $1\text{--}2 \times 10^6$ cells were transferred into 1 ml PBS in Eppendorf tubes, and then centrifuged ($400 \times g$, 10 min). After washing, the cells were resuspended in 1 ml of a previously prepared Fluorochrome Solution containing 0.1% sodium citrate (wt/v; cat. no. 27833.237, VWR International, Radnor, PA, USA), 0.1% Triton X-100 (v/v; cat. no. 9002-93-1, G-Biosciences, St. Louis, MO, USA), 50 mg l⁻¹ PI (Component B of LIVE/DEAD Sperm Viability Kit, L-7011, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in distilled water and incubated at room temperature (20°C) for 1 h, then measured with the previously described cytometer.

The propidium iodide fluorescence intensity was collected at the FL3 (620 nm SP) detector on logarithmic scale. The files were stored as list mode (LMD) files.

The sperm population was distinguished from all other events based on light scatter properties (FSC vs. SSC), then one-dimensional FL 3 histograms were created. DNA fragmentation was indicated as decreased intensity below the main propidium iodide intensity peak.

Microscopy

Following the flow cytometric measurements, the samples were checked with an Olympus CX31 fluorescent microscope (Olympus Europe, Hamburg, Germany) equipped with a mercury arc lamp (U-RFLT50) and a fluorescent filter cube turret containing standard FITC and TRITC filters.

Confocal laser scanning microscopy

TUNEL-labelled spermatozoa (prepared as described above) were analysed by confocal microscopy. One drop of a labelled sperm suspension was put on a Superfrost slide, coverslipped and subsequently analysed on a Bio-Rad MRC 1024 confocal laser scanning microscope (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Statistics

The agreement of the two assays was assessed with Bland-Altman method agreement analysis (Bland and Altman, 1986) using Microsoft Excel 2013.

Results

The average ratio of DNA fragmentation was $30.77 \pm 13.03\%$ (mean \pm SD) with the TUNEL assay, while the Nicoletti assay showed a DNA fragmentation ratio as low as $1.93 \pm 0.89\%$.

The agreement between the two assays was calculated with the Bland–Altman method. A Bland–Altman plot was drawn, where the mean differences of the sample sets are represented. The mean difference of the measurements was -28.84% , indicating a large disagreement between the two assays (Fig. 1).

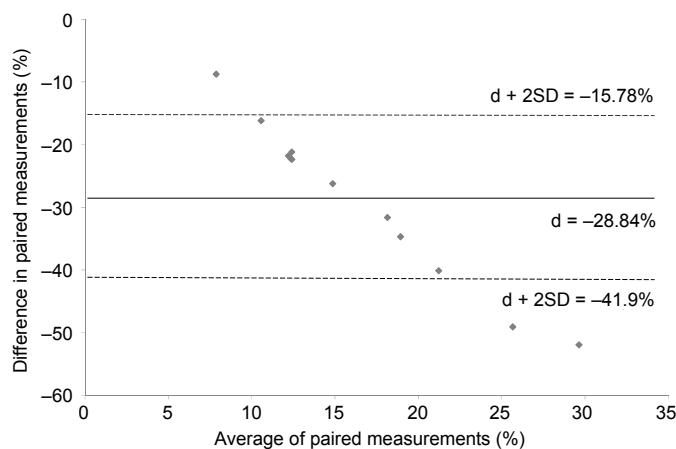


Fig. 1. Method-agreement analysis of cryopreserved stallion sperm DNA damage. The difference between the percentages of sperm DNA fragmentation as assessed by the TUNEL and the Nicoletti method are plotted against their average. The mean of the differences (d) and the limits of agreement ($\pm 2SD$) are presented

Discussion

The aim of the study was to set up and compare the flow cytometric TUNEL and the Nicoletti assays using stallion semen samples. As the results indicated, there were large differences between the two methods in the ratio of DNA damage. The Bland–Altman test showed that the two methods did not agree. This means that, although they both measure DNA fragmentation, they do not provide the same biological information.

The TUNEL test marks the 3'-OH ends of DNA strand breaks (single and double) with antibodies and fluorescent probes. However, the presence of strand breaks does not necessarily mean definite DNA fragmentation. Single and double strand breaks cannot be distinguished from each other with the TUNEL test (Ribeiro et al., 2006). The appearance of DNA single strand breaks is a preceding marker of the fragmentation process, because single strand breaks appear prior to the DNA fragmentation phase (Walker et al., 1997; Iglesias-Guimaraes et al., 2013). While the TUNEL test is able to identify an earlier stage of the DNA degrading process, the Nicoletti assay is used for detecting a later appearing apoptotic fragmentation. The propidium iodide dye used in the Nicoletti assay binds tightly to DNA. If the DNA is fragmented, the fragments loaded with fluo-

rescent dye loaded fragments may flow out of the cells, which finally results in lower-intensity peaks below the intact DNA peak (Riccardi and Nicoletti, 2006).

The large differences obtained between the results of the two methods suggested the possibility of nonspecific labelling with either the TUNEL or the Nicoletti assay. The fluorescent microscopic check of the TUNEL samples showed a nonspecific binding of the Alexa Fluor 488 conjugate to the mitochondria and the plasma membrane, generating a disfigured false positive TUNEL result. Some other authors have also found false positive results with the TUNEL test on various cell types including liver and kidney cells (Stahelin et al., 1998; Pulkkanen et al., 2000). The sensitivity and the selectivity of the assay have also been criticised; moreover, many variants exist and there are no conventional rules on how to carry out the test and evaluate the results (Perreault et al., 2000). The false positive results of TUNEL indicate that conventional flow cytometers are not able to locate the origin of the signal, so fluorescent microscopic control of the results should be a necessary step in every experiment to avoid the interpretation of false data. On the other hand, the Nicoletti assay is much simpler and quicker, and we did not notice any nonspecific binding with its use. However, further analyses are required to determine the diagnostic value of this test for fertility studies in the field.

Acknowledgements

This study was supported by the project TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0064. The project is supported by the European Union, with co-funding from the European Social Fund.

References

- Acharyya, S., Kanjilal, S. and Bhattacharyya, A. K. (2005): Does human sperm nuclear DNA integrity affect embryo quality? *Indian J. Exp. Biol.* **43**, 1016–1022.
- Ahmadi, A. and Ng, S. C. (1999): Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.* **284**, 696–704.
- Bland, J. M. and Altman, D. G. (1986): Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1**, 307–310.
- Evenson, D. P. (1999): Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod. Fertil. Dev.* **11**, 1–15.
- Evenson, D. P. (2013): Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol. Biol.* **927**, 147–164.
- Evenson, D. P., Darzynkiewicz, Z. and Melamed, M. R. (1980): Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* **210**, 1131–1133.
- Evenson, D. P. and Wixon, R. (2006): Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* **65**, 979–991.
- Fatehi, A. N., Bevers, M. M., Schoevers, E., Roelen, B. A. J., Colenbrander, B. and Gadella, B. M. (2006): DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J. Androl.* **27**, 176–188.
- Iglesias-Guimaraes, V., Gil-Guinon, E., Sanchez-Osuna, M., Casanelles, E., Garcia-Belinchon, M., Comella, J. X. and Yuste, V. J. (2013): Chromatin collapse during caspase-dependent apop-

- totic cell death requires DNA fragmentation factor, 40-kDa subunit-/caspase-activated deoxyribonuclease-mediated 3'-OH single-strand DNA breaks. *J. Biol. Chem.* **288**, 9200–9215.
- Nagy, S., Johannisson, A., Wahlsten, T., Ijas, R., Andersson, M. and Rodriguez-Martinez, H., (2013): Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology* **79**, 1153–1161.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C. (1991): A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**, 271–279.
- Oberhaus, S. M. (2003): TUNEL and immunofluorescence double-labeling assay for apoptotic cells with specific antigen(s). *Methods Mol. Biol.* **218**, 85–96.
- Perreault, S. D., Rubes, J., Robbins, W. A., Evenson, D. P. and Selevan, S. G. (2000): Evaluation of aneuploidy and DNA damage in human spermatozoa: applications in field studies. *Andrologia* **32**, 247–254.
- Pulkkanen, K. J., Laukkonen, M. O., Naarala, J. and Yla-Herttuala, S. (2000): False-positive apoptosis signal in mouse kidney and liver detected with TUNEL assay. *Apoptosis* **5**, 329–333.
- Ribeiro, G. F., Corte-Real, M. and Johansson, B. (2006): Characterization of DNA damage in yeast apoptosis induced by hydrogen peroxide, acetic acid, and hyperosmotic shock. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4584–4591.
- Riccardi, C. and Nicoletti, I. (2006): Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* **1**, 1458–1461.
- Stahelin, B. J., Marti, U., Solioz, M., Zimmermann, H. and Reichen, J. (1998): False positive staining in the TUNEL assay to detect apoptosis in liver and intestine is caused by endogenous nucleases and inhibited by diethyl pyrocarbonate. *Mol. Pathol.* **51**, 204–208.
- van der Schans, G. P., Haring, R., van Dijk-Knijnenburg, H. C., Bruijnzeel, P. L. and den Daas, N. H. (2000): An immunochemical assay to detect DNA damage in bovine sperm. *J. Androl.* **21**, 250–257.
- Walker, P. R., LeBlanc, J. and Sikorska, M. (1997): Evidence that DNA fragmentation in apoptosis is initiated and propagated by single-strand breaks. *Cell Death Differ.* **4**, 506–515.
- Winkle, T., Rosenbusch, B., Gagsteiger, F., Paiss, T. and Zoller, N. (2009): The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center. *J. Assist. Reprod. Genet.* **26**, 41–46.

QUICK CYTOGENETIC SCREENING OF BREEDING BULLS USING FLOW CYTOMETRIC SPERM DNA HISTOGRAM ANALYSIS

Szabolcs NAGY^{1*}, Péter J. POLGÁR¹, Magnus ANDERSSON² and András KOVÁCS³

¹Department of Animal Sciences and Animal Husbandry, Georgikon Faculty, University of Pannonia, Deák F. u. 16, H-8360 Keszthely, Hungary; ²Department of Production Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Saari Unit, Saarentaus, Finland; ³Institute of Animal Science, Biotechnology and Nature Conservation, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

(Received 7 December 2015; accepted 4 May 2016)

The aim of the present study was to test the FXCycle PI/RNase kit for routine DNA analyses in order to detect breeding bulls and/or insemination doses carrying cytogenetic aberrations. In a series of experiments we first established basic DNA histogram parameters of cytogenetically healthy breeding bulls by measuring the intraspecific genome size variation of three animals, then we compared the histogram profiles of bulls carrying cytogenetic defects to the baseline values. With the exception of one case the test was able to identify bulls with cytogenetic defects. Therefore, we conclude that the assay could be incorporated into the laboratory routine where flow cytometry is applied for semen quality control.

Key words: Cytogenetics, translocation, sperm, flow cytometry

According to Amann and Hammerstedt (1993), the fertilising spermatozoon has to have a series of attributes in order to achieve its goal: acceptable morphology, proper metabolism for energy production, progressive motility, capacity for hyperactive motility, etc. In addition, the genetic package of the fertilising spermatozoon must contain genes needed for development and lack lethal mutations or extra genetic material preventing development. It can be hypothesised that the higher the proportion of motile, viable, morphologically normal spermatozoa with intact chromatin in the insemination dose, the better the chances for pregnancy (Morrell and Rodriguez-Martinez, 2009). Although motility and viability (and less frequently morphology) are routinely assessed in AI stations, the status of the genetic material is rarely tested.

The status of the paternal genome can be viewed at three stages: besides the increasing focus on genomic selection of breeding males (Amann and DeJarnette, 2012), the intactness of the chromatin and the haploid set of chromosomes

*Corresponding author; E-mail: nagy.szabolcs@georgikon.hu; Phone: 0036 (83) 545-349

in the spermatozoon are different levels where we can assess the above-mentioned status. The organisation of the sperm chromatin is unique, as histone proteins are eventually replaced by transition proteins and finally by protamines, resulting in an extremely compact, condensed DNA (Dadoune, 1995; Sakkas et al., 1999). Proper condensation may stabilise the DNA and makes it less sensitive to oxidative damage; however, mature spermatozoa are not able to repair DNA damage. Abnormalities of the sperm chromatin structure can cause disturbances in fertility, pronuclear formation, early embryo quality and pregnancy outcome. These abnormalities are classified as ‘uncompensable’, as subfertile males cannot be brought to normal fertility by increasing the inseminate dosage. Sperm cells with uncompensable defects are able to fertilise oocytes; however, embryo development may be abnormal (Evenson, 1999).

The problem with paternal chromosomes can be viewed at two levels: (a) structural (i.e. translocations, deletions, duplications, etc.), and (b) numerical (alterations in the normal, haploid chromosome numbers).

Since the 1960s, animal cytogenetics has become more and more important (Ducos et al., 2008). The cytogenetic quality of breeding bulls and boars has great economic importance (Larsen et al., 2004). Classic techniques to detect abnormal karyotypes are based on microscopic analysis of peripheral blood lymphocytes (Matsson et al., 1986). Microscopic countings, however, are time consuming and require specialised expertise. Flow cytometry offers a more precise and quick alternative, and it was successfully applied in karyotyping of several mammalian species including sheep, cattle, pig (Dixon et al., 1992), dog (Langford et al., 1996) and human (van den Engh et al., 1985). Flow karyotyping has not become a routine evaluation for domestic animals as the technique is rather difficult and the resolution of bivariate flow karyograms is usually not perfect, i.e. the smaller chromosomes are not distinguishable. Moreover, individual chromosome polymorphisms can result in differing flow karyotypes between healthy individuals. The sensitivity of the technique stands between that of traditional light microscopic chromosome banding and flow cytometric assessment of the total DNA content of whole cells (Givan, 2001).

Flow cytometry offers a tool to measure the total DNA content of sperm cells (Lewalski et al., 1991), which has several advantages, like no need to collect blood and the possibility of monitoring transported semen without actually meeting the animal in question. Translocation carriers were successfully detected by flow cytometry (Lewalski et al., 1991, 1993). The flow cytometric DNA content analysis of spermatozoa has led to the successful separation of X- and Y-chromosome bearing germ cells (Gledhill et al., 1976; Meistrich et al., 1978). The unique paddle-like shape of the mammalian spermatozoon, however, is a great technical challenge, and special hydrodynamic cell orientation is needed to ensure that every spermatozoon will have the same orientation allowing the fluorescence measurement of the flat surface of the cells (Garner, 2001). In our pre-

vious studies (Revay et al., 2009, 2010) our flow cytometric analyses revealed spermatozoa with abnormal chromosomal content and incomplete chromatin condensation.

To overcome the need of a sophisticated flow cytometer equipped with a sperm head orienting device, Larsen et al. (2004) developed a simplified approach for the detection of males with spermatozoa carrying cytogenetic aberrations. They applied a series of enzymatic and chemical treatments for sperm head decondensation to have swollen and rounded sperm nuclei, eliminating the need of sperm orientation. They developed a model for normality of the sperm DNA histograms: two subpopulations (i.e. X- and Y-chromosome bearing germ cells) and histogram CV equal to or less than 1.3%. They stated, however, that their protocol was unfeasible in its current form for routine screening purposes. They suggested several critical points for the improvement; however, these have not been carried out so far.

Recently, relatively cheap and easy-to-use benchtop flow cytometers have become available even for the use in routine AI centres for daily semen quality control (Hossain et al., 2011). Most of these instruments are, however, equipped with a 488 nm laser which is not suitable for the DNA-specific fluorochromes used in sperm sexing and other quantitative DNA analyses, namely the Hoechst dyes and 4'6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) stain.

The aim of the present study was to test another fluorochrome which is properly excited with the 488 nm laser line and therefore would be suitable for routine DNA analyses aiming to detect breeding males and/or insemination doses carrying cytogenetic aberrations. In a series of experiments we first established basic DNA histogram parameters of cytogenetically healthy breeding bulls by measuring the intraspecific genome size variation of three animals (each of them three times – as suggested by Dolezel and Bartos, 2005), then we compared the histogram profiles of bulls carrying cytogenetic defects to the baseline values.

Materials and methods

Semen samples

In Experiment 1 we used frozen-thawed semen samples from three bulls free from cytogenetic defects. In Experiment 2 one of the bulls from Experiment 1 was used as control (bull A) and bulls with the following cytogenetic aberrations were tested: bull B was a carrier of 2;4 reciprocal translocation (Switonski et al., 2008); bull C was a carrier of 20;24 reciprocal translocation (Andersson et al., 1992); bull D produced approximately 20–25% diploid spermatozoa (Revay et al., 2010); bull E had a translocation between chromosomes 6 and 29 (Venhoranta et al., 2013).

DNA labelling

Sperm DNA was labelled with propidium iodide (PI) as part of the FXCycle PI/RNase kit (F10797, Molecular Probes).

Labelling followed the protocol suggested by the manufacturer: spermatozoa were fixed in 70% ethanol, then washed from the fixative (centrifuged at $400 \times g$ for 10 min). Five hundred μl of FXCycle PI/RNase staining solution was added to the cell pellets (approximately $1 \times 10^6/\text{ml}$ spermatozoa) and after vortexing the samples were incubated for 30 min at room temperature in the dark before flow cytometric analyses.

Flow cytometry

We measured the DNA quantity expressed as PI fluorescence intensity with a Beckman Coulter FC500 flow cytometer, equipped with a 488 nm 20 mW argon ion laser. PI fluorescence was detected on an FL3 detector (655 nm LP) in linear mode. Sperm head orientation was not taken into consideration as our benchtop flow cytometer was not equipped with such an orienting device. Doublet discrimination was done according to the suggestions of the manufacturer (Beckman Coulter). Five thousand events per sample were recorded and scatter and fluorescence intensities were stored in list mode files. The flow cytometer was calibrated daily with FlowCheck fluorospheres (6605359, Beckman Coulter); moreover, in order to monitor random drift in fluorescence intensities between samples, every sample contained 10 μl FlowSet fluorospheres (6607007, Beckman Coulter) serving as internal control.

Analysis

In Experiment 1, one-parameter PI fluorescence intensity histograms were drawn and individual histogram profiles were compared with the Kolmogorov–Smirnov option in the CXP Analysis software (Beckman Coulter) of the cytometer. This analysis assesses the difference between two populations and shows the maximum difference between two cumulative frequency distributions expressed as Dmax value (Young, 1977; Watson, 2001). Dmax values were calculated for paired histograms (three bulls, three repeats: $n = 36$ pairs) and these values were checked for normality using Lilliefors test and descriptive statistics were established with Statistica for Windows (version 8, Statsoft Inc.).

In Experiment 2, the histogram profiles (Fig. 1) of the carrier bulls were compared to the control bull using the Kolmogorov–Smirnov test as described above. The threshold Dmax value to differentiate healthy and possibly defective animals was derived from the descriptive statistics in Experiment 1 and was calculated as mean + 2SD (Indrayan, 2012).

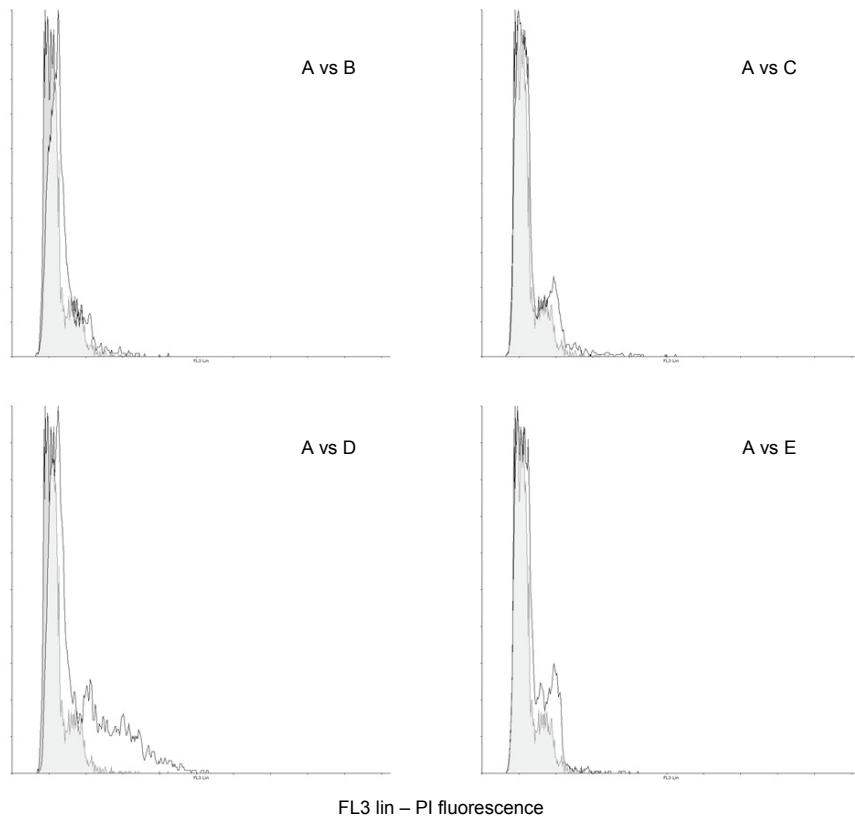


Fig. 1. DNA histogram overlays of the carrier bulls (B–E; white histograms) and the control bull (A; grey). X-axis shows PI fluorescence, expressed on a linear, 1023-channel scale

Results

Experiment I

Dmax values of the paired histograms are shown in Table 1. The Kolmogorov–Smirnov test revealed significant differences between bulls or even between repeated measurements of the same individual ($P < 0.05$) with the exception of bull 2 where the repeated measurements were not significantly different. However, since the Kolmogorov–Smirnov test is reported to be oversensitive (Parikh et al., 1999; Lampariello, 2000) we did not consider this as a flaw of the data analysis approach.

Dmax values showed normal distribution ($P > 0.2$, Lilliefors test) and the descriptive statistics were as follow: mean: 0.087; SD: 0.037; variance: 0.001; minimum: 0.018; maximum: 0.155. The calculated Dmax threshold value was 0.161 (calculated as mean + 2SD).

Table 1

Matrix of Dmax values of paired histograms of the three healthy bulls measured in three repeats

| Sample | 11 | 12 | 13 | 21 | 22 | 23 | 31 | 32 | 33 |
|--------|----|-------|-------|-------|--------------|--------------|-------|--------------|-------|
| 11 | 0 | 0.059 | 0.117 | 0.086 | 0.084 | 0.0868 | 0.128 | 0.074 | 0.155 |
| 12 | | 0 | 0.061 | 0.119 | 0.107 | 0.119 | 0.081 | 0.091 | 0.106 |
| 13 | | | 0 | 0.136 | 0.119 | 0.133 | 0.059 | 0.100 | 0.072 |
| 21 | | | | 0 | 0.026 | 0.021 | 0.106 | 0.038 | 0.130 |
| 22 | | | | | 0 | 0.018 | 0.086 | 0.027 | 0.105 |
| 23 | | | | | | 0 | 0.103 | 0.035 | 0.123 |
| 31 | | | | | | | 0 | 0.079 | 0.035 |
| 32 | | | | | | | | 0 | 0.099 |
| 33 | | | | | | | | | 0 |

Sample codes mean: bull-repeat (i.e. 11 means Bull 1 repeat 1). Dmax values not significant at $P < 0.05$ are in bold italics

Experiment 2

The histogram profiles (Fig. 1) of the carrier bulls differed significantly ($P < 0.01$) from the control bull (A) and the Dmax values were as follow: bull A vs. B: 0.245; A vs. C: 0.128; A vs. D: 0.416; A vs. E: 0.166. With the exception of bull C, every carrier bull showed higher Dmax value than the threshold value established in Experiment 1. This can be explained as in that case smaller chromosomes (chromosomes 20 and 24) were involved, so probably only a very small amount of DNA was missing or added in the affected sperm cells.

Discussion

In our opinion this flow cytometric approach has several advantages. The fluorescent labelling kit is easy to use, does not require excessive sample preparation, quick, and the fluorochrome can be analysed with the standard laser line and optics of every benchtop flow cytometer. The Kolmogorov–Smirnov option is available in the software of most flow cytometer brands, therefore no additional software purchase is needed. Individual bulls or even insemination doses can be evaluated quickly, so the method can be applied to test the animal even if he is not physically present (like in the case of semen import). We suggest that every laboratory should establish its threshold values following the study design described above as flow cytometer instruments with different optical settings may result in different Dmax values; moreover, different cattle breeds (due to Y chromosome polymorphisms, for example) may have different DNA histogram profiles. The test fits into the laboratory routine where flow cytometry is applied for semen quality control, and this analysis should be carried out only once in the lifetime of a bull.

Acknowledgement

This study was supported by the National Scientific Research Fund (OTKA K-109039).

References

- Amann, R. P. and DeJarnette, J. M. (2012): Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: a paradigm shift. *Theriogenology* **77**, 795–817.
- Amann, R. P. and Hammerstedt, R. H. (1993): *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *J. Androl.* **14**, 397–406.
- Andersson, M., Aalto, J. and Gustavsson, I. (1992): Embryo quality and andrological study of two subfertile bulls versus five control bulls with normal fertility. *Theriogenology* **38**, 623–631.
- Christensen, K. and Pedersen, J. O. (1990): Chromosome C-band polymorphism in relation to fertility in boars of the Duroc breed. *Hereditas* **113**, 183–187.
- Dadoune, J.-P. (1995): The nuclear status of human sperm cells. *Micron* **26**, 323–345.
- Dixon, S. C., Miller, N. G. A., Carter, N. P. and Tucker, E. M. (1992): Bivariate flow cytometry of farm animal chromosomes: a potential tool for gene mapping. *Anim. Genet.* **23**, 203–210.
- Dolezel, J. and Bartos, J. (2005): Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Ann. Bot.* **95**, 99–110.
- Ducos, A., Revay, T., Kovacs, A., Hidas, A., Pinton, A., Bonnet-Garnier, A., Molteni, L., Slota, E., Switonksi, M., Arruga, M. V., van Haeringen, W. A., Nicolae, I., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., Andersson, M. and Iannuzzi, L. (2008): Cytogenetic screening of livestock populations in Europe: an overview. *Cytogenet. Genome Res.* **120**, 26–41.
- Evenson, D. P. (1999): Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod. Fert. Dev.* **11**, 1–15.
- Garner, D. L. (2001): Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *J. Androl.* **22**, 519–526.
- Givan, A. L. (2001): Flow Cytometry: First Principles. Wiley-Liss, Inc., 273 pp.
- Gledhill, B. L., Lake, S., Steinmetz, L. L., Gray, J. W., Crawford, J. R., Dean, P. N. and Van Dilla, M. A. (1976): Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution. *J. Cell Physiol.* **87**, 367–375.
- Hossain, M. S., Johannsson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A. P. and Rodriguez-Martinez, H. (2011): Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J. Androl.* **13**, 406–419.
- Indrayan, A. (2012): Medical Biostatistics. Chapman & Hall/CRC Press, 1024 pp.
- Lampariello, F. (2000): On the use of the Kolmogorov-Smirnov statistical test for immunofluorescence histogram comparison. *Cytometry* **39**, 179–188.
- Langford, C. F., Fischer, P. E., Binns, M. M., Holmes, N. G. and Carter, N. P. (1996): Chromosome-specific paints from a high-resolution flow karyotype of the dog. *Chromosome Res.* **4**, 115–123.
- Larsen, J., Christensen, K., Larsen, J., Jensen, P., Gustavsson, I. and Christensen, I. (2004): High resolution DNA flow cytometry of boar sperm cells in identification of boars carrying cytogenic aberrations. *Theriogenology* **62**, 501–511.
- Lewalski, H., Otto, F. J., Kranert, T., Glahn-Luft, B. and Wassmuth, R. (1991): Analysis of the 1/20 translocation in ram spermatozoa by flow cytometry. *Genet. Sel. Evol.* **23**, Suppl. 152–156.

- Lewalski, H., Otto, F. J., Kranert, T. and Wassmuth, R. (1993): Flow cytometric detection of unbalanced ram spermatozoa from heterozygous 1;20 translocation carriers. *Cytogenet. Cell Genet.* **64**, 286–291.
- Matsson, P., Annerén, G. and Gustavsson, I. (1986): Flow cytometric karyotyping of mammals, using blood lymphocytes: Detection and analysis of chromosomal abnormalities. *Hereditas* **104**, 49–54.
- Meistrich, M. L., Göhde, W., White, R. A. and Schumann, J. (1978): Resolution of X and Y spermatids by pulse cytophotometry. *Nature* **274**, 821–823.
- Morrell, J. M. and Rodriguez-Martinez, H. (2009): Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. *Open Androl. J.* **1**, 1–9.
- Parikh, H. H., Li, W. C. and Ramanathan, M. (1999): Evaluation of an alternative to the Kolmogorov-Smirnov test for flow cytometric histogram comparisons. *J. Immunol. Methods* **229**, 97–105.
- Petrie, A. and Watson, P. (1999): Statistics for Veterinary and Animal Science. Blackwell Science Ltd. 243 pp.
- Revay, T., Kopp, C., Flyckt, A., Taponen, J., Ijäs, R., Nagy, Sz., Kovacs, A., Rens, W., Rath, D., Hidas, A., Taylor, J. F. and Andersson, M. (2010): Diploid spermatozoa caused by failure of the second meiotic division in a bull. *Theriogenology* **73**, 421–429.
- Revay, T., Nagy, Sz., Kopp, C., Flyckt, A., Rens, W., Rath, D., Hidas, A., Kovacs, A., Johannesson, A., Rodriguez-Martinez, H. and Andersson, M. (2009): Macrocephaly in bull spermatozoa is associated with nuclear vacuoles, diploidy and alteration of chromatin condensation. *Cytogenet. Genome Res.* **126**, 202–209.
- Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizarro, D., Bianchi, P. G. and Bianchi, U. (1999): Origin of DNA damage in human spermatozoa. *Rev. Reprod.* **4**, 31–37.
- Switonski, M., Andersson, M., Nowacka-Woszuk, J., Szczerbal, I., Sosnowski, J., Kopp, C., Cernohorska, H. and Rubes, J. (2008): Identification of a new reciprocal translocation in an AI bull by synaptonemal complex analysis, followed by chromosome painting. *Cytogenet. Genome Res.* **121**, 245–248.
- van den Engh, G. J., Trask, B. J., Gray, J. W., Langlois, R. G. and Yu, L.-C. (1985): Preparation and bivariate analysis of suspensions of human chromosomes. *Cytometry* **6**, 92–100.
- Venoranta, H., Pausch, H., Wysocki, M., Szczerbal, I., Hänninen, R., Taponen, J., Uimari, P., Flisikowski, K., Lohi, H., Fries, R., Switonski, M. and Andersson, M. (2013): Ectopic KIT copy number variation underlies impaired migration of primordial germ cells associated with gonadal hypoplasia in cattle (*Bos taurus*). *PLoS One* **26**, e75659.
- Watson, J. V. (2001): Proof without prejudice revisited: immunofluorescence histogram analysis using cumulative frequency subtraction plus ratio analysis of means. *Cytometry* **43**, 55–68.
- Young, I. T. (1977): Proof without prejudice: use of the Kolmogorov–Smirnov test for the analysis of histograms from flow systems and other sources. *J. Histochem. Cytochem.* **25**, 935–941.