

STANOVENÍ MEMBRÁNOVÉ RESISTENCE SPERMIÍ KANCE MODIFIKOVANÝM TESTEM HOS

Věžník Z., Přinosilová P., Zajícová A.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, Czech Republic

Abstract

Evaluating the hypoosmotic swelling (HOS) test in relation to fertilizing capacity and sperm motility, a number of authors obtained mostly positive results. If HOS test or sperm vitality staining is performed separately, positive result is obtained from HOS test for spermatozoa with intact plasma membrane (tail coiling as expected) and eosin-negative staining. However, membrane resistance differs among the cells, and after 30 min of exposure to hypoosmotic solution, eosin-positive staining can be observed in some spermatozoa. This indicates disturbed membrane integrity, even though HOS-positive result was obtained. The following categories can be differentiated:

HOS-positive sperm – eosin-negative staining = live spermatozoa – intact membrane

2. HOS-negative sperm – eosin-positive staining = dead spermatozoa – damaged membrane

3. HOS-positive sperm – eosin-positive staining = the response of spermatozoa was similar as in live cells, but their membrane damage was induced by the test because their function was impaired.

The proportion spermatozoa in the third category detected by this test indicated a decreased resistance of spermatozoa in the tested ejaculates. This fact was confirmed in bulls by correlation between the proportion of spermatozoa in the third category and the changes in resistance of sperm plasma membrane after cryopreservation and their success rates after thawing ($r = 0.455$; $p \leq 0.05$). Accordingly, the finding predicted sperm membrane quality and the success rates for cryopreservation. In boar spermatozoa, we compared HOS test results and eosin positive staining with sperm quality by the 120-min survival test. The results showed that sperm membrane integrity is a predictor of sperm function. Eosin staining of sperm exposed to HOS solution for 30 min did not show uniform results. Thus spermatozoa classified in category 3 (HOS+Eosin+) showed correlation with the decrease in proportion of live spermatozoa after 120-min survival test: $r = 0.522$ at $p = <0.01$. The impairment of sperm quality in ejaculates with higher proportion of HOS+E+ was evident from the calculated values of UKIE index (universal ejaculate quality index) even though differences between the values 3.311 (in the case of lower occurrence) and 3.061 (in the case of higher occurrence) in this category were not significant.

Key Words: Boar, spermatozoa, membrane integrity, hypoosmotic swelling test

Kvalitativní posouzení membrán spermií má, pro predikci úrovně ejakulátu z funkčního hlediska, rozhodující význam. Pouze spermie s funkční plazmatickou membránou, umožňující pohyb vody do a z buňky, jsou schopné přežít konzervační postupy (Eilts, 2005). Byl prokázán vztah mezi membránovou desintegrací spermií býků, vyvolanou poruchou vnitřního prostředí a sníženou resistencí vůči chladu až nemrazitelností semene (Věžník et al., 1988). Tyto skutečnosti navozují potřebu hodnocení funkční resistance membrán k predikci úrovně buněčné přežitelnosti.

Podle teorií o stavbě membrán je základní strukturální komponentou dvojvrstevný základ fosfolipidů a proteinů jejichž vkomponování do struktury membrán jim dalo označení jako strukturální proteiny. Na zevním povrchu je buněčná membrána pokryta vrstvou polysacharidů zvanou glykokalix. Význam této membránové složky je víceméně ochranný. Glykokalix je preventivní struktura stabilizující buněčnou membránu, ovlivňující selektivně rychlost difuze látek buněčnou membránou, udržující pH a povrchové napětí. U spermií tvoří též maskování povrchu k snížení rychlosti jejich rekognoskace v pohlavních cestách samic.

Integrita a normální funkceschopnost plazmatické membrány spermií je nezbytný předpoklad úspěšnosti fertilizace. Živé buňky si zachovávají asymetrické rozdělení různých fosfolipidů mezi vnitřní a vnější stěnou plazmatické membrány. Jsou-li buňky vystaveny extrémním nefyziologickým podmínkám dojde v nich k biochemickým a morfologickým změnám a nástupu nekrobiotického procesu. Nekróza začíná zhoršenou schopností buňky zachovat homeostázu, což vede k influxu vody a extracelulárních iontů. Hydropická degenerace se projeví změnou intracelulárních organel a celá buňka se postupně edematically mění. U spermie je především postižena oblast akrozomu a povrchové membrány, postupně mitochondriální struktury a bičik. Funkční testy integrity plazmatické membrány mohou potenciálně charakterizovat kvalitu buněk. Při rutinní analýze spermií zjišťuje se mnohdy významné procento mrtvých spermií. Všeobecně je tato buněčná smrt považována za důsledek buněčných nekrobiotických procesů, neboť používaná vitální barviva pro rozlišení živých a mrtvých spermií pronikají do spermií změnou permeability plazmatické membrány.

Integrita membránových systémů je při vyšetření semene propojena se stanovením živých a mrtvých spermií, neboť jejich průkaz je podložen právě změnami membrán. Potřeba informace o stavu buňky, především z hlediska její vitality, vedla již v roce 1940 Morosova (citace dle Věžník et al., 2004) k využití supravitálního barvení buněk eosinem. Tento princip diferencovat buňky s porušenou permeabilitou membrán dle průniku barviva platí dodnes a je podkladem k širokému uplatnění různých barviv a fluorochromů. Integrita plazmatické membrány spermií je dokladována též testem membránové tolerance a resistance vůči hypoosmotickému prostředí. Podstatou HOS testu je postulovaný předpoklad, že u nenarušené membrány živé spermie v hypoosmotickém prostředí dojde k reakci bičíků spermií jejich stáčením po průniku vody do buněčného interiéru. Výsledky tohoto testu byly hodnoceny řadou autorů v návaznosti na fertilizační efekt, pohyblivost spermií a většina závěrů vyzněla v pozitivní posudek. Při separovaném provedení HOS testu a intravitálního barvení na živé a mrtvé spermie dosáhneme u spermií s intaktním membránovým aparátem pozitivní reakce na HOS test tj. očekávané reakce bičíku a nezbarvení eosinem. Membránová resistance však není u všech buněk na stejné úrovni takže po expozici 30 minut v hypoosmotickém prostředí se u některých spermií, i při pozitivní reakci na HOS, projeví zabarvení eosinem jako doklad narušení membránové integrity. Znamená to tedy, že vznikají následující kategorie v diferenciálním hodnocení (viz obr. 1):

- HOS pozitivní reakce a zbarvení eosinem negativní - spermie živé a membrány intaktní
- HOS negativní reakce a zbarvení eosinem pozitivní - spermie mrtvé a membrány narušené
- HOS pozitivní reakce a zbarvení eosinem pozitivní - spermie reagovaly jako živé, ale v průběhu testu došlo k narušení membrán pro sníženou jejich funkční resistenci.

Cílem studie je doložit vztah kvalitativních změn membrán spermií kance na jejich funkční resistenci.

Materiál a metody

Do studie bylo zařazeno 27 kančích ejakulátů, získaných při kvalitativním hodnocení inseminační stanice. Kanci byli ve stáří 1 až 2 let plemene BU. Semeno bylo získáno manuálním odběrem a laboratorní vyšetření bylo provedeno následně in situ se stanovením: objemu semene, koncentrace spermií, jejich motilitě, procenta živých spermií, rychlosti pohybu spermií, aktivity mitochondrií formou indexu endogenních reduktáz, HOS testu v kombinaci s barvením eosinem, indexu UKIE (universální kvalitativní index ejakulátu). Všechna šetření byla podrobena 120min testu přežitelnosti pro možnost stanovení funkční kvalitativní resistance. Stejně tak bylo provedeno i morfologické posouzení ejakulátů (Věžník et al., 2004).

Z celkového souboru kančích ejakulátů byly vytvořeny dvě skupiny tvořené vždy 8 ejakuláty s nižší a vyšší frekvencí výskytu spermií HOS+ a eosin+.

Získané hodnoty byly statisticky zpracovány programem Software SPSS 16,0 version (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Kromě vyjádření výsledků průměry, SD, minimem a maximem, byly stanoveny korelace dle Spearmana.

Provedení HOS testu v kombinaci s barvením eosin-nigrosinem.

Hypoosmotický roztok: 0,735 g citrátu sodného ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 1,351 g fruktózy ve 100 ml destilované vody.

Pracovní postup:

1 ml roztoku ve zkumavce Eppendorf se zahřeje 5 min na teplotu 37°C, přidá se 0,1 ml semene, jemně se promíchá a kryje se krycím sklíčkem. Inkubuje se při teplotě 37°C po dobu 30 min. Po inkubaci a promíchání se zpracuje nátěr v kombinaci s dobarvením eosinem (0,5 %) nigrosinem (10 %) pro hodnocení ve světelném poli mikroskopu při zvětšení 1000x s použitím imerze.

Výsledky

Při diferenciálním cytogramu testu HOS v kombinaci s barvením eosinem byla velikost podílu třetí kategorie tj. nálezů HOS+ spermií provázených pozitivním zbarvením eosinem, dokladem o snižující se funkční resistenci spermií testovaného ejakulátu. Průměrná frekvence tohoto nálezu byla 21,8 %, SD 7,9, rozsah od 9 do 38,5 %. U semene kanců jsme se pokusili konfrontovat nálezy HOS testu s pozitivní reakcí na eosin s kvalitativní úrovní spermií po přežitelnostním testu. Výsledky prokázaly, že resistance integrity membrán sehrává roli prediktora funkční úrovně spermií. Při 30 minutovém ovlivnění membrán spermií při HOS testu byla dokumentována rozdílná úroveň v interakci eosinu. A takto vyvolaný obraz 3. kategorie HOS + a eosin + prokázal korelaci s poklesem živých spermií po 120 minutovém testu přežitelnosti na úrovni $r = 0,522$ při $p = 0,005$. Rozdíl v přežitelnosti spermií během 120min testu mezi skupinami s nižším a vyšším výskytem 3. kategorie ($p < 0,01$) je vyjádřen na obr. 2.

Při hodnocení kvalitativních ukazatelů v jednotlivých kriteriích byly doloženy nižší průměrné hodnoty u skupiny ejakulátů s vyšším výskytem nálezů spermií reagujících HOS+ a eosin +.

Shrnutím dosažených hodnot kvality ejakulátů a výpočtem indexů UKIE byl získán obdobný obraz nižších hodnot u skupiny s vyšším podílem 3 kategorie hodnocení HOS testu. U těchto souhrnných ukazatelů se nepodařilo prokázat statistickou významnost rozdílů stanovených průměrů.

Diskuze

HOS test v kombinaci se supravitálním barvením eosin-nigrosinem přináší hodnocení rozšířené o dynamiku změn membránové resistance. Tato skutečnost byla potvrzena též u býků korelací velikosti podílu třetí kategorie k změnám resistance membránového aparátu spermií při

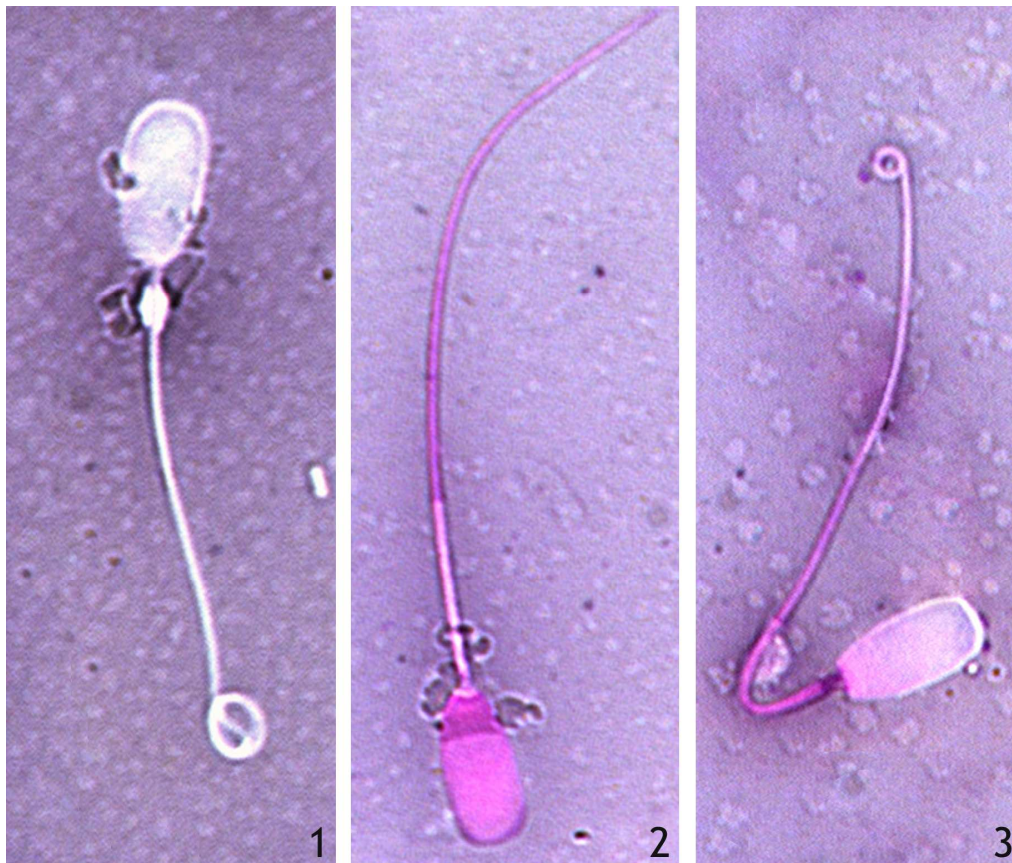
jejich konzervaci mrazem a úrovni resuscitace po jejich rozmrazení ($r = 0,455$, $p < 0,05$). Nález tedy predikoval úroveň membrán a následný proces resuscitace po zatížení semene zmrazením. Úlože HOS testu v souvislosti s kvalitativním hodnocením ejakulátů byla věnována poměrně široká pozornost. Metoda zavedená Jeyendranem et al. (1984) v humánní medicíně byla ověřena na ejakulátech hospodářských zvířat a stala se v současné době široce užívanou. Využití HOS testu v kombinaci se supravitálním barvením použili ve své studii Chan et al. (1991) a označili tento postup jako stanovení viability spermií v hypoosmotickém prostředí (VHOS). Výsledky doložily pozitivní korelaci nezbarvených a svinutých spermií k procentu penetrujících v assai penetrace spermií Percollem a skupině swim-up. Souhrnně bylo možno konstatovat, že využití studia VHOS a HOS parametrů se projevilo jako indikátor membránové integrity na hlavičce a bičíku spermií. Kombinace VHOS a HOS skýtá dobrou korelaci s predikcí úspěšné fertilizace. Obdobně doložili Tartaglione a Ritta (2004) u býků při supravitálním barvení eosinem u hypoosmotického testu pozitivní vztah k výsledkům

fertilizace (78 %), přičemž doložili zlepšení těchto výsledků použitím duálního barvení TBG (trypanová modř a Giemsa) až na 82 %. Vazquez et al., (1997) se věnovali hodnocení HOST v posuzování kvality kančího semene a jejich závěry dokládají přínos pro hodnocení funkční integrity membrán. Perez-Liano et al. (2001) posoudili shodu zkráceného hypoosmotického testu pro kančí semeno (sHOST) s klasickým postupem a při pozitivním výsledku šetření zdůraznili využitelnost tohoto testu k odhalování chladového šoku. Ve studii Perez-Liano et al. z roku 2003 rozšiřuje provedená pozorování o termální přežitelnostní test při 37° po dobu 120 min. se zaměřením na studium změn integrity akrozomální struktury spermií. Současné sledování membránové resistance testem HOS a kvality akrosomálních struktur dovoluje upřesnit kvalitu semene.

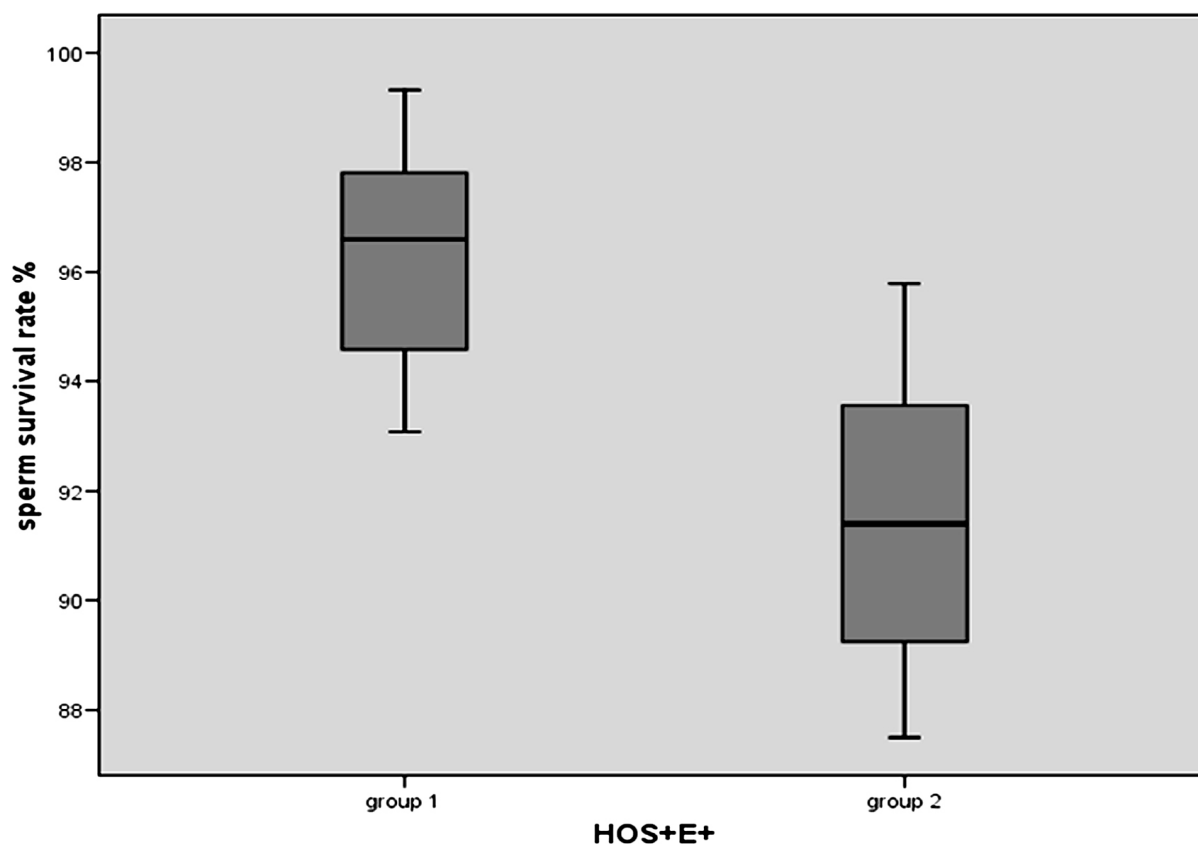
Naše předkládané pozorování dovoluje posoudit funkční úroveň membrán zatížených 30 minutovým termálním testem a vyhodnotit jejich resistenci, což dovoluje posoudit úroveň ejakulátu z hlediska jeho dalšího využití a jeho viability.

Obr. 1.

- 1/ HOS pozitivní reakce a zbarvení eosinem negativní - spermie živé a membrány intaktní;
- 2/ HOS negativní reakce a zbarvení eosinem pozitivní - spermie mrtvé a membrány narušené;
- 3/ HOS pozitivní reakce a zbarvení eosinem pozitivní - spermie reagovaly jako živé, ale v průběhu testu došlo k narušení membrán pro sníženou jejich funkční resistenci.



Obr. 2. Rozdíl v přežitelnosti spermií během 120min testu mezi skupinami s nižším (skupina 1) a vyšším (skupina 2) výskytem 3.kategorie modifikovaného testu HOS ($p < 0,01$).



Reference

- Chan PJ, Tredway DR, Corselli J, Pang SC, Su BC 1991: Combined supravital staining and hypoosmotic swelling test. *Hum Reprod.* 6: 1115-8.
- Eilts BE 2005: Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology.* 64: 692-697.
- Jeyendran RSH, Van der Ven H, Perez-Pelaez M, Grabo BG, Zaneveld LJD 1984: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 70: 219-228.
- Perez-Liano B, Lorenzo JL, Yenes P, Trejo A, Garcia-Casado P 2001: A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56: 387-98.
- Perez-Liano B, Yenes-Garcia P, Trejo A, Garcia-Casado P 2003: Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and scroosome status during incubation at 37 degrees C. *Theriogenology* 60: 1401-7.
- Tartaglione CM, Ritta MN 2004: Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62: 1245-52.
- Věžník Z, Švecová D, Láníková A, Vojtíšek B, Standara S 1988: Hlavní příčiny snížené kvality ejakulátů na inseminačních stanicích býků. Dílčí zpráva etapy P 06-329-809-01-05, VÚVeL, Brno, 50 p.
- Věžník Z., Švecová D., Zajícová A., Přinosilová P. 2004: Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. VÚVeL, Brno, 197 p.
- Vazquez JM, Martinez EA, Martinez P, Garcia-Artiga C, Roca J 1997: Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology* 47: 913-22.