

Wykorzystanie wybranych innowacyjnych technik laboratoryjnych w ocenie i poprawie jakości nasienia

© KINGA OSEMEK, © LESZEK KRAKOWSKI, © PIOTR BRODZKI

Zakład Andrologii i Biotechnologii Rozrodu, Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Otrzymano 16.04.2024

Zaakceptowano 31.05.2024

Osemek K., Krakowski L., Brodzki P.

Use of selected innovative laboratory techniques in the assessment and improvement of semen quality

Summary

The aim of this review was to present different techniques for examining semen and improving its quality. High quality of semen is a critical factor for successful mating and artificial insemination. There are many traditional methods of examining semen, which were used for decades in the 20th century to select the most valuable males. Parameters such as spermatozoa motility, concentration and morphology were examined with the microscope. More advanced methods included Computer-Assisted Sperm Analysis, flow cytometry and Motile Sperm Organelle Morphology Examination. Today, however, examination alone is not enough. The aim is to improve the quality of semen and thus increase pregnancy rates. This review focuses on innovative techniques of selecting spermatozoa, primarily the non-standard and uncommon nanotechnology. This novel, but relatively easy, method makes it possible to selectively purify semen of apoptotic sperm cells and improve the vitality of sperm cells by antioxidative activity, as well as to sort spermatozoa X and Y.

Keywords: semen, andrology, nanotechnology, artificial insemination

Dokładne badanie nasienia jest podstawą oceniania przydatności samców do rozrodu (28) oraz jednym z kluczowych etapów efektywnej sztucznej inseminacji, a wysoka jakość nasienia to obecnie istotny element wpływający na poprawę efektów reprodukcyjnych u zwierząt (6).

Tradycyjne metody badania nasienia

Do standardowych, konwencjonalnych metod oceny jakości nasienia należą: badanie makroskopowe, organoleptyczne, gdzie oceniana jest objętość ejakulatu, jego barwa, konsystencja, zapach oraz pH w zależności od gatunku (28), a także podstawowe, rutynowe badanie mikroskopowe (9) obejmujące: ocenę koncentracji plemników – metodą cytometryczną (29); ocenę ruchliwości plemników na ogrzonym stoliku Bloma lub szkiełku podstawowym (29) oraz ustalenie odsetka plemników poruszających się ruchem progresywnym w stosunku do ogółu plemników ruchliwych (20); ocenę morfologiczną, na którą składa się określenie procentowej liczby komórek z nieprawidłową budową (7, 19, 20); oraz określenie odsetka plemników martwych po wykonaniu rozmazu barwionego eozyną i nigrozyną (10). W ostatniej z wymienionych metod ustalany jest procentowy udział plemników z zabarwionymi główkami, klasyfikowanych jako martwe. Niewybarwione plemniki, analogicznie,

są w tym przypadku uznawane za żywe. Jedną z metod oceny żywotności plemników jest również test hipoosmotyczny (HOS), czyli test pęcznienia witki plemnikowej. Jest on testem opartym o zasadę półprzepuszczalności błony komórkowej w nieuszkodzonej (żywej) komórce plemnikowej. W teście HOS tylko plemniki żywe, czyli z nieuszkodzoną półprzepuszczalną błoną komórkową będą pęcznieć w środowisku hipotonicznym (18, 25).

Powyższy sposób postępowania z uzyskanym ejakulatem dostarcza podstawowych informacji na temat wartości hodowlanej danego osobnika i przez wiele lat pozwalał wybrać samca reproduktora o potencjalnie najlepszej wydajności rozrodczej. Tradycyjne metody badania pozyskanego ejakulatu z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej, pomimo swojej uniwersalności i możliwości wielokrotnego wykorzystania w praktyce są przy obecnych wymogach produkcyjnych niewystarczające. Przede wszystkim ich znaczną wadą jest brak obiektywizmu oraz precyzji (26), jak również nie w każdym przypadku można za ich pomocą wykryć obniżoną płodność (9, 14, 27). Coraz powszechniejsze użycie technik wspomaganego rozrodu, takich jak zapłodnienie *in vitro* lub transfer zarodków we współczesnych stadach zwierząt gospodarskich (13), wymaga stosowania nasienia o bardzo wysokiej jakości (9), w przeciwnym razie hodowca ponosi znaczne straty z powodu niewystarcza-

jącej liczby ciąż (27). Warto również dodać, że nasienie używane w wyżej wymienionych technikach zwykle jest uprzednio chłodzone bądź mrożone i rozmrażane, co znacznie wpływa na przeżywalność oraz żywotność plemników.

W wielu laboratoriach obecnie używane są również bardziej zaawansowane metody badania nasienia. Tradycyjny mikroskop świetlny coraz częściej zastępowany jest bardziej zaawansowanym kontrastowo-fazowym, który umożliwia obserwację komórek bez potrzeby barwienia kontrastowego. W wielu laboratoriach wykorzystywana jest także komputerowo wspomagana analiza jakości nasienia (CASA). Parametry takie jak koncentracja, morfologia czy ruchliwość plemników można za jej pomocą zbadać komputerowo w znacznie szybszy i bardziej precyzyjny sposób, redukując przy tym margines błędu (1, 2). CASA pozwala również na określenie dodatkowych parametrów, takich jak m.in. szybkość ruchu plemników, ruch w linii prostej, linii zakrzywionej czy amplitudę bocznych wychyleń główki (1, 2).

Do kolejnych, bardziej szczegółowych sposobów wykrywania wad w komórkach plemnikowych należą: badanie morfologiczne organelli plemnika (MSOME), które pozwala na dokładną analizę jądra komórkowego, akrosomu, cytoplazmy, a przede wszystkim liczby i wielkości wakuol (23) czy badania integralności chromatyny. Stopień defragmentacji chromatyny można zbadać wykonując m.in. test TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling) używając cytometrii przepływowej (26) czy test SCD (Sperm Chromatin Dispersion) polegający na wyizolowaniu chromatyny lub jej fragmentów poprzez poddanie komórek denaturacji kwasowej oraz lizie białek jądrowych (15). Po wybarwieniu preparatu w plemnikach z prawidłową integralnością DNA obserwuje się charakterystyczną otoczkę, tzw. halo, która zanika wraz ze wzrostem stopnia defragmentacji materiału genetycznego.

Metody poprawiające jakość nasienia

Współcześnie pojawia się coraz więcej badań dotyczących znacznie bardziej nowatorskich i innowacyjnych metod, które wykorzystywane są w postępowaniu z nasieniem stosowanym w technikach wspomaganej rozrodu (ART) zarówno u zwierząt, jak i u ludzi. Metody te bazują nie tylko na samej ocenie nasienia i stwierdzeniu na jej podstawie potencjału reprodukcyjnego, ale przede wszystkim dają możliwość wyselekcjonowania najbardziej pożądaných gamet, najczęściej tych najlepszych jakościowo. Do takich metod można zaliczyć m.in. metodę swim-up, która polega na umieszczeniu upłynnionego nasienia w probówce, pokryciu specjalnym medium hodowlanym oraz odwirowaniu i inkubacji (5). Medium będące górną warstwą dostarcza plemnikom substancji odżywczych, przez co prawidłowe oraz ruchliwe komórki migrują w górę. O ile sposób ten z powodzeniem jest stosowany u ludzi, tak nie zawsze sprawdza się w masowej reprodukcji zwierzęcej. Jak podają Sutovsky i wsp., w przypadku np. bydła metoda swim-up jest zbyt długotrwała przy jednocześnie niewielkiej objętości uzyskanego ejakulatu (27). Alternatywnymi technikami selekcji są również metody: swim-down, gdzie w przeciwieństwie

do swim-up warstwa medium znajduje się w probówce poniżej warstwy nasienia, co pozwala ruchliwym plemnikom naturalnie migrować; metoda filtracji szklaną watą, w której ruchliwe plemniki oddzielane są od nieruchliwych, ale również od leukocytów i zanieczyszczeń; czy wirowanie w gradiencie gęstości, po wykonaniu którego plemniki tworzą warstwy w probówce w zależności od ich gęstości. Dojrzałe i prawidłowe komórki, jako wykazujące większą gęstość, układają się w warstwę najniższej położoną (5).

Nanopuryfikacja nasienia

Powyższe techniki w znacznym stopniu poprawiają jakość nasienia, ale warto również mieć na uwadze ich wady, takie jak: duży koszt, praco- i czasochłonność czy zmniejszenie koncentracji uzyskanej dawki (12). Jednym z bardziej niestandardowych, a jednocześnie obiecujących sposobów poprawy jakości nasienia jest metoda z wykorzystaniem nanotechnologii. Nanocząsteczki to cząstki materii o umownej wielkości od 1 do 100 nm. Dzięki tak małym rozmiarom związki chemiczne w nanoskali osiągają duży stosunek powierzchni do objętości (12), co może pozwolić na zmianę ich właściwości fizycznych oraz chemicznych (17). Pojedyncza nanocząsteczka zwykle ma budowę warstwową, na którą składa się kilka różnych związków chemicznych. Podstawą tej budowy jest centralny rdzeń złożony z np. tlenku metalu, metalu szlachetnego bądź polimeru oraz jedna lub dwie opłaszczające go powłoki zewnętrzne mające odmienny od rdzenia skład chemiczny. Rodzaj związku chemicznego tworzącego rdzeń odpowiada za właściwości nanomolekuły, a z kolei najbardziej zewnętrzna powłoka umożliwia przyłączanie substancji organicznych (17). Te unikalne cechy nanocząsteczek pozwalają na ich szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach, między innymi produkcji zwierzęcej zarówno w zakresie przemysłu spożywczego, jak i bardziej w kierunku związanym z medycyną, w szczególności rozrodem (17). Co więcej, zaletą stosowania tej metody jest niewątpliwie niższy koszt czy brak konieczności posiadania specjalistycznego sprzętu, co ma miejsce przy korzystaniu z cytometrii przepływowej.

Nanocząsteczki coraz szerzej wykorzystywane są w badaniach nad nasieniem i jego właściwościami. Jednym z zastosowań nanocząsteczek w zakresie rozrodu oraz andrologii jest możliwość nanooczyszczania (nanopuryfikacji) nasienia, czyli selektywnego usuwania martwych i uszkodzonych plemników (3, 14). Sposób oddzielania plemników o prawidłowej morfologii i fizjologii od nieprawidłowych oparty na zjawisku magnetyzmu oraz działaniu specyficznych biomarkerów – lektyn i białka ubikwityny – został opracowany przez Clemente Associates (Madison, CT, USA). W procedurze tej wykorzystano nanocząsteczki tlenku żelaza (Fe_3O_4) opłaszczone przeciwciałami anti-ubikwitynowymi oraz lektynami pochodzenia roślinnego: PNA (Peanut agglutinin) i PSA (Pisum sativum agglutinin) mającymi powinowactwo do plemników z obecną przedwczesną reakcją akrosomalną (9, 27). Ubikwityna również służy tu jako biowskaznik, jako że jest białkiem obecnym na powierzchni zdegenerowanych akrosomów, jak również

plemników z innymi nieprawidłowościami w obrębie główki lub witek. Dzięki tym właściwościom magnetyczne nanocząsteczki tlenku żelaza łączą się z martwymi lub apoptotycznymi komórkami, a dokładnie ze związaną z nimi ubikwitiną, oddzielając plemniki z defektami od prawidłowych (9, 27), co pozwala na uzyskanie dawki nasienia bogatej jedynie w żywe plemniki i poprawę współczynników zapłodnialności. Pozytywne efekty nanoczyszczania plemników wykazały badania Feugang i wsp. na trzodzie chlewnej (14). Nanopuryfikacja nasienia dała skutek w postaci lepszych parametrów ruchliwości plemników oraz większego odsetka ciąży u loch inseminowanych oczyszczoną dawką ejakulatu. Co istotne, nie wykazano ujemnych skutków w zakresie postnatalnego rozwoju prosiąt pochodzących z ciąży z grupy badawczej w porównaniu z grupą kontrolną. Podobne badania wykonywano również na koniach (21) i bydło domowym (9, 22), gdzie, jak wyżej, wskaźnik zapłodnialności u samic inseminowanych nasieniem po nanopuryfikacji był wyższy. Z kolei próba z trzodą chlewną wykonywana przez Durfey et al. (11) wykazała zwiększoną ruchliwość plemników pochodzących z oczyszczonego nasienia, jednak bez uchwytynych zmian w żywotności plemników oraz zapłodnialności samic.

Oprócz oczyszczenia nasienia z wadliwych plemników, szczególną zaletą nanocząstek jest ich działanie antyoksydacyjne, jak również znajdują one zastosowanie jako sortery plemników, oddzielając komórki z chromosomem X od tych posiadających chromosom Y, najczęściej mniej pożądaných. Badania w zakresie sortowania plemników zostały przeprowadzone Ramirez Castex i wsp. (24) na ogierach oraz przez Dominguez i wsp. (8) na osłach. Pomimo braku wykazanych różnic w zakresie żywotności plemników w grupie badawczej i kontrolnej, efekty sortowania komórek zakończyły się sukcesem. W ejakulatach poddanych działaniu magnetycznych nanocząstek otrzymano średnio 90% plemników z chromosomem X, co może w przyszłości stanowić cenną alternatywę dla cytometru i związanych z nim ograniczeń, takich jak koszt czy czasochłonność (8).

Pozytywne rezultaty w zakresie sortowania plemników a także oznaczania wybranych sekwencji DNA, znakując tym samym uszkodzone plemniki, wykazano również wykorzystując nanocząsteczki złota. Badania zostały przeprowadzone na nasieniu buhajów (4, 16), gdzie posłużono się nanocząsteczkami złota sprzężonymi z odpowiednimi ligandami.

Podsumowując osiągnięcia współczesnej nauki w zakresie nanotechnologii należy stwierdzić, że pomimo różnorodności proponowanych technologii i opracowywanych metod w celu poprawy efektów reprodukcyjnych w procedurach *in vivo* i *in vitro*, metody z użyciem nanocząstek stały się niewątpliwie przełomem w procesach rozrodczych u ludzi i zwierząt.

Piśmiennictwo

- Agustinus A., Cennikon P.: Computer assisted sperm analysis: A review. Indonesian Andrology Biomed. J. 2020, 1, 2, 60-66.
- Amann R. P., Waberski D.: Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. Theriogenology 2014, 81, 1.
- Banday M. N., Lone F. A.: Nanopurification: an emerging technique to purify semen. Int. J. Sci. Environ. Technol. 2016, 5 (5), 3069-3072.
- Barchanski A., Taylor U., Sajti C. L., Gamrad L., Kues W. A., Rath D., Barcikowski S.: Bioconjugated gold nanoparticles penetrate into spermatozoa depending on plasma membrane status. J. Biomed. Nanotechnol. 2015, 11 (9), 1597-1607.
- Beydola T., Sharma R. K., Agarwal A.: Sperm preparation and selection technique. Medicine 2013, chapter 29, Corpus ID: 156051905.
- Chapuis A., Gala A., Ferrieres-Hoa A., Mullet T., Bringer-Deutsch S., Vintjeux E., Torre A., Hamamah S.: Sperm quality and paternal age: effect on blastocyst formation and pregnancy rates. Basic Clin. Androl. 2017, 2, 1-9.
- Czubaszek M., Andraszek K., Banaszewska D., Walczak-Jedrzejowska R.: The effect of the staining technique on morphological and morphometric parameters of boar sperm. Plos One 2019, 14 (3), e0214243.
- Dominguez E., Moreno-Irusta A., Ramirez Castex H., Florez Bragulat A., Ugaz C., Clemente H., Giojalas L., Lossino L.: Sperm sexing mediated by magnetic nanoparticles in donkeys, a preliminary in vitro study. J. Equine Vet. Sci. 2018, 65, 123-127.
- Doroftei B., Simionescu G., Neculai Valeanu S.: Application of nanotechnology in the improvement of semen quality – future trend in assisted reproduction. Research Gate 2015, 6.
- Dott H. M., Foster G. C.: A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain. J. Reprod. Fertil. 1972, 29, 443-445.
- Durfey C. L., Swistek S. E., Liao S. F., Crenshaw M. A., Clemente H. J., Thirumalai R. V. K. G., Steadman C. S., Ryan P. L., Willard S. T., Feugang J. M.: Nanotechnology-based approach for safer enrichment of semen with best spermatozoa. J. Anim. Sci. Biotechnol. 2019, 10, 14.
- Falchi L., Khalil W. A., Hassan M., Marei W. F. A.: Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm function. Int. J. Vet. Sci. Med. 2018, 6, 265-269.
- Feugang J. M.: Novel agents for sperm purification, sorting, and imaging. Mol. Reprod. Dev. 2017, 84 (9), 832-841.
- Feugang J. M., Liao S. F., Crenshaw M. A., Clemente H., Willard S. T., Ryan P. L.: Lectin-functionalized magnetic iron oxide nanoparticles for reproductive improvement. Journal of Fertilization: In Vitro – IVF-Worldwide, Reproductive Medicine, Genetics & Stem Cell Biology 2015, 3 (145), 17-19.
- Fernández J. L., Muriel L., Rivero M. T., Goyanes V., Vazquez R., Alvarez J. G.: The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. J. Androl. 2003, 24 (1), 59-66.
- Gamrad L., Mancini R., Werner D., Tiedemann D., Taylor U., Ziefuss A., Rehbock C., Klein S., Kues W., Barcikowski S., Rath D.: Triplex-hybridizing bioconjugated gold nanoparticles for specific Y-chromosome sequence targeting of bull spermatozoa. Analyst 2017, 142, 2020-2028.
- Hill E. K., Li J.: Current and future prospects for nanotechnology in animal production. J. Anim. Sci. Biotechnol. 2017, 8, 26.
- Jeyendran R. S., Van der Ven H. H., Perez Pealeze M., Crabo B. G., Zaneveld L. J. D.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fertil. 1984, 70, 219-228.
- Łęcka K., Kondracki S., Iwanina M., Wysokińska A.: Assessment of stallion semen morphology using two different staining methods, microscopic techniques, and sample sizes. J. Vet. Res. 2016, 60, 1, 99-104.
- Malmgren L.: Assessing the quality of raw semen: a review. Theriogenology 1997, 48, 523-530.
- Morris L. H., de Haan T., Landriscina L. G., Wilsher S., Gibb Z.: The effects of nanoparticle semen purification on semen Quality. J. Equine Vet. Sci. 2018, 66, 75.
- Odhiambo J. F., DeJarnette J. M., Geary T. W., Kennedy C. E., Suarez S. S., Sutovsky M., Sutovsky P.: Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen. Biol. Reprod. 2014, 91, 97.
- Oliveira J. B. A., Petersen C. G., Mauri A. L., Cavagna M., Baruffi R., Franco J. G.: Semen analysis by motile sperm organelle morphology examination (MSOME) in infertile and fertile men. Fertility and Sterility 2011, 96, 3.
- Ramirez Castex H., Losinno L.: Magnetic nanoparticles for x sperm separation from equine semen. Field and commercial results. [Nanopartículas magnéticas para separación de espermatozoides x en semen equino. Resultados de campo y comerciales]. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia 2018, 13 (2), 268-275.
- Revell S. G., Mrode R. A.: An osmotic resistance test for bovine semen. Anim. Reprod. Sci. 1994, 36, 77-86.
- Sharma R., Ahmad G., Esteves S. C., Agarwal A.: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. J. Assist. Reprod. Genet. 2016, 33 (2), 291-300.
- Sutovsky P., Kennedy C. E.: Biomarker-based nanotechnology for the improvement of reproductive performance in beef and dairy cattle. Industrial Biotechnology 2013, 1, 24-29.
- Wierzbowski S.: Andrologia. Wyd. Platan, Kraków 1999.
- Zduńczyk S., Janowski T.: Kliniczne aspekty zaburzeń rozrodo psów i kotów. Wyd. UWM, Olsztyn 2020.

Adres autora: lek. wet. Kinga Osemek, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin;
e-mail: kinga.osemek@up.lublin.pl